

Aus dem Transplantationslabor  
der Klinik für Viszeral- und Transplantationschirurgie  
der Medizinischen Hochschule Hannover

**Funktionen des Ektoenzym RT6  
auf natürlichen Killer-Zellen der Ratte**

Von dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

**Doktorin der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.**

genehmigte Dissertation  
von  
Dipl.-Biochem. Alexandra Kiefeld  
geboren am 25. August 1966 in Hamburg

2000

**Referent:** Prof. Dr. W. Müller  
**Korreferent:** Prof. Dr. M. Martin  
**Tag der Promotion:** 27.11.2000

Diese Arbeit ist meiner Mutter gewidmet

Die Arbeit wurde durch ein Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert, das im Rahmen des Graduiertenkollegs „Molekulare Pathophysiologie des Zellwachstums“ (Sprecher Prof. Dr. R.E. Schmidt) vergeben wurde.

## Abstract

Rat NK-cells express the glycosylphosphatidylinositol-(GPI)-anchored membrane protein RT6 (ART2). This molecule represents a member of the family of mono-ADP-ribosyltransferases (ARTs) and has been shown to possess ART-activity in the form of arginine-specific auto-ribosylation. The physiological functions of this ectoenzyme are still unclear.

It was the aim of this thesis to examine whether RT6 has signaling capabilities, which are able to modulate the effector-functions of NK-cells. To address this question, the effects of antibody-mediated cross-linking of RT6 expressed on NK-cell lines and freshly isolated NK-cells of the rat were investigated. Additionally, the possible role of ecto-NAD<sup>+</sup> in regulation of NK-activity postulated from the presence of NAD<sup>+</sup>-metabolizing cell surface RT6 was analysed.

RT6 cross-linking caused a rise in intracellular calcium and appeared to increase the tyrosine phosphorylation of a ~33 kDa protein. On the level of effector functions signal transduction through RT6 in the presence of interleukin (IL)-2 enhanced the expression of the  $\alpha$ -subunit of the IL-2-receptor and the production of interferon (IFN)- $\gamma$  and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ . Moreover, ligation of RT6 led to reduced expression of this molecule. This effect seems to be caused by the enzymatically release of RT6 from the cell surface by a serine protease.

IL-2 mediated induction of the high affinity IL-2-receptor was attended by enhanced expression of RT6. Expression of RT6 therefore seems to characterize an activated state of NK-cells.

Taken together, these observations led to the hypothesis that RT6 is part of a transmembrane signal-transducing complex. Interaction of this molecule with its so far unidentified ligand *in vivo* seems to recruit protein tyrosine kinases and phospholipase C resulting in transcription of genes (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , CD25), which are relevant for NK-effector-functions.

After initiation of the activation program, cleavage of RT6 could serve to permit dissociation of the stimulator and responder cells, allowing both partners to effect new interactions.

Incubation of NK-cells with NAD<sup>+</sup> reduced their production of IFN- $\gamma$ . Based on this observation, it was postulated that a local rise in the extracellular NAD<sup>+</sup> concentration, as a consequence of target cell lysis, triggers through the auto-ribosyltransferase-activity of RT6 a negative feedback-mechanism, which suppresses the effector functions of the NK-cell.

**keywords:** natural killer (NK) cells  
ART2  
mono-ADP-ribosyltransferase (ART)

## Kurzfassung

Ratten-NK-Zellen exprimieren das zu der Enzymfamilie der mono-ADP-Ribosyltransferasen (ART) gehörende Ektoenzym RT6 (ART2). Die physiologischen Funktionen dieses GPI-verankerten Ektoenzym sind bislang unklar.

In dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob RT6 Signalkapazitäten besitzt, die NK-Effektor-Funktionen modulieren können. Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurde ein *in vitro* Modellsystem benutzt, in dem RT6, exprimiert auf NK-Zell-Linien und frisch isolierten NK-Zellen der Ratte, anhand immobilisierter Antikörper kreuzvernetzt wurde. Einen weiteren Teil der Arbeit bildeten Untersuchungen zu der Bedeutung der enzymatischen Aktivität von RT6 für die Funktion von NK-Zellen. In diesem Zusammenhang wurden die Effekte von NAD<sup>+</sup>, dem Substrat von RT6, auf NK-Funktionen analysiert.

Auf der Ebene der frühen Signaltransduktion löste die Kreuzvernetzung von RT6.1 einen Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration aus. Begleitend war die verstärkte Tyrosinphosphorylierung eines etwa 33 kDa großen Proteins zu beobachten. Auf der Ebene der Zellfunktionen induzierte die RT6.1-Kreuzvernetzung bei gleichzeitigem Zusatz von Interleukin (IL)-2 die verstärkte Expression des hoch affinen IL-2-Rezeptor-Komplexes sowie eine gesteigerte Freisetzung von Interferon (IFN)- $\gamma$  und Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$ . Die Stimulation über RT6 hatte zudem eine reduzierte RT6-Expression zur Folge. Diesem Effekt scheint eine enzymatische Abspaltung des Moleküls zugrunde zu liegen, an der Serin-Proteasen maßgeblich beteiligt sind.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß die IL-2-vermittelte Induktion der IL-2R $\alpha$ -Kette auf NK-Zellen von einer gesteigerten RT6-Oberflächenexpression begleitet wird. Die Expression von RT6 scheint somit ein Stadium aktivierter NK-Zellen zu charakterisieren.

Basierend auf diesen Befunden wurde die Hypothese aufgestellt, daß RT6 Teil eines multimeren Signaltransduktionskomplexes ist und *in vivo* nach Bindung eines bislang unidentifizierten Liganden über Rekrutierung von Proteintyrosinkinasen und der Phospholipase C die Transkription von Genen (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , CD25) induziert, die für die Ausübung der Effektor-Funktionen von NK-Zellen von Bedeutung sind. Nach erfolgter Initiierung der Aktivierung der NK-Zelle könnte über die enzymatische Abspaltung von RT6 die Dissoziation der Effektor- und Zielzelle vorangetrieben und auf diesem Weg beide Partner für neue Interaktionen freigegeben werden.

Der Zusatz von NAD<sup>+</sup> zu NK-Zell-Kulturen dämpfte deren IFN- $\gamma$ -Freisetzung. Vor diesem Hintergrund wurde postuliert, daß die Lyse einer Zielzelle *in vivo* zu einer lokalen Erhöhung der NAD<sup>+</sup>-Konzentration führt, welche bei der NK-Zelle einen auf der Auto-Ribosyltransferase-Aktivität von RT6 basierenden, negativen Feedback-Mechanismus auslöst. Auf diesem Weg könnten *in vivo* die Effektor-Funktionen von NK-Zellen moduliert und ein Überschießen der NK-Reaktivität verhindert werden.

**Schlagworte:** natürliche Killer (NK)-Zellen  
ART2  
mono-ADP-Ribosyltransferase (ART)

# Inhaltsverzeichnis

## ABKÜRZUNGEN

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 Natürliche Killer Zellen (NK-Zellen)	1
1.2 RT6 (ART2)	7
1.3 mono-ADP-Ribosylierung	11
1.4 Problemstellung	12
<b>2 MATERIALIEN</b>	<b>15</b>
2.1 Chemikalien und Reagenzien	15
2.2 Verbrauchsmaterial	16
2.3 Geräte	17
2.4 Primer und Kompetitorfragmente	18
2.5 Antikörper und Hybridome	19
<b>3 METHODEN</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Zellkultur</b>	<b>21</b>
3.1.1 Kultur- und Inkubationsbedingungen	21
3.1.2 Medien	21
3.1.3 B-Zellhybridome	21
3.1.4 IL-2-abhängige NK-Zelllinien	21
3.1.5 NK-Zelllinie RNK-16	22
3.1.6 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität	22
3.1.7 Einfrieren und Auftauen von Zellen	22
<b>3.2 Gewinnung monoklonaler Antikörper aus B-Zellhybridoma</b>	<b>23</b>
<b>3.3 Aufreinigung monoklonaler Antikörper</b>	<b>23</b>
<b>3.4 Proteinbestimmung</b>	<b>24</b>
<b>3.5 Isotypbestimmung von Antikörpern über Agglutination</b>	<b>24</b>

<b>3.6 Immobilisierung monoklonaler Antikörper</b>	<b>25</b>
<b>3.7 Isolierung von NK-Zellen aus Rattenmilz</b>	<b>25</b>
3.7.1 Entnahme der Milz	25
3.7.2 Lyse der Erythrozyten	25
3.7.3 Depletion der B-Lymphozyten über Nylonwolle	26
3.7.4 Depletion der T-Lymphozyten durch antikörpervermittelte Plastikadhäsion	26
3.7.5 Depletion der T-Lymphozyten durch MACS	27
<b>3.8 Durchflußzytometrische Analytik</b>	<b>28</b>
3.8.1 Analyse der Zellvitalität mittels Propidiumiodid	28
3.8.2 Analyse der Expression von Zelloberflächenmolekülen	29
3.8.3 Analyse von intrazellulärem IFN- $\gamma$	30
3.8.4 Isotypbestimmung von Antikörpern	30
3.8.5 Messung der intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Konzentration	30
<b>3.9 Stimulation von Zellen</b>	<b>31</b>
<b>3.10 Bestimmung der Proliferation</b>	<b>32</b>
<b>3.11 Immunhistologische Färbung von Zytopräparaten</b>	<b>32</b>
<b>3.12 Protein-Dot-Blot</b>	<b>33</b>
<b>3.13 ELISA</b>	<b>34</b>
<b>3.14 Biosynthetische Markierung von Proteinen mit <sup>35</sup>S-Methionin und <sup>35</sup>S-Cystein</b>	<b>35</b>
<b>3.15 Zell-Lyse</b>	<b>35</b>
<b>3.16 Immunpräzipitation</b>	<b>36</b>
<b>3.17 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</b>	<b>37</b>
<b>3.18 Western-Blot</b>	<b>38</b>
3.18.1 Elektro-Transfer von Proteinen	38
3.18.2 Detektion mit Merrettich-Peroxidase und ECL-Reaktion	39
<b>3.19 Molekularbiologische Methoden</b>	<b>40</b>
3.19.1 Isolierung von Gesamt-RNA	40
3.19.2 „Reverse-Transkriptase-PCR“	41
3.19.2.1 RT-Reaktion	41
3.19.2.2 semiquantitative PCR-Analytik	42
3.19.2.3 kompetitive PCR-Analytik	43
3.19.2.4 Detektion der PCR-Produkte	43

<b>4 ERGEBNISSE</b>	<b>45</b>
<b>4.1 Vergleichende Charakterisierung der NK-Linien</b>	<b>45</b>
4.1.1 Oberflächen-Phänotyp	45
4.1.2 Expression des IL-2-Rezeptor-Komplexes	48
4.1.3 RT6-Expression	51
4.1.4 Zytokin-Expression	59
<b>4.2 Einfluß der RT6-Kreuzvernetzung auf NK-Zell-Funktionen</b>	<b>63</b>
4.2.1 Induktion des hoch affinen IL-2-Rezeptor-Komplexes	64
4.2.2 Verstärkte Freisetzung von IFN- $\gamma$ und TNF- $\alpha$	77
<b>4.3 Einfluß der RT6-Kreuzvernetzung auf die RT6-Expression der NK-Zellen</b>	<b>88</b>
4.3.1 Durchflußzytometrische Analyse	88
4.3.2 Immunzytometrische Analyse	96
4.3.3 RT6-Kreuzvernetzung in Gegenwart von Brefeldin A	99
4.3.4 Analyse der an der Freisetzung von RT6.1 beteiligten Enzyme	101
<b>4.4 Frühe Signaltransduktionsereignisse nach Kreuzvernetzung von RT6</b>	<b>110</b>
4.4.1 Erhöhung der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration	110
4.4.2 Induktion von Tyrosinphosphorylierungen	114
<b>4.5 Effekte von NAD<sup>+</sup> auf NK-Zell-Funktionen</b>	<b>117</b>
<b>5 DISKUSSION</b>	<b>119</b>
<b>5.1 Vergleichende Charakterisierung der NK-Linien</b>	<b>119</b>
<b>5.2 Freisetzung von RT6 durch NK-Zellen</b>	<b>126</b>
<b>5.3 RT6-vermittelte Modulation von NK-Zell-Funktionen</b>	<b>130</b>
<b>5.4 RT6-vermittelte Reduktion der RT6-Oberflächenexpression</b>	<b>135</b>
<b>5.5 Frühe Signaltransduktionsereignisse nach Kreuzvernetzung von RT6 und mögliche Mechanismen der Signalübermittlung</b>	<b>139</b>
<b>5.6 Beteiligung Fc-Rezeptor-vermittelter Effekte</b>	<b>147</b>
<b>5.7 Bedeutung der enzymatischen Aktivität von RT6 für die Funktion von NK-Zellen</b>	<b>150</b>



<b>6 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>157</b>
<b>7 LITERATUR</b>	<b>159</b>
<b>LEBENS LAUF</b>	
<b>DANKSAGUNG</b>	

## Abkürzungen

(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Masse pro Volumen
(w/w)	Masse pro Masse
[ <sup>3</sup> H]-TdR	Tritium-markiertes Thymidin
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Konzentration freier Kalziumionen im Zytosol
Abb.	Abbildung(en)
ADP	Adenosindiphosphat
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
BCIP	8-Bromo-4-Chloro-3-Indoylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA
cpm	Zählpulse (counts per minute)
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
DIM	„detergent-insoluble membrane“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DRM	„detergent-resistant membrane“
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
Fab	antigenbindendes Antikörperfragment
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer
Fc	leicht zu kristallisierendes Antikörperfragment
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiozolat
g	Erdbeschleunigung
GEM	„glycosphingolipid-enriched membrane“
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GαR	Ziege-anti-Ratte-Antikörper (Goat-anti-rat)
GαM	Ziege-anti-Maus-Antikörper (Goat-anti-mouse)
h	Stunde(n)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
IEL	intraepitheliale Lymphozyten
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IL-2	Interleukin 2
IL-2R	Interleukin-2-Rezeptor
IL-4	Interleukin 4
kDa	Kilodalton
KV	Kreuzvernetzung
log	dekadischer Logarithmus

M	Mol
mA	Milliampere
mADPRT	mono-ADP-Ribosyltransferase
mAK	monoklonaler Antikörper
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute(n)
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht bzw. Mittelwert
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (oxidiert)
n.b.	nicht bestimmt
NBT	Nitroblautetrazolium
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
nMS	normales Maus Serum
NP-40	Nonidet <sup>®</sup> P-40, Ethylphenolpoly(ethylenglykolether) <sub>n</sub>
nRS	normales Ratten Serum
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung nach Dulbecco
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMS	Phenanzinmethosulfat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POX	Peroxidase
PTK	Proteintyrosinkinase
RT	Reverse Transkriptase oder Raumtemperatur
s.o.	siehe oben
SA-PE	Streptavidin-Phycoerythrin
SA-TC	Streptavidin-Tricolor
SAW	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sRT6	lösliches RT6
Tab.	Tabelle(n)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
Tween <sup>®</sup> 20	Poly(oxyethylen) <sub>n</sub> -sorbitan-monolaurat
UE	Untereinheit
V	Volt
λ	Wellenlänge
z.B.	zum Beispiel

## 1.1 Einleitung

## 1.2 Natürliche Killer Zellen (NK-Zellen)

Die natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) wurden aufgrund ihrer Fähigkeit bestimmte Tumorzellen spontan und ohne vorherige Aktivierung zu töten entdeckt (Kiessling et al., 1975). Es handelt sich um lymphoide Zellen, die unter anderem anhand ihrer Morphologie und ihrer spezifischen Expression von Oberflächenmolekülen von B- und T-Lymphozyten abgegrenzt werden können. NK-Zellen sind CD16 (Fc $\gamma$ RIII)-positiv, exprimieren aber weder CD3- oder CD4-Moleküle, noch eine der Ketten des T-Zell- oder B-Zell-Rezeptors (Trinchieri, 1989). Im humanen System wird zusätzlich die Expression von CD56, in der Maus und der Ratte die Expression des NKR-P1-Moleküls zur Identifizierung von NK-Zellen herangezogen (Yokoyama, 1998).

NK-Zellen kommen im peripheren Blut, wo sie etwa 10% der Lymphozyten-Population ausmachen, und zahlreichen lymphatischen und nicht lymphatischen Kompartimenten vor. Sie sind in Leber, Lunge, Darm, Plazenta und vor allem in der Milz zu finden; unter normalen Bedingungen sind NK-Zellen jedoch nur vereinzelt in den Lymphknoten vertreten (Rolstad et al., 1986). Anders als die meisten B- und T-Zellen rezirkulieren NK-Zellen nicht zwischen Blut und lymphoiden Geweben (Rolstad et al., 1986). Die Reifung und Entwicklung des Repertoires der NK-Zellen kann sich im Gegensatz zu der Differenzierung der T-Zellen thymusunabhängig vollziehen (Herberman et al., 1975).

NK-Zellen sind als die erste Verteidigungslinie innerhalb der angeborenen, nicht adaptiven Immunabwehr von existentieller Bedeutung bei der Abwehr bestimmter Viren, intrazellulärer Bakterien, Pilze und Parasiten. Während die adaptive, antigenspezifische Immunantwort erst nach einer Latenzzeit von einigen Tagen nach Erstkontakt mit dem Pathogen einsetzt, können NK-Zellen innerhalb von Stunden aktiviert werden. Zudem vermitteln diese Zellen die früheste und vermutlich erste Abwehrreaktion gegen bestimmte Tumorzellen (Lotzova, 1993) und scheinen die Verbreitung im Blut entstandener Metastasen und die Entwicklung primärer Tumore zu limitieren (Hanna, 1980).

### **Effektor-Funktionen von NK-Zellen:**

Eine wichtige Effektor-Funktion von NK-Zellen ist ihre spontane zytotoxische Aktivität ohne vorherige Sensibilisierung, die sich gegen körpereigene virusinfizierte Zellen, Tumorzellen oder mit Antikörper besetzte Zellen richtet (Kiessling et al., 1975). Auch ein weites Spektrum

allogener Zellen wird von NK-Zellen als Zielzelle erkannt und getötet. NK-Zellen benutzen zwei verschiedene Mechanismen, um ihre Zielzellen zu lysieren: einen sekretorischen, Perforin/Granzym-vermittelten Weg (Henkart, 1985, O'Shea und Ortaldo, 1992, Krensky, 2000) und einen nicht sekretorischen, durch Interaktion zwischen FASL und FAS (CD95) vermittelten Weg (Trauth et al., 1989; Arase et al., 1995). Voraussetzung für beide Mechanismen ist ein direkter Zellkontakt.

Die Funktion von NK-Zellen geht weit über ihre zytotoxische Aktivität gegen spezifische Zielzellen hinaus. Anders als T-Zellen können NK-Zellen schnell und effizient verschiedene Zytokine produzieren, wenn sie in einem nicht voraktiviertem Zustand stimuliert werden (Trinchieri, 1989). Zu den sezernierten Zytokinen zählen Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), Tumornekrose-Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ ), Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktoren (GM-CSF), Interleukin-1 (IL-1), TGF- $\beta$  („transforming growth factor“) und Interleukin-10 (IL-10) (Übersicht in: Trinchieri, 1989; Mehrotra et al., 1998). Über die Bildung dieser Zytokine tragen NK-Zellen durch die Aktivierung entzündlicher Immunantworten zur Abwehr von Mikroorganismen bei. Zudem haben sie auf diesem Wege eine wichtige Rolle bei der Regulation des Immunsystems in einem frühen Stadium einer Immunabwehr und beeinflussen die Entwicklung spezifischer T- und B-Zell-Antworten. Während der frühen Entzündungsreaktion auf eine Infektion sind NK-Zellen vor der Entwicklung der spezifischen Immunität die erste Quelle von IFN- $\gamma$  (Trinchieri, 1997) und über dieses Zytokin bei der Kontrolle intrazellulärer Pathogene von entscheidender Bedeutung (Bancroft, 1993). Von NK-Zellen produziertes IFN- $\gamma$  hat direkte antivirale Effekte, wirkt stimulierend auf die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen und fördert die Makrophagen-reiche Entzündungsreaktion. Über die Freisetzung von IFN- $\gamma$  sind NK-Zellen auch an der Regulation spezifischer Immunantworten beteiligt. IFN- $\gamma$  stimuliert die Expression von MHC-(major histocompatibility complex)-Klasse-I- und Klasse-II-Molekülen. Indem es auf diesem Wege die Antigen-Präsentation z.B. in virusinfizierten Zellen (via MHC-Klasse-I) bzw. Makrophagen (via MHC-Klasse-II) verstärkt, aktiviert IFN- $\gamma$  die Klasse-I- und Klasse-II-restringierten T-Zellen, fördert die Erkennungsphase der Immunreaktion und verstärkt sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunantwort. IFN- $\gamma$  treibt zudem die T<sub>H</sub>1-Immunantwort voran, indem es die Differenzierung der naiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in Richtung des T<sub>H</sub>1-Subsets stimuliert und das Wachstum der T<sub>H</sub>2-Zellen hemmt (Boehm et al., 1997). Im Prozeß der durch B-Zellen vermittelten, T-Zell-unabhängigen (TI, „T-cell-independent“) humoralen Immunität (Mond et al., 1995) stimulieren NK-Zellen durch Bildung von IFN- $\gamma$  und GM-CSF die Bildung antiviraler und antibakterieller Antikörper (Tay et al., 1998).

Zudem fördert IFN- $\gamma$  den Isotypen-Wechsel („switch“) in Richtung der IgG2a-Produktion (Collins und Dunnick, 1993) und damit die Produktion von Antikörpern, die von den auf NK-Zellen exprimierten Fc $\gamma$ RIII-Rezeptoren erkannt werden können. Ein weiterer wichtiger Aspekt der NK-vermittelten IFN- $\gamma$ -Freisetzung ist deren wesentlicher Beitrag zu der Abstoßung transplantiertes, allogener und xenogener Organe (Gaston, 1994, Goodan, 1997). Von NK-Zellen produziertes TNF- $\alpha$  scheint über einen Feedback-Mechanismus seine eigene Synthese zu regulieren und als kostimulatorisches Signal die IFN- $\gamma$ -Produktion zu verstärken. Die wichtigsten lokalen Wirkungen von TNF- $\alpha$  bestehen in der Auslösung von Entzündungsreaktionen und der mit DNA-Fragmentierung verbundenen Lyse verschiedener Tumorzellen (Tite, 1990). TNF- $\alpha$  gehört, wie auch FASL, zu der TNF-Superfamilie, deren Mitglieder an Rezeptoren der TNF-Rezeptor-(TNFR)-Superfamilie binden. Diese Rezeptoren besitzen in der C-terminalen Region ihrer zytoplasmatischen Domäne eine als „death domain“ bezeichnete Aminosäuresequenz, die für die zytotoxischen Signale nach Bindung des Liganden verantwortlich ist.

### **Mechanismen der Erkennung von Zielzellen:**

Ein Schlüsselprinzip der Spezifität von NK-Zellen wurde durch Studien entdeckt, die zeigten, daß vorzugsweise Zellen attackiert wurden, welche die Oberflächen-Expression klassischer MHC-Klasse-I-Moleküle herunterreguliert hatten. Basierend auf dieser Entdeckung formulierten Ljunggren und Kärre (1990) die Hypothese, daß die Reaktion von NK-Zellen gegen körpereigene Zellen durch die Erkennung von Klasse I-MHC-Antigenen des Individuums verhindert wird („missing-self“-Hypothese). MHC-Klasse-I-Moleküle werden von einer hochpolymorphen Genfamilie codiert, die stark zwischen einzelnen Individuen variiert. Durch diese Hypothese wurde plausibel, warum NK-Zellen ein weites Spektrum normaler Zellen eines anderen Individuums, z.B. allogene Lymphozyten („allogene Lymphozyten Toxizität“) oder Knochenmark-Zellen („hybrid resistance“) erkennen und töten (Bennet, 1987; Rolstad et al., 1994). Sie erklärte auch, warum körpereigene Tumorzellen und virusinfizierte Zellen, die oft ihre Zelloberflächen-MHC-Moleküle herunterregulieren und dadurch der T-Zell-vermittelten Immunität entkommen können, auf diesem Weg anfällig für die Attacke durch NK-Zellen werden, während gesunde Zellen, die körpereigene MHC-Moleküle exprimieren, gegen den Angriff geschützt sind. Mittlerweile wurden auf NK-Zellen der Ratte, der Maus und des Menschen Rezeptoren identifiziert, die spezifische MHC-Klasse-I-Moleküle binden und als Folge dieser Wechselwirkung die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen hemmende Signale vermitteln.

### **Inhibierende MHC-Rezeptoren:**

Es können drei verschiedene Typen von inhibierend wirkenden MHC-Klasse-I-Rezeptoren unterschieden werden: die zu der Immunglobulin-Superfamilie gehörenden KIRs („killer inhibitory receptors“) sowie zwei zu der C-Typ-Lektin-Superfamilie gehörende Rezeptortypen, und zwar die heterodimeren CD94-NKG2-Rezeptoren und die homodimeren Ly49-Rezeptoren. Während in der Ratte und der Maus bislang nur C-Typ-Lektin-Rezeptoren identifiziert werden konnten, exprimieren humane NK-Zellen nach aktuellem Wissensstand sowohl CD94-NKG2-Rezeptoren als auch KIRs, nicht aber Rezeptoren vom Ly49-Typ. Die Expression der CD94-NKG2-Rezeptoren konnte in der Ratte bislang nur auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (Dissen et al., 1997; Berg et al., 1998).

KIRs, inhibierende Ly49-Rezeptoren und NKG2a beinhalten in ihrem zytoplasmatischen Teil als ITIM-Domänen („Immunoreceptor Tyrosin Based Inhibitory Motif“) bezeichnete Aminosäuresequenzen, die ein Bindungsmotiv für SHP-1 und SHP-2-Phosphatasen darstellen und direkt an der negativen Signaltransduktion beteiligt sind. Die ITIM-Motive werden nach Wechselwirkung des Liganden mit seinem Rezeptor durch die assoziierte Kinase p56<sup>lck</sup> tyrosinphosphoryliert und binden dann SH2-Domänen der Tyrosinphosphatasen SHP-1 oder SHP-2. Die aktivierten Phosphatasen dephosphorylieren Adapter- bzw. Effektor-Moleküle, die Teil des aktivierenden Signaltransduktionsweges in NK-Zellen sind und unterbinden auf diesem Weg durch aktivierende Rezeptoren vermittelte, positive Signale.

### **Aktivierende MHC-Rezeptoren:**

Die molekulare Klonierung von humanen KIRs zeigte, daß Mitglieder dieser Genfamilie auch aktivierend auf NK-Zellen wirken können. Diese in enger Beziehung zu den KIRs stehenden aktivierenden Rezeptoren wurden als KARs („killer activating receptors“) bezeichnet. KARs besitzen eine kürzere zytoplasmatische Domäne als KIRs und sind dementsprechend kleiner (p50 statt p75). Die Erkennung ihrer Liganden auf potentiellen Zielzellen kann die Lyse der Zielzelle oder die Freisetzung von Zytokinen zur Folge haben. Werden inhibierende und aktivierende Rezeptoren gemeinsam auf einer Zelle exprimiert, so dominiert das durch den inhibierenden Rezeptor vermittelte Signal. Eine Besonderheit der in der Ratte exprimierten MHC-Rezeptoren besteht darin, daß in dieser Spezies einige NK-Zellen neben klassischen Klasse-I-MHC (RT1.A)-Molekülen auch bestimmte polymorphe nicht-klassische (RT1.C) Klasse-I-Moleküle erkennen. Die Bindung der RT1.C-Moleküle an die Rezeptoren vermittelt aktivierende Signale (Rolstad et al., 1997, Vaage et al., 1994, Naper et al., 1996).

### **Weitere aktivierende Moleküle auf der Oberfläche von NK-Zellen:**

NK-Zellen werden zusätzlich durch eine Anzahl von Rezeptoren aktiviert, deren Liganden keine MHC-Moleküle sind (z.B. NKR-P1, Ly-6, CD16, CD69, verschiedene Adhäsionsmoleküle). „Der“ NK-Zell-Rezeptor, welcher für die Initiierung der Lyse der Zielzelle verantwortlich ist, wurde bislang nicht identifiziert. Während T- und B-Zellen Antigen über klonal beschränkte Rezeptoren erkennen, die durch Genrekombinationen hergestellt werden, benutzen NK-Zellen eine Vielzahl differenter, nicht rekombinierender Rezeptoren, um ihre Effektor-Funktionen in Gang zu setzen.

Die zu der C-Typ-Lektin-Familie gehörende Gruppe der NKR-P1-Moleküle wurde zuerst in der Ratte entdeckt (Chambers et al., 1989), homologe Moleküle wurden mittlerweile auch in Mensch und Maus identifiziert. Gegen NKR-P1 gerichtete Antikörper induzieren die Mobilisierung von intrazellulären Kalziumionen, die Degranulation, die Lyse von Zielzellen und die Freisetzung von Zytokinen (Ryan et al., 1991). Die natürlichen Liganden von NKR-P1 wurden bislang nicht identifiziert, es konnte jedoch gezeigt werden, daß Kohlenhydrat-Determinanten gebunden werden. Erst kürzlich wurden auch inhibierende Mitglieder der NKR-P1-Rezeptor-Familie identifiziert (Kung et al., 1999; Carlyle et al., 1999).

Ein weiteres auf NK-Zellen exprimiertes Oberflächenmolekül ist der schwach affine Rezeptor für den Fc-Abschnitt von IgG (Fc $\gamma$ RIII, CD16). Die Expression von CD16 bildet die Basis für einen als Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) bezeichneten Prozeß (Timonen et al., 1981), in dem mit Antikörper beladene Zielzellen durch NK-Zellen erkannt und lysiert werden. Gleichzeitig kommt es zu der verstärkten Ausschüttung von Zytokinen. Monomeres IgG bindet mit geringer Affinität an CD16 und kann NK-Zellen nicht aktivieren. Für Subpopulationen humaner NK-Zellen konnte zudem die Expression von Fc $\gamma$ RII (CD32) gezeigt werden, der wie CD16 IgG mit schwacher Affinität bindet (Metes et al., 1998).

NK-Zellen exprimieren relativ viele Adhäsionsmoleküle, darunter CD2, die  $\beta$ 2-Integrine CD11a/CD18 (LFA-1), CD11b/CD18 und CD11c/CD18,  $\alpha$ 1-  $\alpha$ 4,  $\alpha$ 5- $\beta$ 1Integrine, CD44, CD56 und L-Selektin. Auf NK-Zellen exprimierte Adhäsionsmoleküle dienen nicht nur der Herstellung bzw. Aufrechterhaltung des Zellkontaktes zwischen Effektor- und Zielzelle, sondern können unter bestimmten Bedingungen nach Bindung ihres Liganden auch Signale übermitteln, die zu der Aktivierung der NK-Zelle beitragen und die Lyse der Zielzelle oder die Zytokin-Produktion stimulieren (Lanier et al., 1997). Die Aktivierung von NK-Zellen kann die *de novo*-Synthese oder verstärkte Expression dieser Moleküle induzieren. Die Expression eines bestimmten Musters an Adhäsionsmolekülen auf der NK-Zelle und der



entsprechenden Liganden auf der Zielzelle scheint eine Voraussetzung für die Aktivierung der Effektor-Zelle zu sein.

Viele aktivierende Rezeptoren auf NK-Zellen benutzen gemeinsame Adaptermoleküle oder Signaltransduktionswege. So assoziieren NKR-P1 (Arase et al., 1997) und NKp46 (Pessino et al., 1998) mit CD3 $\zeta$ - oder Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ -Ketten. CD3 $\zeta$  scheint zudem auch an der CD2-vermittelten Signaltransduktion in NK-Zellen beteiligt zu sein (Vivier et al., 1991). CD16, die ligandenbindende  $\alpha$ -Untereinheit des schwach affinen Fc-Rezeptors, ist nicht kovalent mit  $\zeta$ - $\zeta$ ,  $\gamma$ - $\gamma$ -Homo- oder  $\zeta$ - $\gamma$ -Heterodimeren assoziiert (Lanier et al., 1989, Wirthmüller et al., 1992). Von NK-Zellen exprimiertes CD3- $\zeta$  und Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  besitzen ITAM-(„immunoreceptor tyrosine-based activation motifs“) Motive in ihrer zytoplasmatischen Domäne. Nach Ligandenbindung werden diese Sequenzen phosphoryliert und rekrutieren daraufhin Tyrosinkinasen (Syk, ZAP70) (Chan et al., 1994). Andere aktivierende NK-Rezeptoren (Ly49D, Ly49H, CD94/NKG2C, NKp44) übertragen ihre Signale durch Assoziation mit dem eine ITAM-Sequenz beinhaltendem Adaptermolekül DAP-12 (Lanier et al., 1998). Es wurden auch aktivierende NK-Zell-Rezeptoren identifiziert, die für ihre Signaltransduktion keine Adaptermoleküle mit ITAM-Sequenzen benutzen; so aktiviert z.B. der 2B4-Rezeptor einen Signalweg, der die zytoplasmatische SHP-2 Tyrosinphosphatase und ein SH2 („src homology-2)-enthaltendes intrazelluläres Adaptermolekül, genannt SAP (Tangye et al., 1999) rekrutiert.

### **Effekte von Zytokinen auf NK-Zellen:**

IL-2 ist ein potenter Aktivator von NK-Zellen (Kuribayashi et al, 1981) und dient zudem als chemotaktischer Faktor für diese Zellen (Natuk und Welsh, 1987). Der Großteil der NK-Zellen exprimiert konstitutiv intermediär affine IL-2-Rezeptoren (IL-2R) bestehend aus den Untereinheiten IL-2R $\beta$  (p70, CD122) (Phillips et al., 1989) und IL-2R $\gamma$  (CD132) (Caliguri et al., 1990). Dementsprechend sind hohe IL-2-Konzentrationen (~100 U/ml) nötig, um NK-Zellen zur Proliferation anzuregen und zu aktivieren. Die Aktivierung von NK-Zellen kann die Expression des hoch affinen IL-2Rs, bestehend aus jeweils einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit, induzieren (Siegel et al., 1987). IL-2-aktivierte NK-Zellen, bezeichnet als Lymphokin-aktivierte Killer-(LAK)-Zellen, vermitteln spezifische Funktionen wie Zytotoxizität und Tumor-Infiltration besonders effizient und exprimieren Oberflächenmoleküle, die auf ruhenden NK-Zellen nicht nachgewiesen werden konnten (Giezeman-Smits et al., 1998). Eine Population dieser LAK-Zellen kann aufgrund ihrer Anhaftung an Plastikoberflächen isoliert werden und wird als adhärenente LAK (A-LAK)-

Population oder als IL-2-aktivierte NK (IA-NK)-Population bezeichnet (Vujanovic et al., 1988). Der Prozeß der IL-2 induzierten Adhäsion geht auf die verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen zurück (Vujanovic et al., 1993). IL-2 kann NK-Zellen zudem zu der Produktion von IFN- $\gamma$  anregen (Young und Ortaldo, 1987). Ruhende bzw. nicht aktivierte NK-Zellen produzieren als Antwort auf IL-2 allein nur geringe Mengen an IFN- $\gamma$ , die Kostimulation durch von Makrophagen gebildetes IL-12 führt jedoch zu einem vehementem, dosisabhängigem Anstieg der IFN- $\gamma$ -Freisetzung (Carson et al., 1994, Orange et al., 1995). Ebenfalls von Makrophagen nach Infektion mit Pathogenen gebildetes TNF- $\alpha$  stimuliert synergistisch mit IL-12 die IFN- $\gamma$ -Produktion (Hunter et al., 1994). Da IL-2 nur von antigenaktivierten T-Zellen produziert wird (Smith, 1988) steht es *in vivo* während der frühen Antwort der NK-Zellen normalerweise nicht zur Verfügung, so daß andere Faktoren dessen kostimulatorische Funktion zu übernehmen scheinen. Auch IL-18 spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von NK-Zellen und der Stimulation ihrer IFN- $\gamma$ -Produktion; der aktivierende Effekt von IL-18 scheint ebenfalls von IL-12 abhängig zu sein (Walker et al., 1999).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß NK-Zell-Funktionen durch die Integration von Signalen verschiedener aktivierender Rezeptoren bestimmt werden, die wiederum einer Regulation durch inhibitorische MHC-Klasse-I-Rezeptoren unterliegen. Somit werden die Effektor-Funktionen von NK-Zellen durch eine feine Balance zwischen stimulierenden und inhibierenden Signalen reguliert (Übersicht in: Lanier, 2000; Lanier, 1998).

### **1.3 RT6 (ART2)**

RT6 (PtA, RT-Ly-2, AgF und ART2) wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen als ein auf T-Zellen der Ratte exprimiertes Oberflächenmolekül entdeckt. Die Funktion dieses Moleküls ist bislang unbekannt. Die Entdeckung, daß die Expression von RT6 auf reife, periphere T-Zellen beschränkt ist, führte zu seiner intensiven Benutzung als T-Zell-Differenzierungsmarker (Ernst und Lubaroff, 1984; Hunt und Lubaroff, 1992; Thiele et al., 1987). Das RT6-Molekül wird auf dem Großteil (ca. 70 %) der reifen peripheren T-Zellen, nicht aber auf Thymozyten oder Zellen des Knochenmarks exprimiert (Mojcik et al., 1988; Thiele et al., 1987; Greiner et al., 1982; Schwinger et al., 1989; Waite et al., 1996). Ungefähr 80% der CD8<sup>+</sup>, ~50% der CD4<sup>+</sup> und ~35% der CD45<sup>+</sup>-T-Zellen tragen RT6 auf ihrer Oberfläche (Mojcik et al., 1988). Voll differenzierte zytotoxische T-Lymphozyten gehören der RT6-negativen T-Zell-Population an (Mordes et al., 1996). Ein Großteil der intraepithelialen Lymphozyten (IEL)

exprimiert RT6 in besonders hoher Dichte zusammen mit CD8 und dem  $\alpha/\beta$ TCR/CD3-Komplex (Fangmann et al., 1990). Die Entdeckung, daß auch Subpopulationen von Ratten-NK-Zellen RT6 auf ihrer der Zelloberfläche exprimieren (Wonigeit et al., 1997), bildete die Basis für die vorliegende Arbeit.

Zwei durch polyklonale Seren und monoklonale Antikörper charakterisierte serologische Determinanten, RT6.1 und RT6.2, kennzeichnen die Genprodukte der beiden Allele des Ratten-RT6-Systems, *RT6<sup>a</sup>* und *RT6<sup>b</sup>* (Lubaroff et al., 1983). Der entsprechende Genort liegt auf Chromosom 1. *RT6<sup>a</sup>*- und *RT6<sup>b</sup>*-cDNAs wurden sequenziert (Haag et al., 1990a, Koch et al., 1990a), und rekombinante Proteine beider Allele hergestellt (Haag et al., 1995, Maehama et al., 1995 und 1996, Rigby et al., 1996a, Moss et al., 1997). Die Untersuchungen zeigten, daß sich die cDNA Sequenzen von *RT6<sup>a</sup>* und *RT6<sup>b</sup>* an 18 Nukleotid-Positionen unterscheiden (Haag et al., 1990b) und RT6.1 und RT6.2 auf Proteinebene zu ca. 95 % identisch sind. Das *RT6*-Gen besteht aus acht Exons, von denen Exon 7 das vollständige, native Protein kodiert (Haag et al., 1996). Mit Exon 1 und 2 sind zwei voneinander unabhängige, TATA-Boxen enthaltende Promotoren assoziiert.

Es existieren zwei Maus-Homologe des Ratten-*RT6*-Gens, *Rt6 locus-1* und *Rt6 locus-2*, die wahrscheinlich durch Genduplikation entstanden sind (Koch et al., 1990b; Prochazka et al., 1991) und in verschiedenen polymorphen Formen existieren. Die Gene wurden kloniert (Prochazka et al., 1991) und die zugehörigen Proteine Rt6-1 und Rt6-2 charakterisiert (Koch-Nolte et al., 1996). Die Expression von Maus-Rt6-Protein konnte erst kürzlich anhand eines monoklonalen Antikörpers nachgewiesen werden (Koch-Nolte et al., 1999).

Ein humanes *RT6*-Gen wurde beschrieben, scheint aber aufgrund dreier Stop-Codons nicht funktionell zu sein (Haag et al., 1994).

RT6 und sein Maus-Homolog Rt6 sind über einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-Anker mit der Zellmembran verbunden (Koch et al., 1986; Crisa et al., 1993, Koch-Nolte et al., 1999); beide können von T-Zellen und intraepithelialen Lymphozyten durch Behandlung mit Phospholipase C (PI-PLC) abgespalten werden (Fangmann et al., 1991).

Beide Isoformen von RT6 werden als nicht glykosylierte Proteine mit einem apparenten Molekulargewicht von jeweils ~26-28 kDa an die Zelloberfläche transportiert; im Gegensatz zu RT6.2 wird RT6.1 zusätzlich in verschiedenen glykosylierten Formen (30-38 kDa) exprimiert (Crisa et al., 1990 und 1993). In Übereinstimmung mit diesen Befunden konnte nur in der *RT6<sup>a</sup>*-, nicht aber in der *RT6<sup>b</sup>*-cDNA-Sequenz eine einzelne, potentielle Glykosylierungsstelle identifiziert werden (Koch et al., 1990a; Haag et al., 1990b). Diese

Modifikation scheint jedoch keinen Einfluß auf die funktionelle Aktivität von RT6.1 zu haben.

Wie viele GPI-verankerte Moleküle konnten auch RT6.1 und RT6.2 im Serum in löslicher Form nachgewiesen werden (Waite et al., 1993).

Die Expression von RT6 scheint in T- und NK-Zellen unterschiedlich reguliert zu werden. Bei T-Zellen besteht eine deutliche Heterogenität bezüglich der Expression beider *RT6*-Allele; so wird in heterozygoten Ratten das *RT6<sup>b</sup>*-Allel auf einer größeren Anzahl von T-Zellen exprimiert als das *RT6<sup>a</sup>*-Allel (Thiele et al., 1993). Ein Großteil der peripheren T-Zellen koexprimiert RT6.1 und RT6.2 (Angelillo et al., 1988); es konnte jedoch auch eine *RT6.2<sup>+</sup>RT6.1<sup>-</sup>*-Subpopulation identifiziert werden (Thiele et al., 1993). Diese Asymmetrie in der Expression beider *RT6*-Allele konnte für NK-Zellen nicht gezeigt werden (Wonigeit et al., 1997). Diesen Befunden könnte eine in beiden Zelltypen unterschiedliche Benutzung der beiden RT6-Promoter-Regionen zugrunde liegen.

Erste Hinweise auf die mögliche Funktion von RT6 lieferte seine Zuordnung zu der Familie der  $\text{NAD}^+$ :Arginin-ADP-Ribosyltransferasen (ART) aufgrund signifikanter Sequenz-Homologien zu mono-ADP-Ribosyltransferasen (mADPRT), die aus verschiedenen Geweben anderer Spezies aufgereinigt und sequenziert wurden. In der resultierenden, neuen Nomenklatur werden die *RT6*-Allele der Ratte als *ART2<sup>a</sup>* (*RT6<sup>a</sup>*) bzw. *ART2<sup>b</sup>* (*RT6<sup>b</sup>*) und die homologen Gene in der Maus als *Art2<sup>a</sup>* (*Rt6<sup>a</sup>*) und *Art2<sup>b</sup>* (*Rt6<sup>b</sup>*) bezeichnet. Die Proteine erhielten die Bezeichnungen ART2.1 und ART2.2 (Ratte) bzw. Art2.1 und Art2.2 (Maus).

mADPRT katalysieren den reversiblen Transfer von ADP-Ribose (ADPR) von Nicotinamidadenindinucleotid ( $\text{NAD}^+$ ) auf eine spezifische Aminosäure eines Zielproteins unter gleichzeitiger Freisetzung von Nicotinamid. Neben der Transferase-Aktivität besitzen alle mADPRT die Fähigkeit,  $\text{NAD}^+$  zu Nicotinamid und ADPR umzusetzen (NAD-Glykohydrolase- bzw. NADase-Aktivität). RT6.1 und RT6.2 besitzen die aufgrund der strukturellen Homologien zu mADPRT erwartete NADase-Aktivität (Takada et al., 1994). RT6.2 besitzt außerdem die Fähigkeit zur Auto-Ribosylierung (Haag et al., 1995; Rigby et al., 1996a). Eine Auto-Ribosylierungs-Aktivität von RT6.1 wird derzeit von verschiedenen Arbeitsgruppen kontrovers diskutiert (Haag et al., 1995; Maehama, et al., 1995). Die Übertragung von ADPR-Gruppen auf exogene Akzeptor-Proteine konnte bislang weder für RT6.1, noch für RT6.2 nachgewiesen werden (Hara et al., 1996; Haag et al., 1995; Maehama et al., 1995 und 1996; Rigby, 1996a; Moss, 1997). Ob im Rattenserum nachgewiesenes, zirkulierendes RT6 enzymatische Aktivität besitzt, konnte noch nicht geklärt werden. Rekombinantes Maus *Rt6-1* und *Rt6-2* sind typische ARTs mit der Fähigkeit ADPR-Gruppen

auf exogene Akzeptor-Proteine wie Agmatin zu übertragen (Rigby et al., 1996a, Moss et al., 1997; Koch-Nolte et al., 1996). Rt6-2 besitzt zudem NAD-Glykohydrolase-Aktivität, die aber wesentlich schwächer als seine mADPRT-Aktivität ist (Koch-Nolte et al., 1996). Die in Position 207 lokalisierte Aminosäure scheint einen signifikanten Einfluß auf die enzymatische Aktivität zu haben: Ratten-RT6.1 und RT6.2 besitzen an dieser Stelle Glutamin, die Maus-RT6-Enzyme hingegen Glutamat. Der Austausch von Glutamat gegen Glutamin in der Rt6-Sequenz hatte den Verlust der mADPRT-Aktivität des Enzyms unter Beibehaltung der Glykohydrolase-Aktivität zur Folge (Hara et al., 1996). Umgekehrt führte der Austausch von Glutamin gegen Glutamat zu der Synthese eines Ratten-RT6.1-Proteins, das Agmatin und Argininreste ADP-ribosylieren kann, aber reduzierte NADase-Aktivität besitzt (Maehama et al., 1996; Hara et al., 1996).

Die Funktion der enzymatischen Aktivität von RT6 im Hinblick auf seine Expression auf T-Lymphozyten und NK-Zellen ist bislang unbekannt. Die Tatsache, daß der Verlust der RT6-positiven T-Zell-Population in verschiedenen Tiermodellen mit einer erhöhten Suszeptibilität für Autoimmunerkrankungen einhergeht, deutet jedoch auf eine immunregulatorische Funktion von RT6 hin. Im (DP, „diabetes prone“-)BB-Ratten-Modell des insulin-abhängigen Diabetes mellitus (IDDM), in welchem DP-Ratten spontan autoimmune IDDM und Thyroiditis entwickeln, scheint eine Population von RT6-positiven T-Zellen über einen bislang unbekanntem Mechanismus eine protektive Rolle zu spielen. So vermittelt die An- bzw. Abwesenheit dieser RT6<sup>+</sup>-Zellen Resistenz bzw. Suszeptibilität gegenüber IDDM (Crisa et al., 1992). Hierbei scheinen die ebenfalls für dieses Tiermodell typische Lymphopenie und die stark reduzierte Anzahl RT6<sup>+</sup>-T-Zellen nicht auf einen *RT6*-Gen-Defekt, sondern vielmehr auf die homozygote Expression eines Gen unbekannter Funktion auf Chromosom 4 zurückzugehen. Die immunregulatorische Funktion der RT6<sup>+</sup>-T-Zellen ist nicht an den BB-Rattenstamm gebunden, sondern kann auch im BN-Ratten-Modell der Quecksilberinduzierten Glomerulonephritis beobachtet werden, wo die Krankheits-auslösenden Injektionen von HgCl<sub>2</sub> zu einer signifikanten Reduktion der RT6<sup>+</sup>-T-Zell-Population führen (Kosuda et al., 1991).

## 1.4 mono-ADP-Ribosylierung

Wie die Phosphorylierung stellt die mono-ADP-Ribosylierung von Proteinen eine reversible, posttranslationale Modifikation dar, über die zentrale zelluläre Funktionen reguliert werden können. Sie wurde ursprünglich als Mechanismus entdeckt, über den eine Gruppe bakterieller Toxine (z.B. Diphtherie-, Pertussis-, und Cholera-Toxin) in die Signaltransduktion und die Proteinsynthese ihres Wirts eingreift (z.B.: Honjo et al., 1968).

Eukaryontische mADPRT wurden in verschiedenen Geweben unterschiedlicher Spezies nachgewiesen. Interessanterweise handelt es sich bei allen bislang klonierten eukaryontischen argininspezifischen mADPRT um GPI-verankerte oder sekretorische Enzyme. Über ihre enzymatische Aktivität scheinen diese Moleküle unter anderem an der Regulation von Zell-Zell-Interaktionen, Signaltransduktionswegen, der Architektur des Zytoskeletts, sowie des vesikulären Transportes beteiligt zu sein. Verschiedene Zielproteine für endogene ADP-Ribosylierungen (z.B. LFA-1, CD8, Ca<sup>2+</sup>-ATPase, Aktin, rho, G-Proteine, G3PDH, Desmin, B-50/GAP-43) wurden bereits identifiziert (Zolkiewska et al., 1993; Wang et al., 1996; Maehama et al., 1991; Taniguchi et al., 1993; Huang et al., 1993; Quist et al., 1994). Über den Zusatz des Substrates von mADPRT, NAD<sup>+</sup>, oder bekannter Inhibitoren der mADPRT kann die Aktivität verschiedener Zelltypen (Muskelzellen, Neuronen, aktivierte CTL) moduliert werden (Kharadia et al., 1992; Schuman et al., 1994; Wang et al., 1996).

Durch Homologievergleiche mit der zuerst entdeckten mADPRT (RABNAART, ART1) wurden weitere Mitglieder (ART2 bis ART5) der Genfamilie der endogenen mADPRT in Maus, Ratte und Kaninchen identifiziert und kloniert (Zolkiewska et al., 1992; Takada et al., 1994; Koch-Nolte und Haag, 1997, Koch-Nolte et al., 1997). Da auch in humanen Geweben verschiedene Mitglieder der mADPRT-Familie nachgewiesen werden konnten (Levy et al., 1996; Donnelly et al., 1996; Koch-Nolte et al., 1997) wird angenommen, daß die Funktion von RT6 beim Menschen von verwandten mADPRT übernommen wird.

Das zu der Familie der mADPRT gehörende, GPI-verankerte Ektoenzym ART-1 wird unter anderem auf CTL der Maus exprimiert und reguliert dort zentrale Zellfunktionen wie Zytotoxizität, Proliferation und die Adhäsion von Zielzellen durch ADP-Ribosylierung verschiedener Korezeptoren des TCR (Wang et al., 1996; Nemoto et al., 1996a, Liu und Dennert, 1999). Die *in vitro*-Inkubation der Zellen mit NAD<sup>+</sup> führt zu der Dämpfung ihrer Effektor-Funktionen (Wang et al., 1994; Okamoto et al., 1998). Die inhibitorische Wirkung von NAD<sup>+</sup> läßt sich unter anderem auf die ADP-Ribosylierung eines die Aktivität der Tyrosinkinase p56<sup>lck</sup> regulierenden Proteins (p40) zurückführen, das nach seiner Modifikation die CD8-vermittelte Signalweiterleitung inhibiert (Wang et al., 1996).

Die enzymatische Aktivität von mADPRT wird unter anderem durch Auto-Ribosylierung in Abhängigkeit von der  $\text{NAD}^+$ -Konzentration reguliert. Für ART5 konnte gezeigt werden, daß bei relativ hohen  $\text{NAD}^+$ -Konzentrationen (1 mM) seine Glykohydrolase-Aktivität infolge Auto-Ribosylierung abnimmt, während begleitend die Transferase-Aktivität steigt (Weng et al., 1999). Bei niedrigeren  $\text{NAD}^+$ -Konzentrationen (10  $\mu\text{M}$ ) überwiegt die NADase-Aktivität.

## 1.5 Problemstellung

Das GPI-verankerte Membranmolekül RT6 ist ein zu der Familie der mono-ADP-Ribosyltransferasen gehörendes Ektoenzym, dessen Funktion bislang unbekannt ist. Die Basis für die vorliegende Arbeit bildet die relativ neue Entdeckung, daß RT6 auf NK-Zellen der Ratte exprimiert wird und seine Expression in Abhängigkeit von dem Aktivierungszustand der Zellen reguliert zu werden scheint (Wonigeit et al., 1997). In den letzten Jahren wurde gezeigt, daß die Aktivität von NK-Zellen durch das Zusammenspiel aktivierender und inhibierender Rezeptoren gesteuert wird (Übersicht in: Lanier, 2000). Die Charakterisierung der beteiligten Rezeptoren und der Mechanismen ihrer Signalübertragung ist Voraussetzung für ein detailliertes Verständnis dieses Zusammenspiels und der Funktion von NK-Zellen bei der Abwehr von Infektionen und der Bekämpfung von Tumorzellen.

Diese Arbeit untersucht die Frage, ob und wie das RT6-Molekül an der Regulation der NK-Effektor-Funktionen beteiligt ist. Die Signalkapazitäten und die enzymatische Aktivität von RT6 wurden in diesem Zusammenhang als zwei unterschiedliche Aspekte seiner Funktion analysiert. Der größte Teil der Experimente wurde mit zwei in der Arbeitsgruppe etablierten NK-Zell-Linien des Rattenstammes LEW und der NK-Leukämie-Linie RNK-16 (F344, Axberg et al., 1988) durchgeführt. In viele Untersuchungen wurden zudem aus Milz (LEW) isolierte NK-Zellen einbezogen.

### I. RT6 und Signaltransduktion bei NK-Zellen

Viele GPI-verankerte Membranmoleküle haben die Fähigkeit zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege, obwohl sie weder zytoplasmatische, noch transmembranöse Domänen besitzen. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind bislang unbekannt. Auch auf T-Lymphozyten exprimiertes RT6 scheint die Fähigkeit zur Signaltransduktion zu besitzen, da polyklonale Antiseren *in vitro* eine gesteigerte Proliferation der Zellen auslösen (Wonigeit und Schwinzer, 1987). Mit monoklonalen Antikörpern konnte gezeigt werden, daß die Kreuzvernetzung von RT6 auf T-Zellen in Gegenwart von IL-2 bzw. Phorbol ester zudem zu der verstärkten

Expression des hoch affinen IL-2-Rezeptors führt. Die Kopräzipitation von RT6 mit fünf tyrosinphosphorylierten Proteinen, von denen zwei Mitglieder der *src*-Tyrosinkinase-Familie sind (p69<sup>fyn</sup> und p56<sup>lck</sup>), deutet auf eine Assoziation *in vivo* und den möglichen Mechanismus der Signalübertragung in T-Zellen hin (Rigby et al., 1996b). Diese Befunde legen nahe, daß RT6 neben seiner enzymatischen Aktivität eine Rezeptor-Funktion besitzt und über diese an molekularen Ereignissen beteiligt ist, die zu der Aktivierung von T-Zellen führen. Der hypothetische natürliche Ligand von RT6 konnte bislang nicht identifiziert werden.

Ein Modellsystem, in dem die Bindung des natürlichen Liganden an das betrachtete Protein imitiert werden kann, stellt die Inkubation von Zellen mit Antikörpern dar, die gegen die zu untersuchenden Oberflächenmoleküle gerichtet sind. Auf diesem Wege können aus der hypothetischen Ligandenbindung resultierende, zelluläre Ereignisse untersucht werden. Die hier eingesetzten NK-Zell-Linien stellen für derartige Experimente ein besonders geeignetes System dar. Anhand des Modellsystems der antikörpervermittelten Kreuzvernetzung wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen zu der hypothetischen Rezeptor-Funktion von RT6 bearbeitet:

1. Können nach Kreuzvernetzung von RT6 auf NK-Zellen frühe Signaltransduktions-Ereignisse beobachtet werden?

In diesem Zusammenhang wurde untersucht, ob die RT6-Kreuzvernetzung Proteintyrosinphosphorylierungen oder eine Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration induzieren kann.

2. Ist RT6 in der Lage, Signale zu übermitteln, die Zellfunktionen modulieren?

Ein Aspekt dieser Fragestellung war, ob durch RT6 eher aktivierende oder inhibierende Signale vermittelt werden. Die Induktion der  $\alpha$ -Untereinheit des IL-2-Rezeptors (CD25), die zur Ausbildung des hoch affinen IL-2-Rezeptor-Komplexes (IL-2R $\alpha\beta\gamma$ ) auf der Zelloberfläche führt, ist ein zuverlässiger Marker für zelluläre Aktivierung. Vor diesem Hintergrund wurde der Einfluß der RT6-Kreuzvernetzung auf die Expression der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit des IL-2-Rezeptors analysiert. In diesem Zusammenhang wurde auch der Frage nachgegangen, welchen Effekt die RT6-Kreuzvernetzung auf die proliferative Aktivität der Zellen hat.

Eine wichtige Funktion von NK-Zellen ist die Produktion von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , die daher nach Kreuzvernetzung von RT6 auf mRNA- und Proteinebene untersucht wurde.



Die im Mittelpunkt der Untersuchungen stehenden NK-Linien hatten im Verlauf der Langzeit-Kultivierung ihre initial vorhandene zytotoxische Aktivität verloren; somit konnte der Einfluß der RT6-Kreuzvernetzung auf diese NK-Zell-Funktion nicht bearbeitet werden.

**3. Wird in Folge der Kreuzvernetzung von RT6 seine Expressionsdichte moduliert?**

Begleitend wurde die Frage bearbeitet, ob die Modulation der RT6-Expression durch enzymatische Abspaltung des Moleküls von der Zelloberfläche oder durch Internalisierung stattfindet.

**II. Enzymatische Funktion von RT6**

Eukaryontische mono-ADP-Ribosyltransferasen sind an der Regulation zentraler zellulärer Funktionen, wie z.B. der Effektor-Aktivitäten zytotoxischer T-Lymphozyten (Wang et al., 1996), beteiligt. Vor diesem Hintergrund wurde der Frage nachgegangen, ob über die enzymatische Aktivität von RT6 NK-Zell-Funktionen moduliert werden. Einen indirekten Zugang bildete die Untersuchung der Effekte, die der Zusatz von NAD<sup>+</sup>, dem Substrat von RT6, auf die Zytokin-Expression, das proliferative Verhalten, und den Oberflächenphänotyp der betrachteten NK-Linien hat.

## 2 Materialien

### 2.1 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid, N, N'-Methylenbisacrylamid:	Serva, Heidelberg
AEBSF:	Sigma, Deisenhofen
Agarose:	Gibco, Eggenheim
$\epsilon$ -Aminocaprinsäure:	Merck, Darmstadt
Aprotinin:	Sigma, Deisenhofen
Bathophenanthrolin:	Sigma, Deisenhofen
BCIP:	Biomol, Hamburg
BSA:	Serva, Heidelberg
Bradford-Reagenz:	Bio-Rad, München
Brefeldin A:	Sigma, Deisenhofen
Dulbecco, DMEM:	GibcoBRL, Eggenheim
Bromphenolblau:	Sigma, Deisenhofen
Coomassie-Brillant-Blau R-250:	Serva, Heidelberg
DMSO:	Merck, Darmstadt
DNA-Leiter (1kb)	GibcoBRL, Eggenheim
dNTP:	Promega, Madison, WI, USA
DTT:	Sigma, Deisenhofen
E-64:	Sigma, Deisenhofen
ECL-Kit:	Pierce, Rockford, IL, USA
EDTA:	Merck, Darmstadt
ELISA-Assays, Ratten-IFN- $\gamma$ und TNF- $\alpha$ :	Biosource, Camarillo, CA, USA
FCS:	Sigma, Deisenhofen
Fluo-3/AM:	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
D-Glucose:	Merck, Darmstadt
L-Glutamin:	Seromed, Berlin
Glycerin:	Merck, Darmstadt
Glycin:	Biomol, Hamburg
Guanidiniumthiocyanat:	ICN, Meckenheim
Hämalaun:	Merck, Darmstadt
HEPES:	Serva, Heidelberg
Intraglobin:	Serapharm, Münster
Iodacetamid:	Sigma, Deisenhofen
Ionomycin:	Sigma, Deisenhofen
Isotypisierung-Assay für monoklonale Ratten-Antikörper:	Serotech/Camon, Wiesbaden
Leupeptin:	Sigma, Deisenhofen
Luminol:	Pierce, Rockford, IL, USA
2-Mercaptoethanol:	Merck, Darmstadt
<u>Molekulargewichtsstandards:</u>	
vorgefärbter Protein-Leiter (BenchMark)	GibcoBRL, Eggenheim
Leiter für ECL (RPN 2107)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
[ $^{14}$ C]methylierte Proteine (CFA626)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Milchpulver:	Bio-Rad, München

NBT:	Sigma, Deisenhofen
Nitrozellulose (BA85)	Schleicher und Schüll, Dassel
normales Maus Serum:	Dianova, Hamburg
NP-40:	Sigma, Deisenhofen
PBS Dulbecco:	Biochrom, Berlin
Pd(N) <sub>6</sub> :	Pharmacia, Freiburg
Penicillin/Streptomycin:	Seromed, Berlin
Pepstatin:	Sigma, Deisenhofen
1,10-Phenanthrolin:	Sigma, Deisenhofen
Phenol, p.a.:	Merck, Darmstadt
PMA:	Sigma, Deisenhofen
PMS:	Sigma, Deisenhofen
PMSF:	Sigma, Deisenhofen
Ponceau S Konzentrat:	Sigma, Deisenhofen
Protease-Inhibitor-Coctail:	Sigma, Deisenhofen
Protein-G-Sepharose Fast Flow:	Pharmacia, Freiburg
Reverse Transkriptase (MMLV):	Stratagene, La Jolla, CA, USA
RNeasy RNA-Isolationskit:	Qiagen, Chatworth, CA, USA
RPMI 1640:	GibcoBRL, Eggenheim
Saponin:	Sigma, Deisenhofen
SDS:	Serva, Heidelberg
Streptavidin, Merrettich-Peroxidase-konjugiert	Pierce, Rockford, IL, USA
Streptavidin, PE-konjugiert:	Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA
Streptavidin, TC-konjugiert:	Caltag, Burlingame, CA, USA
Szintillatorflüssigkeit(Beta Plate Scint):	LKB Wallac, Turku, Finnland
Taq-Polymerase:	Qiagen, Chatworth, CA, USA
TC 199:	Flow, Meckenheim
TEMED:	Sigma, Deisenhofen
Tris:	Merck, Darmstadt
Trypanblau:	Sigma, Deisenhofen
Tween <sup>®</sup> 20:	Merck, Darmstadt
Xylencyanol:	Sigma, Deisenhofen
<u>Radioisotope:</u>	
<sup>35</sup> S-Cystein/ <sup>35</sup> S-Methionin:	Tran <sup>35</sup> S-Label <sup>™</sup> , ICN, Irvine, CA., USA
<sup>3</sup> H-Methyl-Thymidin:	NEN, Dreieich

## 2.2 Verbrauchsmaterial

Filterpapier für Westernblot:	Schleicher und Schüll
FACS-Röhrchen:	Falcon/Becton-Dickinson, NJ, USA
Glasgewinderöhrchen:	Serolab, Aidenbach
Kulturschalen (90mm):	Nunc, Roskilde, Dänemark
Injektionsspritzen (10 ml):	Sherwood, Eschborn
Mirotiterplatten, 96 Loch:	Nunc, Roskilde, Dänemark
Multischalen, 6 Loch:	Mirotiterplatten, 96 Loch
Pipettenspitzen, mit und ohne Filter	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (PCR), 0,2 ml	Eppendorf, Hamburg

Reaktionsgefäße (1,5ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilme	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Sterilfilter (Minisart)	Sartorius, Göttingen
Szintillationsfiltermatten	Berthold, Bad Wildbach
Zentrifugenröhrchen, 15 ml, 50 ml	Falcon, Heidelberg
Zellkulturflaschen, 50 ml, 250 ml	Falcon, Heidelberg

## 2.3 Geräte

Brutschrank (Cytoperm)	Hereus, Hanau
EIA-Plattenlesegerät (MR 7000)	Dynatech, Plochingen
Elektrophoresekammer (Mini-Protean II)	Bio-Rad, München
Elektrophoresekammer (Horizon 5):	BRL, Gaithersburg
Filmentwickler	Protec, Deutschland
Flüssigkeits-Szintillations-Meßgerät (1205 Betaplate):	LKB Wallac, Turku, Finnland
Durchflußzytometer (FACScan):	Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA
Geltrockner (Modell 583):	Bio-Rad, München
Heizofen:	Memmert, Bezug über Jürgens, Hannover
Horizontal-Schüttler	GFL, Burgwedel
Kühlfalle (Typ KF):	Bachhofer, Bezug über Jürgens, Hannover
Netzgerät (EPS 500/400):	Pharmacia, Freiburg
Rotationsmischgerät (REAX 2):	Heidolph, Bezug über Jürgens, Hannover
Spektralphotometer (Ultrospec II):	Pharmacia, Freiburg
Sofortbildkamera (MP4):	Polaroid, Cambridge, England
Standardchromatographie-Anlage:	Pharmacia, Freiburg
Thermocycler (GeneAmp 9600)	Perkin-Elmer
Thermostat:	Eppendorf, Hamburg
UV-Transilluminator (302 nm):	Bachhofer, Bezug über Jürgens, Hannover
Videodokumentation (Eagle Eye)	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Western-Blot-Apparatur (Multiphor II):	Pharmacia, Freiburg
Quarzküvetten:	Helma, Bezug über Jürgens, Hannover
Analysenwaage, Feinwaage	GFL, Burgwedel
Zellerntegerät:	Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden
<u>Zentrifugen:</u>	
Kühlzentrifuge RC5C	Sorvall, Newton, IL, USA
Biofuge 15	Heraeus, Hanau
Cryofuge 6-4S	Heraeus, Hanau
Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
Minifuge GL	Heraeus, Hanau
Varifuge 3.2RS	Heraeus, Hanau

## 2.4 Primer und Kompetitorfragmente

Die folgenden Primersequenzen wurden entnommen aus: Siegling et al. (1994).

### **IFN- $\gamma$ :**

sense: 5'-CCCTCTCTGGCTGTTACTGC-3'

antisense: 5'-CTGCTTTTCCGCTTCCTTAG-3'

Die Länge der Amplifikationsprodukte beträgt 419 bp (Proben cDNA) bzw. 319 bp (Kontrollfragment).

### **TNF- $\alpha$ :**

sense: 5'-CGAGTGACAAGCCCGTAGCC-3'

antisense: 5'-GGATGAACACAGTCGCC-3'

Die Länge der Amplifikationsprodukte beträgt 468 bp (Proben cDNA) bzw. 339 bp (Kontrollfragment).

### **IL-4:**

sense: 5'-ATGCACCGAGATGTTTGTACC-3'

antisense: 5'-TTTCAGTGTTTCTGAGCGTGGA-3'

Die Länge der Amplifikationsprodukte beträgt 275 bp (Proben cDNA) bzw. 178 bp (Kontrollfragment).

### **IL-10:**

sense: 5'-TGCCTTCAGTCAAGTGAAGACT-3'

antisense: 5'-AAACTCATTCATGGCCTTGTA-3'

Die Länge der Amplifikationsprodukte beträgt 346 bp (Proben cDNA) bzw. 421 bp (Kontrollfragment).

### **IL-1 $\beta$ :**

sense: 5'-CCAGGATGAGGACCCAAGCA-3'

antisense: 5'-TCCCGACCATTGCTGTTTCC-3'

Die Länge der Amplifikationsprodukte beträgt 519 bp (Proben cDNA) bzw. 379 bp (Kontrollfragment).

### **CD25:**

sense: 5'-TGGGGAGATAAGGTGGACGC-3'

antisense: 5'-GAAAGGAGACAGGCACCCGT-3'

Die Länge der Amplifikationsprodukte beträgt 406 bp (Proben cDNA) bzw. 319 bp (Kontrollfragment).

Die verwendeten GAPDH-Primer sind kommerziell erhältlich (MWG-Biotech).

**GAPDH:**

sense: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'

antisense: 5'-TCCACCACCCTGTTGCGTTA-3'

Die Länge der Amplifikationsprodukte beträgt 452 bp (Proben cDNA) bzw. 382 bp (Kontrollfragment).

**Monokompetitorfragmente:**

Die heterologen GAPDH-Monokompetitorfragmente (MIMIC) wurden in der Abteilung für klinische Biochemie der MHH synthetisiert und für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Konstruktion erfolgte nach einer modifizierten Technik von Siebert et al. (1992).

Das im Rahmen der kompetitiven RT-PCR-Analyse der IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10, IL-1 $\beta$  und CD25-mRNA-Expression verwendete multispezifische Kontrollfragment wurde speziell für das Rattensystem entwickelt (Siegling et al., 1994).

## **2.5 Antikörper und Hybridome**

Das Hybridom **3G2**, das einen monoklonalen Antikörper gegen die serologische Determinante RT6.1 bildet, wurde in der Arbeitsgruppe durch Immunisierung von LEW.6B-Ratten (synonym LEW.Ly-2.2, Wonigeit, 1979a; Wonigeit, 1979b) mit Milz- und Lymphknotenzellen des Rattenstammes LEW (*RT6<sup>d</sup>*) hergestellt (Fangmann et al., 1993).

Folgende Hybridome wurden freundlicherweise der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt:

**GY1/12 (anti-RT6.2)**: Dr. G. Butcher, Cambridge, UK

**3.2.3 (anti-NKR-P1)**: Dr. W. H. Chambers, Pittsburgh, USA

**R-73 (anti-TCRa/b), L-316 (anti-CD122)**: Prof. T. Hünig, Würzburg

**OX8 (anti-CD8 $\alpha$ )**: Prof. A. F. Williams, Oxford, UK

Eine Zusammenstellung der verwendeten Antikörper ist in der nachfolgenden Tabelle gezeigt.

Antikörper/ Modifikation	Herkunft (Spezies)	Klon/ Modifikation	Ig- Subklasse	Bezugsquelle
anti-CD2	Maus	OX34	IgG2a	Pharmingen/BD, Hamburg
anti-CD3	Maus	G-418	IgG1	Pharmingen/BD, Hamburg
anti-CD8- $\alpha$	Maus	OX8	IgG1	Hybridom-Kulturüberstand
anti-CD11a	Maus	WT1	IgG2a	Pharmingen/BD, Hamburg
anti-CD18	Maus	WT3	IgG2a	Pharmingen/BD, Hamburg
anti-CD25	Maus	OX39	IgG1	Serotech, Oxford, UK
anti-CD25o	Maus	OX39-bio	IgG1	Serotech, Oxford, UK
anti-CD28	Maus	JJ319	IgG2a	Serotech, Oxford, UK
anti-CD43	Maus	W3/13	IgG1	Serotech, Oxford, UK
anti-CD44	Maus	OX49	IgG2a	Pharmingen/BD, Hamburg
anti-CD122	Maus	L-316	n.b.	Hybridom-Kulturüberstand
anti-ICAM-1	Maus	1A29	IgG1	Pharmingen/BD, Hamburg
anti-IFN- $\gamma$	Maus	DB-1	IgG1	Biosource, Fleurus, Belgien
anti-NKR-P1	Maus	3.2.3	IgG1 $\kappa$	Hybridom-Kulturüberstand
anti-NKR-P1	Maus	3.2.3/bio	IgG1 $\kappa$	Hybridom-Kulturüberstand
anti-RT6.1	Ratte	3G2	IgG1	Hybridom-Kulturüberstand
anti-RT6.2	Ratte	GY1/12	IgG2c	Hybridom-Kulturüberstand
anti-TCR $\alpha/\beta$	Maus	R73	n.b.	Hybridom-Kulturüberstand
anti- Phosphotyrosin	Maus	4G10/bio	IgG2b $\kappa$	Biomol, Hamburg
Ziege-anti-Maus	Ziege	polyklonal		Coulter-Immunotech, Hamburg
Ziege-anti- Maus/FITC	Ziege	polyklonal		Dianova, Hamburg
Ziege-anti- Maus/PE	Ziege	polyklonal		DAKO, Glostrup, Dänemark
Ziege-anti-Ratte	Ziege	polyklonal		Dianova, Hamburg
Ziege-anti- Ratte/FITC	Ziege	polyklonal		Dianova, Hamburg
Ziege-anti- Ratte/Peroxidase	Ziege	polyklonal		Dianova, Hamburg
anti-Ratte-IgG1, IgG2a,b,c,  IgGM	Maus	RG11/39.4 RG7/1.30 RG7/11.1 A92-1 G53-238	IgG2b IgG2b IgG2b IgG1 $\kappa$ IgG1	Pharmingen/BD, Hamburg
Maus-IgG1, $\kappa$ Isotyp- Standard	Maus	ME139	IgG1	Biosource, Fleurus, Belgien
Ratten-IgG1, $\kappa$ Isotyp- Standard	Ratte	R3-34	IgG1 $\kappa$	Pharmingen, San Diego, CA, USA
Ratten-IgG2c, $\kappa$ Isotyp- Standard	Ratte	A23-1	IgG2c	Pharmingen, San Diego, CA, USA

## **3 Methoden**

### **3.1 Zellkultur**

#### **3.1.1 Kultur- und Inkubationsbedingungen**

Die Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten NK-Linien und frisch isolierter NK- und T-Zellen, sowie die meisten Stimulationsexperimente wurden im Brutschrank bei 37°C, 10% CO<sub>2</sub>-Partialdruck und gesättigter Wasserdampfatmosphäre durchgeführt. Die zur Gewinnung monoklonaler Antikörper benötigten B-Zellhybridome wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Partialdruck und gesättigter Wasserdampfatmosphäre kultiviert.

#### **3.1.2 Medien**

Als Standardkulturmedium für die Kultivierung der NK-Zellen wurde DMEM, supplementiert mit FCS (10%), Natriumpyruvat (1 mM), L-Glutamin (584,8 mg/l), 2-Mercaptoethanol ( $5 \times 10^{-5}$  M), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 U/ml) verwendet. Das FCS wurde vor Gebrauch 30 min bei 56°C hitzedenaturiert. Zum kurzfristigen Aufbewahren von Zellen oder Waschen von Zellen wurde Hepes-gepuffertes TC199, pH 7,3 und Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,2 verwendet.

#### **3.1.3 B-Zellhybridome**

B-Zellhybridome wurden in RPMI 1640, supplementiert mit 5% FCS, L-Glutamin (584,8 mg/l), 2-Mercaptoethanol ( $5 \times 10^{-5}$  M), Penicillin (100 mM) und Streptomycin (100 mM) liegend in 250 ml Kulturflaschen kultiviert. Die optimale Zelldichte betrug  $0,5-1 \times 10^6$  Z/ml.

#### **3.1.4 IL-2-abhängige NK-Zelllinien**

Die in der Arbeit eingesetzten NK-Linien 3075 und 3651 wurden in der Arbeitsgruppe durch kontinuierliche Stimulation von Milz-NK-Zellen des Ratten-Inzuchtstammes LEW etabliert. Die Kultivierung dieser IL-2-abhängigen NK-Linien erfolgte in stehenden 50 ml Kulturflaschen mit 10 ml Kulturmedium, das mit 1,5–2% IL-2-haltigem CHO-



Kulturüberstand versetzt war. Die optimale CHO-IL-2-Konzentration wurde durch Bestimmung der maximalen Proliferation der Zellen (siehe 3.10) ermittelt. Die optimale Zelldichte betrug  $0,5-1 \times 10^6$  Z/ml. Alle 2-3 Tage wurden etwa 7 ml der Zellsuspension passagiert.

### **3.1.5 NK-Zelllinie RNK-16**

Die NK-Tumor-Zelllinie RNK-16 (Axberg et al., 1988) wurde unserer Arbeitsgruppe von Herrn Prof. B. Rolstad, Oslo, zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung dieser Linie erfolgte in Standardkulturmedium, jedoch ohne Zusatz von IL-2. Die optimale Zelldichte betrug  $0,25-0,5 \times 10^6$  Z/ml. Alle 2-3 Tage wurden etwa 7 ml der Zellsuspension passagiert.

### **3.1.6 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität**

Von den Zellsuspensionen wurden Aliquots abgenommen, mit einer Trypanblau-Lösung (0,16% Trypanblau in 0,9% NaCl) gemischt und die Zelldichte anhand einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Tote bzw. geschädigte Zellen erschienen aufgrund der Diffusion des Farbstoffes in das Zellinnere blau angefärbt. In den Experimenten wurden nur Zellsuspensionen verwendet, deren Vitalität  $\geq 95\%$  war.

### **3.1.7 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zum Einfrieren wurden Aliquots von  $1 \times 10^7$  Zellen in 1 ml eiskaltem Einfriermedium (Kulturmedium mit 10% DMSO und 20% FCS) aufgenommen und in Glasgewinderöhrchen überführt. Die Aliquots wurden zunächst in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Dewar-Gefäß 4 h im Stickstoffdampf tiefgefroren und danach bei  $-195^\circ\text{C}$  in flüssigem Stickstoff gelagert. Das als Gefrierschutzsubstanz zugesetzte DMSO hatte die Funktion, den Wassergehalt der Zellen zu reduzieren und so die Lyse der Zellen durch Bildung von Eiskristallen zu verhindern. Das Auftauen der Zellsuspensionen erfolgte zügig unter Schwenken des Röhrchens in einem  $37^\circ\text{C}$  warmen Wasserbad. Die aufgetaute Zellsuspension wurde sofort tropfenweise zu 10 ml eiskaltem Auftaumedium (TC199 mit 20% FCS) gegeben. Die Zellen wurden abzentrifugiert (10 min.,  $200 \times g$ ) und, um das zytotoxische DMSO zu entfernen, zweimal mit TC199 gewaschen. Das Zellpellet wurde in Kulturmedium resuspendiert und die Zellen im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  kultiviert.

### 3.2 Gewinnung monoklonaler Antikörper aus B-Zellhybridoma

Zur Gewinnung größerer Mengen an Antikörpern wurden Aliquots der entsprechenden B-Zellhybridome ( $5 \times 10^6$  Zellen) aufgetaut, 2 mal mit TC199 gewaschen, in 40 ml Kulturmedium aufgenommen und liegend in einer 250 ml Zellkulturflasche über mehrere Wochen kultiviert. Nach Umschlag des Mediumindikators wurden die Kulturüberstände abgenommen, abzentrifugiert (10 min., 400xg), vereinigt und bis zur weiteren Aufarbeitung bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Die Spezifität des im Kulturüberstand enthaltenen Antikörpers wurde durchflußzytometrisch (siehe 3.8) überprüft. Die für durchflußzytometrische Analysen bestimmten Antikörper wurden gegebenenfalls weiter aufkonzentriert.

### 3.3 Aufreinigung monoklonaler Antikörper

Die für Stimulationsexperimente benötigten monoklonalen Antikörper wurden aus Kulturüberständen der entsprechenden B-Zellhybridome weiter aufgereinigt und aufkonzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch präparative Affinitätschromatographie anhand einer Standard-Chromatographie-Anlage (Pharmacia) im Kühlraum bei  $4^\circ\text{C}$ . Die Säule ( $\varnothing$  1 cm, Matrixvolumen 5 ml) wurde mit Protein G, das an Sepharose 4 Fast Flow gekoppelt vorlag, gefüllt. Antikörper verschiedener Spezies, darunter auch Ratten- und Maus-IgG, werden von Protein G (aus Streptococcus, Gruppe G) über ihren Fc-Teil gebunden. Nach Äquilibrieren der Säule mit 5 Säulenvolumina 20 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,0 wurde der mit  $0,2 \mu\text{m}$  Porenweite sterilfiltrierte, auf pH 6,7 angesäuerte Kulturüberstand mittels einer Peristaltikpumpe auf die Säule aufgegeben (Flußrate: 1-2 ml/min). Ungebundene, die Säule wieder verlassende Proteine wurden anhand ihrer Absorption bei 280 nm detektiert. Im Anschluß wurde die Säule mit ca. 50 ml Natriumphosphat-Puffer gespült, um das gesamte ungebundene Protein zu entfernen. Die Elution des spezifisch gebundenen Antikörpers erfolgte mit einer 0,1 M Glycin-HCl-Lösung, pH 2,7 bei einer Flußrate von 1 ml/min. Das Eluat wurde in 1 ml Fraktionen aufgefangen, wobei in den Röhrchen zum Abpuffern des sauren Elutionspuffers  $50 \mu\text{l}$  1 M Tris-HCl, pH 9,0 vorgelegt worden waren. Anhand des photometrisch aufgezeichneten Elutionsprofils (Absorption bei 280 nm) wurden die proteinhaltigen Fraktionen vereinigt und anschließend zur Erniedrigung der Salzkonzentration gegen PBS dialysiert. Der Proteingehalt der Lösung wurde photometrisch bestimmt (siehe 3.4) und die Bindungsspezifität erneut mittels Durchflußzytometrie überprüft. Das aliquotierte Antikörperkonzentrat wurde bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Die Säule

wurde durch Waschen mit 5 Säulenvolumina 2 M Harnstoff, pH 7,0; 0,1 M Tris-HCl, pH 9,0; 0,1 M Glycin-HCl, pH 2,5; 0,5 M NaCl und 20 mM Natriumphosphat, pH 7,0 regeneriert und in 20% (v/v) Ethanol aufbewahrt.

### **3.4 Proteinbestimmung**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte in Mikrotiterplatten mit dem Bio-Rad-Protein-Assay in Anlehnung an die von Bradford entwickelte Methode (Bradford, 1976). Die Methode basiert auf der Bildung eines aus dem Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 und freien Aminogruppen von Proteinen bestehenden Komplexes. In saurem Milieu kommt es als Folge der Komplexbildung zu einem Farbumschlag von braun nach blau, bzw. zu einer meßbaren Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm. Die Gebrauchslösung des Farbstoffes wurde vor jedem Test frisch angesetzt, hierzu wurde die Stammlösung im Verhältnis 1:2,5 mit Wasser verdünnt. 0,1 ml Probenlösung unbekannter Proteinkonzentration wurden jeweils in Doppelansätzen mit 0,1 ml Farbstofflösung gemischt. Als Standardproteinlösung diente humanes Intraglobin, das zur Erstellung einer Standardkurve schrittweise in einem Konzentrationsbereich von 100 - 6,25 µg/ml verdünnt wurde. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT wurde die Extinktion bei 630 nm am ELISA-Plattenlesegerät gemessen und die Proteinkonzentration anhand der Standardkurve berechnet.

### **3.5 Isotypbestimmung von Antikörpern über Agglutination**

Die Bestimmung der Antikörper-Isotypen (Ratte) erfolgte zunächst über einen Assay der Firma Serotech. Das Prinzip des Tests, der in einer Mikrotiterplatte durchgeführt wird, basiert auf der Agglutination roter Blutkörperchen. Die spezifisch gegen einzelne Isotypen gerichteten Antikörper sind an rote Blutkörperchen (Schaf) gekoppelt. Die Erkennung und Bindung des jeweiligen Antikörper-Isotypen resultiert in einer deutlich sichtbaren Agglutination der Zellen. Nach Rekonstitution der Zellen mit Rekonstituierungs-Puffer wurden jeweils 30 µl des zu testenden Kulturüberstandes (1:100 verdünnt bei unbekannter Proteinkonzentration bzw. auf 1 µg Protein/ml verdünnt) in 8 Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gegeben. Anschließend wurden in jeweils eine Vertiefung 30 µl eines spezifischen Isotypisierungs-Reagenzes gegeben, die Platte mit Folie verschlossen und 6 sec auf einem Platten-Rüttler gemischt. Die Platte wurde 1 h auf Eis inkubiert, wobei Erschütterungen zu vermeiden sind. Die Auswertung erfolgte durch Vergleich der Proben mit

den mitgelieferten Positiv- und Negativ-Kontrollen. Da einige Antikörper anhand dieses Assays nicht eindeutig einer (Sub)-Klasse zugeordnet werden konnten, wurde der Isotyp zusätzlich durchflußzytometrisch bestimmt.

### **3.6 Immobilisierung monoklonaler Antikörper**

Eine Kreuzvernetzung von Oberflächenantigenen von Zellen kann unter anderem durch Inkubation der Zellen mit immobilisierten, gegen das entsprechende Antigen gerichteten Antikörpern erreicht werden. Die Immobilisierung kann durch Kopplung der Antikörper an verschiedene Matrizen erfolgen. Die in dieser Arbeit verwendete Immobilisierungs-Methode macht sich die unspezifische Bindung des Fc-Teils der Antikörper an Plastikmaterial zunutze. Zur Beschichtung der Plastikoberflächen wurden gegen PBS dialysierte und sterilfiltrierte (Ausschlußgrenze 0,2 µm) Antikörperlösungen (10 µg/ml) verwendet. Kulturschalen (Ø 90 mm) wurden mit 30 ml, 6-well-Mikrotiterplatten wurden je Vertiefung mit 5 ml und 96-well-Mikrotiterplatten mit jeweils 200 µl der Antikörperlösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Die beschichteten Schalen wurden zur Entfernung ungebundenen Antikörpers zweimal mit PBS und einmal mit PBS (1% FCS) vorsichtig gewaschen. Im Anschluß wurde sofort die Zellsuspension aufgegeben.

### **3.7 Isolierung von NK-Zellen aus Rattenmilz**

#### **3.7.1 Entnahme der Milz**

5-8 Wochen alte, vorzugsweise männliche Ratten wurden mittels Äther betäubt und durch Punktion des Herzens entblutet. Die Milzen wurden unter sterilen Bedingungen entnommen und sofort in eisgekühltes TC199 überführt.

#### **3.7.2 Lyse der Erythrozyten**

Alle Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Sofort nach der Entnahme wurden die Milzen in einem mit TC199 bedecktem Metallsieb in kleine Stücke zerschnitten. Die Gewebestückchen wurden mit dem Stempel einer Einmalspritze vorsichtig durch das Sieb gerieben. Die entstandene Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon-Rörchen überführt und einmal mit TC 199 gewaschen. Das Zellsediment wurde dann in eiskaltem Erythrozyten-

Lysereagenz (0,14 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 0,25 mM EDTA; 5 mM  $\text{KHCO}_3$ ; pH 7,5) resuspendiert, wobei je Milz 5 ml Lysereagenz eingesetzt wurden. Nach 3-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension mit einer Pasteurpipette FCS unterschichtet, sofort abzentrifugiert (10 min, 200 x g) und im Anschluß zweimal mit TC199 gewaschen. Vor dem zweiten Waschschrift wurde ein Aliquot von 10  $\mu\text{l}$  abgenommen und die Gesamtzellzahl der Suspension bestimmt. Ein Aliquot von ca.  $3 \times 10^6$  Zellen wurde bis zu der sich anschließenden durchflußzytometrischen Analyse bei 37°C kultiviert.

### **3.7.3 Depletion der B-Lymphozyten über Nylonwolle**

Das Zellsediment wurde in PBS (5 % FCS) resuspendiert und dabei auf eine Zelldichte von  $75 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Vor der Entnahme der Milzen waren je Milz zwei mit 0,7 g fein zerzupfter Nylonwolle gefüllte, als Säulen dienende 15 ml Spritzen ohne Stempel wie folgt vorbereitet worden. An den in einem Ständer fixierten Säulen wurden Drei-Wege-Hähne montiert. Jede Säule wurde mit 50 ml auf 37°C temperiertem PBS gespült, wobei ein Trockenlaufen der Säule vermieden wurde. Im Anschluß wurden 10 ml PBS (5% FCS, 37°C) so eingespült, daß auf der Säule ein Flüssigkeitsspiegel stand. Im Anschluß wurde 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert und dann jede Säule erneut mit 50 ml PBS (5% FCS, 37°C) gespült. Nach einer weiteren Inkubation der Säulen im Brutschrank (30 min, 37°C) mit jeweils 10 ml PBS (5% FCS, 37°C) konnte die Zellsuspension aufgegeben werden. Es wurden maximal  $150 \times 10^6$  Zellen (entsprechend maximal 2 ml der Zellsuspension) auf jede Säule aufgetragen. Die Zellen wurden mit 1,5 ml PBS (5% FCS) eingespült. Nach 45-minütiger Inkubation (30 min, 37°C) wurden die ungebundenen Zellen mit 50 ml PBS (37°C) eluiert, wobei das Eluat in einem 50 ml Falcon-Rörchen aufgefangen wurde. Die Zellen wurden abzentrifugiert (10 min, 200 x g), in TC199 resuspendiert, die einzelnen Fraktionen vereinigt und die Zellzahl bestimmt.

### **3.7.4 Depletion der T-Lymphozyten durch antikörpervermittelte Plastikadhäsion**

Die Depletion der T-Zellen erfolgte anhand der Panning-Technik (Schraven et. al., 1989). Hierbei werden nach Inkubation einer Zellsuspension mit Antikörpern gegen bestimmte Oberflächenmarker die antigenpositiven Zell-Populationen an eine mit Sekundärantikörper beschichtete Plastikschale gebunden. Die sedimentierte antigennegative Population kann

durch vorsichtiges Schwenken der Schale wieder resuspendiert und als Überstand abgenommen werden. Die Beschichtung der Kulturschalen mit Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus-Ig, G $\alpha$ M) erfolgte wie unter 3.6 beschrieben. Die Ausgangs-Zellsuspension wurde mit sättigenden Konzentrationen des mAK R73 (anti-TCR  $\alpha/\beta$ ) für 30 min. auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit PBS (5% FCS) auf eine Zelldichte von  $10 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. In den mit G $\alpha$ M beschichteten Schalen wurden 10 ml PBS (5% FCS) vorgelegt, in jede Schale maximal  $20 \times 10^6$  Zellen gegeben und dann 2 h bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubationsphase wurden die sedimentierten, ungebundenen Zellen durch vorsichtiges Schwenken der Schale wieder in Suspension gebracht und abgenommen. Nach zweimaligem Waschen mit TC199 wurden die Zellen in NK-Kulturmedium mit IL-2 aufgenommen und kultiviert. Die Zellzahl und Vitalität der aufgereinigten Zellen wurde bestimmt und die Separation durchflußzytometrisch überprüft.

### 3.7.5 Depletion der T-Lymphozyten durch MACS

Eine bessere Anreicherung der NK-Zellen konnte durch Abtrennung der T-Lymphozyten über ein magnetisches Feld (MACS, „magnetic cell sorting“) anhand Negativselektion erreicht werden. Hierbei wird die zu depletierende Zellpopulation mit einem Antikörper beladen, der an magnetische Kügelchen gekoppelt ist. Die zu trennende Zellsuspension wird auf eine mit Stahlwolle gefüllte Säule aufgegeben, die sich, eingespannt in einer Apparatur, innerhalb eines starken Magnetfeldes befindet. Auf diese Weise werden mit Antikörper beladene Zellen in der Säule zurückgehalten, während unbeladene Zellen durch Spülen der Säule eluiert werden können.

Die T-Zellen wurden wie in 3.7.4 beschrieben mit anti-TCR-mAK (R73) oder anti-CD3-mAK (G 418) beladen. Im Anschluß wurden die Zellen zweimal mit MACS-Puffer (PBS; 0,002 M EDTA; 0,5% FCS, frisch entgast) gewaschen und dann mit einer Suspension G $\alpha$ M-gekoppelter „beads“ in einer Zelldichte von  $100 \times 10^6$  Zellen/ml resuspendiert. Nach 15-minütiger Inkubation im Kühlschrank wurden die Zellen einmal mit dem 10-fachen Volumen an Puffer gewaschen, in MACS-Puffer resuspendiert und dabei auf  $200 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Eine mit einem Dreiweghahn versehene 10 ml Spritze wurde in die MACS-Apparatur eingeklemmt und über den Hahn mit 10 ml frisch entgastem MACS-Puffer gefüllt. Die Säule wurde von oben mit 100 ml MACS-Puffer gespült.  $200-300 \times 10^6$  Zellen wurden auf die Säule (Größe: CS) aufgetragen; durch Spülen der Säule mit 30-50 ml MACS-Puffer wurde die Negativfraktion (alle Zellen, außer mit anti-TCR bzw. CD3 beladene T-Zellen)

eluiert und in 50 ml Röhrchen aufgefangen. Eine weitere Fraktion (Waschfraktion) wurde mit 30-50 ml MACS-Puffer von oben eluiert, nachdem die noch in der Säule befindlichen Zellen durch Fällen der Säule über den Dreiwegehahn mit 10 ml MACS-Puffer nach oben gespült worden waren. Zur Gewinnung der Positivfraktion (mit Antikörper beladene T-Zellen) wurde die Säule aus der Apparatur entfernt, über den Hahn mit 10 ml und von oben mit 30-50 ml MACS-Puffer gespült; das Eluat wurde in 50 ml Falcon-Röhrchen aufgefangen.

### **3.8 Durchflußzytometrische Analytik**

Ein Durchflußzytometer ist ein optisches Meßsystem, das Streulicht- und Fluoreszenzsignale analysiert, die einzelne, in einem Flüssigkeitsstrom fokussierte Partikel nach Kontakt mit einem Laserstrahl abgeben. Hierbei können anhand der Streulichtsignale Rückschlüsse auf Größe und Granularität der Partikel gezogen werden (Salzmann et al., 1979) und so z.B. die wichtigsten Leukozytengruppen, wie Lymphozyten, Monozyten und neutrophile Granulozyten, voneinander unterschieden werden. Durch die Vorgabe bestimmter Meßbereiche („gates“) ist es dann möglich, ausgewählte Leukozyten-Populationen weiter zu analysieren. Nach Beladung der Zellen mit fluorochrommarkierten Antikörpern können diese Zell-Populationen z.B. im Hinblick auf die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle untersucht werden. Tote Zellen liefern niedrigere Signale im Vorwärts-Streulicht und höhere Signale im Seitwärts-Streulicht als die korrespondierenden lebenden Zellen und können daher aufgrund ihrer Streulicht-Eigenschaften durch Setzen des Auswertefensters auf die vitalen Zellen von der Analyse ausgeschlossen werden. Die Untersuchung der quantitativen Verteilung von Oberflächenmolekülen auf Zellen erfolgte anhand der Ein-, Zwei- und Dreifarbanalytik und indirekter oder direkter Fluoreszenzmarkierung. Die Daten wurden mit dem Consort-30 Programm (Firma Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) erhoben und ausgewertet.

#### **3.8.1 Analyse der Zellvitalität mittels Propidiumiodid**

Propidiumiodid (PI) ist ein kleines Molekül, das an Nukleinsäuren bindet und von Säugetierzellen mit intakten Zellmembranen nicht aufgenommen wird. Tote Zellen, die niedrigen PI-Konzentrationen ausgesetzt werden, werden fluoreszent und können auf diese Weise von vitalen Zellen abgegrenzt werden. Die Färbung mit PI ermöglicht eine genauere Überprüfung der Vitalität von Zellen als die Bestimmung ihrer Streulicht-Eigenschaften.

Sollte die Vitalität von Zellen vor der durchflußzytometrischen Analyse von Oberflächenantigenen überprüft werden, so wurde den Zellsuspensionen direkt vor Beginn der Messung im FACS-Röhrchen PI zugesetzt (20 µg/ml) und ca. 2 min bei RT inkubiert.

### **3.8.2 Analyse der Expression von Zelloberflächenmolekülen**

Zur Untersuchung des Phänotyps von Zellen anhand der FACS-Analyse wurden  $0,2-0,5 \times 10^6$  Zellen pro Vertiefung einer Rundboden-Mikrotiterplatte ausgesät. Nach kurzem Zentrifugieren (200 x g, 2 min) wurde der Überstand abgeschlagen und das Zellsediment auf einem Rüttler aufgeschüttelt. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden gewaschen, indem in jede Vertiefung 100 µl Waschpuffer (PBS, 0,5% BSA, 0,1% NaN<sub>3</sub>) gegeben und erneut zentrifugiert, abgeschlagen und aufgerüttelt wurde. Dann wurden je Vertiefung 50 µl (sättigende Konzentration, ca. 0,5 µg) eines Hybridom-Kulturüberstandes bzw. der Lösung eines aufgereinigten Antikörpers gegeben und 15-30 min auf Eis bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Im Fall einer direkten Fluoreszenzmarkierung wurde ein Fluorochrom (FITC oder PE)-markierter Antikörper eingesetzt, bei der indirekten Fluoreszenzmarkierung erfolgte die Detektion des unmarkierten oder biotinylierten Primärantikörpers über einen markierten Sekundär-Antikörper bzw. über ein Fluorochrom-Streptavidin-Konjugat (SA-PE, SA-TC). Hierzu wurde der ungebundene Primärantikörper durch zweimaliges Waschen entfernt und 20 µl des Sekundärantikörpers (Ziege-anti-Maus-Ig, G $\alpha$ M, mit nRS abgesättigt und 1:40 mit Waschpuffer verdünnt, oder Ziege-anti-Ratte, G $\alpha$ R, 1:20 verdünnt, jeweils mit FITC oder PE konjugiert) bzw. 10 µl SA-PE (1:8 verdünnt) oder 20 µl SA-TC (1:100 verdünnt) zugegeben. Nach Inkubation auf Eis im Dunkeln (15-30 min) wurden die Zellen zweimal gewaschen, jedes Zellsediment in 100 µl Waschpuffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt, in denen 200 µl Waschpuffer vorgelegt worden waren. Bei Zwei- oder Drei-Farben-Analysen wurde zum Abblocken unspezifischer Bindungen vor Zugabe des Sekundärantikörpers jeweils mit 10 µl normalem Ratten- bzw. Maus-Serum (nRS, nMS, 1:2 verdünnt) für 10 min. inkubiert. Die Messung der Proben am FACS-Gerät erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm. Bei Einfarbenanalytik wurden die Signale von 10.000 im Auswertefenster befindlichen Zellen, bei Zwei- oder Dreifarbenanalytik die Signale von 20.000-30000 „gegateten“ Zellen aufgenommen.



### 3.8.3 Analyse von intrazellulärem IFN- $\gamma$

Durch Einsatz spezifischer monoklonaler Antikörper können auch intrazellulär vorliegende Zytokine wie IFN- $\gamma$  durchflußzytometrisch nachgewiesen werden. Diese Methode bietet die Möglichkeit, einzelne Zellen hinsichtlich ihrer Zytokin-Produktion zu untersuchen. In einem Teil der Experimente wurden die unter Standardbedingungen kultivierten oder stimulierten Zellen direkt vor der durchflußzytometrischen Untersuchung 4 h in Gegenwart von Brefeldin A (BFA) kultiviert. BFA bewirkt als Inhibitor des intrazellulären vesikulären Proteintransportes eine Akkumulation intrazellulärer Zytokine und hat damit in der anschließenden FACS-Untersuchung ein verstärktes intrazelluläres Fluoreszenzsignal zur Folge. Zur Fixierung wurden die Zellen mit Paraformaldehyd (4%,  $5 \times 10^6$  Zellen/ml) für 20 min auf Eis inkubiert. Nach Waschen der Zellen mit PBS schloß sich eine Inkubation auf Eis mit einer Saponin-Lösung (PBS; 10 mg/ml BSA; 1 mg/ml Saponin; 0,1% (v/v) HEPES) in einer Dichte von  $10 \times 10^6$  Zellen/ml an, die zur Permeabilisierung der Zellen führte und somit das spätere Eindringen des anti-IFN- $\gamma$ -mAK in die Zellen ermöglichte. Im Anschluß wurden die Zellen abzentrifugiert, in eine Mikrotiterplatte übertragen ( $0,5 \times 10^6$  Zellen/Vertiefung) und mit FITC-markiertem anti-IFN- $\gamma$ -mAK in optimaler Konzentration für 40 min auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen erfolgte die Messung der grünen Fluoreszenzsignale am FACScan.

### 3.8.4 Isotypbestimmung von Antikörpern

Die zu testenden Antikörperlösungen wurden mit Zellen, die das durch den Antikörper erkannte Antigen exprimieren, 20 min auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die gegen die entsprechenden Isotypen gerichteten Antikörper (Maus) in optimalen Konzentrationen zugesetzt und erneut inkubiert und gewaschen. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte durch G $\alpha$ M-FITC.

### 3.8.5 Messung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration

Eine Möglichkeit zur Bestimmung der Konzentration zytoplasmatischer Ca<sup>2+</sup>-Ionen ( $[Ca^{2+}]_i$ ) bietet der Einsatz Ca<sup>2+</sup>-bindender Fluoreszenzfarbstoffe, wie z.B. FLUO-3. Nach Bindung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen (Dissoziationskonstante  $K_d = 400$  nM) steigt die Fluoreszenzintensität dieses Kalzium-Indikators um den Faktor 40 an, wobei die optimale Anregungswellenlänge bei

506 nm und die maximale Emissionswellenlänge bei 526 nm liegt (Minta et al., 1989). Diese spektralen Eigenschaften bilden die Grundlage für die durchflußzytometrische Analyse intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm (Argon-Laser) und Fluoreszein-Filtereinstellungen. Die Methode wurde modifiziert nach Vandenberghe und Ceuppens (1990) durchgeführt.  $5 \times 10^6$  Zellen/ml wurden 20 min in RPMI ohne FCS unter Zusatz von 4  $\mu\text{M}$  Fluo-3-Acetoxymethylester (AM) bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach Verdünnung der Zellsuspension mit vorgewärmtem RPMI (37°C) auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml wurde weitere 40 min bei 37°C inkubiert. Der neutrale Farbstoff dringt während dieses experimentellen Schrittes ungehindert durch die Zellmembran in das Zellinnere ein und wird im Zytosol von Esterasen gespalten. Das aus dieser Modifikation resultierende Anion FLUO-3 kann die Membran nicht passieren und verbleibt somit im Zellinneren. Die Zellen wurden abzentrifugiert (10 min, 200 x g) und im Anschluß 30 min auf Eis mit Antikörpern in optimalen Konzentrationen inkubiert, die gegen die zu stimulierenden Oberflächenantigene gerichtet waren. Um begleitend die Auswirkungen der Bindung der Antikörper ohne anschließende Kreuzvernetzung analysieren zu können, wurde ein Teil der Zellen nach Inkubation mit FLUO-3-AM unbehandelt belassen. Nach zweimaligem Waschen mit RPMI (ohne FCS) und einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer (25 mM HEPES, pH 7,2; 140 mM NaCl; 1,8 mM NaCl; 1,8 mM  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 1 mM  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ ; 3 mM KCl; 10 mM D-Glucose) aufgenommen. 100  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension wurden in einem FACS-Röhrchen mit 400  $\mu\text{l}$   $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer versetzt. Nach Erfassung der Basisfluoreszenz am FACScan wurden zu den mit Primärantikörper beladenen Zellen die kreuzvernetzenden Sekundär-Antikörper (G $\alpha$ R bzw. G $\alpha$ M, 3 $\mu\text{g/ml}$ ) und zu den nicht mit Antikörper vorbehandelten Zellen die jeweiligen Primärantikörper zugesetzt und die Änderungen der mittleren Fluoreszenzintensitäten (mean) zeitabhängig aufgenommen.

### 3.9 Stimulation von Zellen

Zur Untersuchung der signaltransduzierenden Eigenschaften von RT6 auf unterschiedlichen Ebenen der Aktivierungskaskade wurden die Zellen in Gegenwart an Plastik immobilisierter anti-RT6.1 bzw. anti-RT6.2-mAK oder eines monoklonalen Antikörpers gleichen Isotyps (Isotyp-Kontrollen, Ratten-IgG1 bzw. -IgG2c) kultiviert. Hierbei wurden maximal  $10 \times 10^6$  Zellen in mit Antikörper beschichteten Kulturschalen ( $\varnothing$  90 mm) bzw. max.  $2 \times 10^6$  Zellen in 6-well-Mikrotiterplatten (Beschichtung der Platten siehe 3.6) unterschiedlich lange inkubiert. Die Zellen in Kulturschalen wurden mit 25-30 ml Kulturmedium, in Mikrotiterplatten mit 4-5

ml Medium je Vertiefung kultiviert. In Experimenten, in denen die Kulturüberstände mittels ELISA untersucht werden sollten, wurde das Kulturmedium auf 15 ml bzw. 2-3 ml reduziert.

### **3.10 Bestimmung der Proliferation**

Die Bestimmung der Proliferation erfolgte durch Messung des Einbaus von Tritium-markiertem Thymidin während der DNA-Synthese in der G<sub>s</sub>-Phase des Zellzyklus. In 96-well-Flachboden-Mikrotiterplatten wurden  $2 \times 10^4$  Zellen je Vertiefung mit 100  $\mu$ l Medium allein oder bei gleichzeitigem Zusatz bestimmter Stimulanzen (z.B. IL-2, PMA, Ionomycin) bei 37°C kultiviert. Bei Untersuchungen zum Effekt der Kreuzvernetzung von RT6 auf die Proliferation der Zellen erfolgte die Inkubation in zuvor mit anti-RT6-mAK bzw. Isotyp-Kontroll-Antikörper beschichteten Mikrotiterplatten (siehe 3.6) oder in unbeschichteten Mikrotiterplatten im Anschluß an eine 24-stündige RT6-Kreuzvernetzung. Nach 24-72 h wurde je Vertiefung 1  $\mu$ Ci [<sup>3</sup>H]-TdR in 50  $\mu$ l Kulturmedium zugegeben. Nach weiteren 16 h wurden die Zellen mit einem halbautomatischen Zellkultursammler geerntet, wobei die zelluläre DNA auf Glasfasermatten zurückgehalten wurde. Nach dem Trocknen im Heizofen bei 50°C wurden die Matten mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit in Plastikhüllen eingeschweißt und in einem Flüssigkeits-Szintillations-Analysator (LKB-Beta-Plate) gemessen. Die eingebaute Tritium-Menge wurde als Zählimpulse pro Minute (cpm = counts per minute) ausgegeben.

### **3.11 Immunhistologische Färbung von Zytopräparaten**

Der Nachweis von RT6.1 erfolgte durch schrittweise Inkubation der Zytopräparate mit gegen RT6.1 gerichtetem Antikörper (mAK 3G2) und einem Merettich-Peroxidase gekoppeltem Sekundär-Antikörper (G $\alpha$ R-POX). Die anschließende Umsetzung des Substratgemisches 3-Amino-9-Ethylcarbazol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch das Enzym führt zu einer rotbraunen Farbentwicklung (siehe 3.13). Die Zellen wurden in TC199 auf  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. 200  $\mu$ l der Zellsuspension wurden in einer Zytocentrifuge punktförmig auf Objektträger geschleudert. Die Präparate wurden im Anschluß mindestens 2 h an der Luft getrocknet und dann gegebenenfalls bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert. Vor der Färbung wurden die schrittweise aufgetauten (15 min bei 4°C, dann 15 min bei RT) Präparate in eine mit Azeton (reinst) gefüllte Küvette überführt. Nach 10-minütiger Fixierung bei RT wurden die Präparate 1 min an der Luft getrocknet. Um die unspezifische Bindung von Antikörpern während der

weiteren Färbeschritte zu reduzieren, wurden die Präparate mit jeweils 50-100 µl normalem Ratten Serum (nRS) (1:10 verdünnt) bedeckt und für 15 min inkubiert. Nach Abgießen des nRS wurden 50-100 µl des Primärantikörpers (anti-RT6) in optimaler Konzentration auf das Präparat gegeben und für 40 min bis 1 h unter Schütteln inkubiert. Im Anschluß wurde ungebundener Antikörper durch drei 5-minütige Waschschrte mit PBS entfernt. Nach Zugabe von 50-100 µl des Sekundärantikörpers (GαR, gekoppelt mit Peroxidase, 1:100 verdünnt) wurde erneut für 40 min auf dem Schüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden 50-100µl der Substrat-Gebrauchslösung aufgegeben. Das Substrat wurde wie folgt frisch angesetzt: 4 mg 3-Amino-9-Ethylcarbazol wurden in einem Glasgefäß in 1 ml N,N-Dimethylformamid gelöst und unter Rühren zu 14 ml eines 0,1 M Natriumacetat-Puffers (pH 5,2) gegeben. 15 µl einer 35%igen Wasserstoffperoxid-Lösung wurden zugesetzt und die Lösung filtriert. Die Präparate wurden vollständig mit der Substrat-Lösung bedeckt, für 15-20 min inkubiert und im Anschluß exzessiv mit Leitungswasser gewaschen. Danach wurde mit Hämalan nach Weigert eine Kerngegenfärbung durchgeführt (2 min, RT). Die Präparate wurden mit Kaisersglycerin-Gelatine (wäßrig, 50°C) eingedeckt.

### **3.12 Protein-Dot-Blot**

Die Kulturüberstände der untersuchten NK-Zellen wurden mittels Protein-Dot-Blot und anschließender Immunfärbung auf lösliches RT6.1 bzw. RT6.2 untersucht. Die Methode bietet den Vorteil, daß das interessierende Protein in nativer, nicht denaturierter Form an eine Nitrozellulosemembran adsorbiert wird und auf dieser anhand gegen RT6.1 bzw. RT6.2 gerichteter Antikörper (3G2 bzw. GY1/12) detektiert werden kann. Da diese Antikörper nicht an denaturiertes RT6 binden, war ihr Einsatz in einer Immunfärbung im Anschluß an eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und einen Western-Blot nicht möglich. Die immobilisierten RT6-Antikörper-Komplexe wurden durch Färbung mit an GαR gekoppelter Peroxidase und anschließende Umsetzung des Substratgemisches durch die Peroxidase sichtbar gemacht. Die Umsetzung des Substrates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch die Peroxidase kann nur ablaufen, wenn Elektronendonatoren wie 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) zur Verfügung stehen. Diese werden oxidiert, und die Oxidationsprodukte polymerisieren rasch zu einer amorphen, unlöslichen, rotbraunen Substanz, die sich an der Stelle der Antikörperbindung absetzt.

Kulturüberstände unter Standardbedingungen kultivierter bzw. stimulierter Zellen wurden abzentrifugiert (10 min., 400 x g). Jeweils 200 – 800 µl des zellfreien Kulturüberstandes

wurden anhand einer Dot-Blot-Apparatur durch Anlegen eines schwachen Vakuums langsam durch eine zuvor in PBS angefeuchtete Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,45  $\mu\text{m}$ ) gesaugt. Der Nachweis der auf der Membran nicht kovalent adsorbierten RT6-Moleküle erfolgte durch eine Immunfärbung. Zur Absättigung freier Proteinbindungsstellen wurde die Membran zunächst in PBS mit 3% (w/w) BSA 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach Abgießen der Abblocklösung wurde die Membran direkt mit Primärantikörper (anti-RT6.1: mAK 3G2; anti-RT6.2: mAK GY1/12, unverdünnte Hybridom-Kulturüberstände) 1 h bei RT unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurde dreimal 5 min mit 0,1% Tween20 in PBS gewaschen, um nicht an die Membran gebundene Proteine zu entfernen. Es folgte eine 1-stündige Inkubation bei RT mit dem Sekundärantikörper, an den Peroxidase gekoppelt war (G $\alpha$ R-POX, 1:100 in PBS verdünnt). Nach dreimaligem Waschen mit 0,1% Tween20 in PBS wurde die Membran durch kurzes Schwenken in Substratpuffer (Natriumacetat, 0,1M, pH 5,2) äquilibriert. Die Farbreaktion wurde durch Zusatz von frisch angesetzter und filtrierter Substratlösung gestartet. Das Substrat wurde zuvor wie folgt frisch angesetzt: 4 mg 3-Amino-9-Ethylcarbazol wurden in einem Glasgefäß in 1 ml N,N-Dimethylformamid gelöst und unter Rühren zu 14 ml eines 0,1 M Natriumacetat-Puffers (pH 5,2) gegeben. 15  $\mu\text{l}$  einer 35%igen Wasserstoffperoxid-Lösung wurden zugesetzt und die Lösung filtriert. Während der sich anschließenden 15-30-minütigen Inkubation im Dunkeln unter Schwenken wurde die Färbung regelmäßig kontrolliert und die Reaktion bei hinreichender Farbentwicklung durch exzessives Waschen der Membran mit Wasser gestoppt. Im Anschluß wurde die Membran zwischen Filterpapier getrocknet.

### 3.13 ELISA

Die Bestimmung der IFN- $\gamma$ - und TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in den Kulturüberständen der untersuchten Zellen erfolgte mittels ELISA- („enzyme linked immunosorbent assay“-)Kits der Firma Biosource (Cytoscreen<sup>TM</sup>). Es handelte sich um einen „sandwich“-ELISA. Bei dieser Methode ist eine bestimmte Menge eines gegen das Antigen gerichteten Antikörpers („Fänger-Antikörper“) an einen festen Träger („solid phase sandwich“ ELISA), in diesem Fall die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte, gebunden. Nach Zugabe einer Testlösung mit unbekannter Antigenkonzentration bzw. einer Reihe von Standardlösungen bekannter Antigenkonzentration bindet das Antigen spezifisch an die immobilisierten Antikörper. Ungebundenes Antigen wird gewaschen. Im Anschluß wird mit einem zweiten

Antikörper („Detektions-Antikörper“) inkubiert. Hierbei ist Voraussetzung, daß die von den Antikörpern erkannten Determinanten nicht überlappen, da sonst der zweite Antikörper nicht binden kann. Reagiert der zweite Antikörper mit dem gebundenen Antigen, so liegt dieses zwischen zwei Antikörpern („sandwich“). In dem verwendeten ELISA lag der Detektions-Antikörper biotinyliert vor und konnte daher durch sukzessive Zugabe von Streptavidin-gekoppelter Peroxidase und Substrat-Lösung, deren Umsatz durch das Enzym in einer Farbreaktion (siehe 3.12) resultiert, nachgewiesen werden. Die farbliche Intensität dieser enzymatischen Reaktion ist direkt proportional zu den vorliegenden Antigen-Konzentrationen. Anhand der im Kit mitgelieferten Standards wurde eine Standard-Verdünnungsreihe (1400 bis 21,8 pg IFN- $\gamma$ /ml bzw. 1000 bis 15,6 pg TNF- $\alpha$ /ml) hergestellt. Der Assay wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach Messung der Absorption bei 450 nm in einem ELISA-Plattenlesegerät wurden die Zytokin-Konzentrationen der Proben anhand der Standardkurve berechnet. Die Nachweisgrenzen lagen bei < 13 pg IFN- $\gamma$ /ml bzw. < 4 pg TNF- $\alpha$ /ml.

### **3.14 Biosynthetische Markierung von Proteinen mit <sup>35</sup>S-Methionin und <sup>35</sup>S-Cystein**

Kultiviert man Zellen in Gegenwart von <sup>35</sup>S-Methionin und <sup>35</sup>S-Cystein, so werden alle während der Inkubationszeit synthetisierten, Cystein- und Methionin enthaltenden Proteine radioaktiv markiert. Je Ansatz wurden  $20 \times 10^6$  Zellen, nach zweimaligem Waschen mit TC199, mit 20 ml Methionin- und Cystein-freiem DMEM, supplementiert mit FCS (10%), Natriumpyruvat (1 mM), L-Glutamin (584,8 mg/l), 2-Mercaptoethanol ( $5 \times 10^{-5}$  M), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 U/ml) für 2 h bei 37°C kultiviert. Das Medium wurde ersetzt, mit einem Gemisch aus <sup>35</sup>S-Methionin und <sup>35</sup>S-Cystein (10  $\mu$ Ci/ml) versetzt und die Zellen über Nacht (16 h) im Brutschrank kultiviert. Überschüssige Radioaktivität wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt, die Zellen in Ansätze (je  $20 \times 10^6$  Zellen) aufgeteilt, abzentrifugiert und die Pellets mit jeweils 750  $\mu$ l Lysepuffer (siehe 2.16) versetzt.

### **3.15 Zell-Lyse**

Durch detergenschaltige Puffer wird die Integrität von Zellmembranen zerstört, so daß insbesondere Membranproteine solubilisiert werden. Während das Detergens als amphiphiles

Molekül in die Phospholipid-Schichten der Membranen eindringen kann, beeinflusst die Ionenkonzentration des Puffers die Protein-Protein-Wechselwirkungen. Durch Variation des Detergens und der Ionenkonzentration können im Anschluß Proteinkomplexe (niedrige Ionenkonzentrationen, schonende Detergenzien) oder einzelne Proteine (hohe Ionenstärken, scharfe Detergenzien) analysiert werden. In dieser Arbeit wurde für die Immunpräzipitation von RT6 bzw. die Western-Blot-Analysen NP-40, ein relativ scharfes Detergens, verwendet. Die Herstellung von Gesamtzell-Lysaten erfolgte in Lysepuffer mit 1% NP-40 in 50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl. Der Lysepuffer enthielt zudem als Kinase- und Phosphatase-Inhibitoren 5 mM EDTA bzw. 10 mM NaF und 1 mM NaVO<sub>4</sub>, als Redoxreagenz 10 mM Iodacetamid und als Protease-Inhibitoren 1 mM PMSF sowie je 1 µg/ml Leupeptin, Aprotinin und Pepstatin. 2-4 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml wurden in Lysepuffer in Eppendorfhütchen 45-60 min bei auf Eis lysiert. Die Zellkerne und andere unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (8000 x g, 10 min, 4°C) entfernt. Der Überstand mit den zytoplasmatischen Proteinen und solubilisierten Membranproteinen wurde entweder für eine sich anschließende RT6-Immunpräzipitation verwendet, oder, mit Probenpuffer versetzt, mittels SDS-PAGE analysiert.

### 3.16 Immunpräzipitation

Im Verfahren der Immunpräzipitation binden an Protein-A oder -G-Sepharose gekoppelte Antikörper spezifisch an solubilisierete Proteine. Die entstehenden Antigen-Antikörper-Sepharose-Komplexe können im Anschluß abzentrifugiert und auf diese Weise die zuvor solubilisierten Proteine angereichert werden. In einem Vorreinigungsschritt zur Entfernung unspezifisch bindender Proteine wurden die nach Zell-Lyse erhaltenen Überstände (750 µl je Ansatz) mit jeweils 10 µg eines irrelevanten Ratten-Antikörpers (IgG1 bzw. IgG2c-Isotyp-Kontrollantikörper) versetzt und 60 min bei 4°C im Kühlraum im Rotationsmischgerät inkubiert. Nach Zusatz von 50 µl zuvor aufgeschlämmter und in Lysepuffer (ohne Detergens und Inhibitoren) gewaschener Protein-G-Sepharose wurde erneut 60 min bei 4°C im Kühlraum unter Rotation inkubiert. Im Anschluß wurde 5 min zentrifugiert (8000 x g, 4°C), die Überstände in neue Eppendorfgefäße überführt und die Pellets verworfen. Die Überstände wurden mit spezifischem Antikörper (5 µg/ml) oder 20 µl Serum versetzt und über Nacht bei 4°C im Rotationsmischgerät inkubiert. Nach Zusatz von 50 µl Protein-G-Sepharose wurde erneut inkubiert (4 h, 4°C, Rotation), die Sepharose abzentrifugiert (8000 x g, 5 min, 4°C) und die Überstände verworfen. Die Pellets wurden sechsmal mit jeweils 500 µl Lysepuffer

gewaschen und mit 25 µl einfach-konzentriertem Laemmli-Probenpuffer versetzt. Durch 5-minütiges Erhitzen auf 95°C wurden die Antikörper-Protein-Sepharose-Komplexe zerstört. Nach kurzem Anzentrifugieren wurden die Überstände für die Gelelektrophorese verwendet.

### 3.17 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteingemische aus Gesamtzell-Lysaten oder Immunpräzipitaten erfolgte in einer diskontinuierlichen Gelelektrophorese, die modifiziert nach der von Laemmli entwickelten Methode (Laemmli, 1970) durchgeführt wurde. Das im Laemmli-Probenpuffer enthaltene anionische Detergens SDS (Sodiumdodecylsulfat) bindet die meisten Proteine zu negativ-geladenen SDS-Protein-Komplexen mit konstantem Ladungs- zu Masse-Verhältnis (1,4 g SDS/g Protein in 1%igen SDS-Lösungen). Die Proteine erhalten eine negative Nettoladung, die alle nativen Ladungen überdeckt. Zudem denaturiert SDS die Proteine - besonders nach Reduktion mit Mercaptoethanol oder DTT - und unterbindet Protein-Protein-Wechselwirkungen und damit Quartär-Strukturen. Somit unterscheiden sich die meisten SDS-Protein-Komplexe nur noch hinsichtlich ihrer Größe. Bei der Elektrophorese trennt der Molekularsiebeffekt einer Polyacrylamidmatrix die Komplexe ihrem Stokes-Radius entsprechend auf. Die Beweglichkeit  $R_f$  ( $R_f = \text{zurückgelegte Strecke des Proteins} / \text{Strecke der Lauffront}$ ) der zur Anode wandernden Komplexe verhält sich daher linear proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Werden Standardproteine mit bekannten Molekulargewichten mitgeführt, so kann über eine Eichgerade das Molekulargewicht unbekannter Proteine bestimmt werden (Weber und Osborne, 1969).

Die Polyacrylamid-Gele wurden in einer Dicke von 1 mm gegossen. Je nach aufzutrennendem Proteingemisch enthielt das Trenngel 10-15% Acrylamid:Methylenbisacrylamid (30:0,8) in 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8 und 0,1% SDS. Um die Polymerisationsreaktion zu starten, wurden als Radikalbildner 0,08% Ammoniumsulfat und 0,2% TEMED als Katalysator zugefügt. Während der etwa 30-minütigen Polymerisation wurde das Gel mit Butanol überschichtet, um eine glatte Kante zu erhalten. Das Butanol wurde entfernt und auf das Trenngel wurde ein 5%iges Acrylamid:Methylenbisacrylamid (30:0,8; 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,1% SDS) Sammelgel gegossen. Sofort nach dem Gießen wurde ein Probenkamm eingepaßt, so daß 10 Taschen entstanden, die 45 µl Probenmaterial fassen konnten. Vor dem Probenauftrag wurden die Taschen zwecks Entfernung von Gelresten mit Laufpuffer (25 mM Tris, pH 8,3; 0,19 M Glycin; 0,1% SDS) gespült. Immunpräzipitate wurden in reduzierendem, einfach-konzentriertem Laemmli-Probenpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 10% Glycerin; 1% SDS;



0,1 mg/ml Bromphenolblau, 5% Mercaptoethanol) aufgenommen. Gesamtzell-Lysate wurden mit 3-5-fach konzentriertem Laemmli-Probenpuffer auf die entsprechenden Konzentrationen eingestellt und so das Probenvolumen relativ klein gehalten. Nach 5-minütigem Erhitzen bei 95°C wurden die Proben bei -20°C gelagert, oder direkt auf das Gel aufgetragen. Molekulargewichtsstandards wurden bei jeder Auftrennung mitgeführt. Leere Probestaschen wurden mit Probenpuffer gefüllt, um eine konstante Ionenstärke über die gesamte Gelbreite zu gewährleisten. Die Auftrennung erfolgte in einer Vertikal-Elektrophoresekammer in Laufpuffer. Bei einer Stromstärke von 20 mA wurden die Proteine zunächst im Sammelgel fokussiert und dann bei 30 mA im Trenngel aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Farbmittelfront die Gel-Unterkante erreicht hatte. Im Anschluß wurden die Gele entweder in die Blot-Apparatur überführt oder zum Nachweis der aufgetrennten Proteine mit Coomassie-Brillant-Blau R-250 gefärbt. Hierzu wurden die Gele in 0,1% Coomassie-Brillant-Blau R-250 in Fixierlösung (20% Methanol, 7% Essigsäure) bei 80°C 10-30 min gefärbt und fixiert. Durch wiederholtes Waschen mit Fixierlösung wurde überschüssiger Farbstoff entfernt. Die Gele wurden im Gelrockner unter Vakuum bei 70°C getrocknet. Getrocknete radioaktive Gele wurden auf Röntgenfilm exponiert (Autoradiographie).

### **3.18 Western-Blot**

Die mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden im Semi-Dry Blot-Verfahren (Tovey und Baldo, 1987) auf eine Nitrozellulose-Membran (Porengröße 0,45 µm) transferiert. Der Nachweis der auf der Membran immobilisierten Proteine erfolgte im Anschluß durch Immunfärbung mit spezifischen Antikörpern.

#### **3.18.1 Elektro-Transfer von Proteinen**

Der Transfer der negativ geladenen Proteine erfolgte in einem diskontinuierlichen Puffersystem anhand einer Immunoblot-Transfer-Apparatur. Die verwendeten Filterpapiere wurden auf Gelgröße zugeschnitten. 6 Lagen Filterpapier wurden bei RT in 0,3 M Tris-HCl (pH 10,4; 20% Methanol) eingeweicht und auf die mit dem entsprechendem Puffer befeuchtete, anodische Graphitplatte gelegt. Darauf wurden 3 Lagen in 25 mM Tris-HCl (pH 10,4, 20% Methanol) getränkten Filterpapieres und dann eine im gleichen Puffer äquilibrierte Nitrozellulosemembran geschichtet. Das Gel wurde zunächst in 25 mM Tris-HCl, (pH 9,4; 40 mM 6-Aminocaprinsäure; 20% Methanol; 0,5% SDS) geschwenkt und dann

luftblasenfrei auf die Membran gelegt. Es folgten 9 Lagen in demselben Puffer getränkten Filterpapiere. Eventuell zwischen den Lagen befindliche Luftblasen wurden mittels einer Rolle entfernt. Die mit Puffer befeuchtete Kathodenplatte wurde aufgelegt und das Sandwich in die Blot-Apparatur eingebaut. Es wurde 1,5 h bei einer Stromstärke von  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  Gelfläche geblottet.

### 3.18.2 Detektion mit Merrettich-Peroxidase und ECL-Reaktion

Die Detektion der geblotteten Proteine durch Immunfärbung mittels Antikörper-gekoppelter alkalischer Phosphatase (AP) und anschließender Substratreaktion mit Nitroblautetrazolium (NBT) und 8-Bromo-4-Chloro-3-Indoylphosphat (BCIP) erwies sich als nicht sensitiv genug. Die Sensitivität der Nachweismethode konnte jedoch durch Einsatz der ECL-Technik („enhanced chemiluminescence“) hinreichend gesteigert werden. Chemilumineszenz ist eine in einer Lichtemission resultierende chemische Reaktion, die zwischen einem Enzym und einem chemilumineszente Molekül wie Luminol in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  abläuft. Durch den Zusatz eines Verstärkers kann die Lichtemission intensiviert und verlängert werden. Die ablaufende Reaktion kann durch Auflegen eines Röntgenfilmes auf den Blot detektiert werden.

Der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurde durch reversible Färbung mit Ponceau S-Lösung kontrolliert. Hierzu wurde die Membran für ca. 3 s in der Färbelösung geschwenkt, überschüssiger Farbstoff wurde durch Spülen mit Wasser entfernt. Falls nötig, konnte die Membran nun zerschnitten werden. Um die unspezifische Bindung von Antikörpern während der folgenden Inkubationsschritte abzublocken, wurden freie Proteinbindungsstellen auf der Membran durch Inkubation in PBS mit 3% (w/w) Milchpulver und 0,05% Tween20 1 h bei RT oder über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  abgesättigt. Die Membran wurde im Anschluß kurz mit PBS, 0,05% Tween20 abgespült und dann mit dem gegen Phosphotyrosin gerichteten, biotinylierten Primärantikörper (4G10-bio, Pierce, 1:1000 in PBS verdünnt) 1 h bei RT unter Schwenken inkubiert. Im Anschluß wurden ungebundene Proteine durch dreimaliges Waschen der Membran in PBS, 0,05% Tween20 für jeweils 10 min entfernt. Nach Zusatz des Streptavidin-Peroxidase-Konjugates (Pierce, 1:100.000 in PBS verdünnt) wurde erneut 1 h bei RT unter Schwenken inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran in PBS, 0,05% Tween20 für jeweils 10 min erfolgte eine 5-minütige Inkubation in frisch angesetzter Substrat-Lösung (Pierce, SuperSignal<sup>®</sup>Ultra), die als chemilumineszentes Molekül Luminol enthält. Die feuchte Membran wurde luftblasenfrei in Klarsichtfolie gepackt

und je nach Stärke der Reaktion unterschiedlich lange (30 s bis 10 min) auf Röntgenfilm (Hyperfilm-MP, Amersham) exponiert. Die Spezifität der Reaktion wurde durch Behandlung einer entsprechend mit Proteinen beladenen Membran mit allen Sekundärreagenzien, jedoch ohne Primärantikörper, überprüft.

## 3.19 Molekularbiologische Methoden

### 3.19.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte zunächst durch Phenol/Chloroform-Extraktion nach Chomczynski und Sacchi, 1987. In dem Großteil der Experimente kam jedoch die wesentlich schnellere und einfachere Isolation über eine Silica-Membran (RNeasy-Isolationskit, Qiagen) zur Anwendung. Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Jeweils  $5 \times 10^6$  Zellen wurden abzentrifugiert (10 min, 200 x g). Das Sediment wurde in 350  $\mu$ l des mitgelieferten Guanidiniumthiocyanat-haltigem Lysepuffers (1%  $\beta$ -Mercaptoethanol) resuspendiert und auf eine Homogenisations-Säule (QIAshredder) aufgetragen. Die vorgeschaltete Homogenisierung erniedrigt durch Zerkleinern der hoch molekularen genomischen DNA die Viskosität der Lösung und erhöht so die spätere mRNA-Ausbeute. Nach dem Zentrifugieren (1 min, max. Geschwindigkeit) wurde das aufgefangene Eluat mit 350  $\mu$ l 70% (v/v) Ethanol versetzt, gemischt und auf eine mit der Silica-Membran gefüllte Säule aufgetragen. Nach erneutem Zentrifugieren (15 s, 8000 x g) hatte die RNA an die Membran gebunden, während das übrige Zellmaterial die Säule passiert hatte. Nach zwei Waschschritten wurde die Matrix durch 2-minütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit getrocknet. In einem abschließenden Zentrifugationsschritt (1 min, 10000xg) wurde die RNA mit 30-50  $\mu$ l DEPC-behandeltem Wasser eluiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Die Konzentration der RNA-Lösung wurde photometrisch bestimmt. Hierzu wurde die Lösung 1:1000 mit Wasser verdünnt und die optische Dichte (E) bei Wellenlängen von  $\lambda=260$  nm (Absorption der Nukleinsäuren) und  $\lambda=280$  nm (Absorption der Proteine) gemessen. Da eine RNA-Lösung der Konzentration 40  $\mu\text{g/ml}$  bei 260 nm eine optische Dichte von 1 besitzt, wurde die RNA-Konzentration wie folgt berechnet:

$\text{RNA } [\mu\text{g/ml}] = 40 \times E_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor (1000)}$ . Der Quotient  $E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$  ist ein Maß für die Reinheit der Lösung und sollte mindestens 1,7 betragen.

### 3.19.2 „Reverse-Transkriptase-PCR“

PCR („polymerase chain reaction“) ist eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren. Hierbei werden spezifische DNA-Sequenzen *in vitro* in einem einzigen Reaktionszyklus mit hoher Ausbeute amplifiziert. Als Matrize für die PCR kann neben chromosomaler und Plasmid-DNA auch RNA direkt, bzw. im Fall der Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) ihre DNA-Kopie (copy DNA, cDNA) dienen. Hierbei wird zunächst durch das Retroviren-Enzym Reverse Transkriptase von jedem RNA-Molekül eine komplementäre cDNA synthetisiert. Die sich anschließende PCR-Reaktion basiert auf drei Teilschritten mit jeweils unterschiedlichen Temperaturen. Im Denaturierungsschritt werden die DNA/RNA-Hybridhelices bzw. die DNA-Doppelstränge durch Erhitzen auf ca. 90°C in Einzelstränge aufgeschmolzen. Im zweiten Schritt, dem „annealing“, hybridisieren spezifische Oligonukleotidprimer bei einer durch die Basenzusammensetzung der Primer bestimmten Temperatur (ca. 50°C) mit den DNA-Matrizen. Die Sequenzen dieser Oligonukleotide sind so gewählt, daß sie zu entgegengesetzten Sequenzen in der Umgebung des interessierenden DNA-Abschnittes komplementär sind. Im dritten Reaktionsschritt synthetisiert eine hitzestabile DNA-Polymerase, ausgehend vom 3'-Ende der als Startmoleküle dienenden Primer, bei ca. 70°C einen komplementären DNA-Strang. In jedem Zyklus wird so die Menge des von den Primern eingegrenzten Matrizenfragmentes verdoppelt, die im folgenden Zyklus als Ausgangsmaterial für die DNA-Synthese dient. Die Analyse der mRNA-Population innerhalb der RNA-Gesamt-Population einer Zelle gibt Aufschluß darüber, welche Gene zum Zeitpunkt der Präparation in der jeweiligen Zelle exprimiert werden. Die ausgesprochen sensitive RT-PCR-Technik bietet somit u.a. die Möglichkeit, die Transkription bestimmter Gene z.B. nach Aktivierung von Zellen indirekt durch Analyse der neu synthetisierten mRNA zu bestimmen.

#### 3.19.2.1 RT-Reaktion

Die für die spätere Amplifikation als Matrize dienende cDNA wurde durch das Enzym Reverse Transkriptase (RT) durch Umschreibung der RNA in DNA hergestellt. In einem 15 µl umfassenden Reaktionsansatz wurden zusammengegeben:

2 µg RNA

3 µl 5xRT-Puffer (250 mM Tris-HCl, pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>, GibcoBRL)

0,9 µl dNTP-Lösung (je 10 mM ATP, TTP, GTP, CTP, Promega)

1 µl pd(N)<sub>6</sub> (0,5 mM, pharmacia biotech)

DEPC-behandeltes Wasser

Die Ansätze wurden 10 min bei 95°C erhitzt (Separation der RNA/DNA-Helices) und im Anschluß sofort auf Eis abgekühlt. Jeder Ansatz wurde mit 20 U RT (GibcoBRL, SuperscriptRT) versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert.

### 3.19.2.2 *semiquantitative PCR-Analytik*

In einem 50 µl umfassenden Reaktionsansatz wurden zusammengegeben:

1-2 µl cDNA

0,5 µl sense Primer (500pmol/µl)

0,5 µl antisense Primer (500pmol/µl)

0,5 µl dNTP-Lösung (dCTP, dGTP, dTTP, dATP, je 20 mM, Promega)

5 µl 10x Taq-Polymerase-Puffer (Tris-HCl, KCl, (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>, 15 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 8,7,)

0,2 µl (=1 U) Taq-Polymerase (HotStarTaq DNA-Polymerase, Qiagen)

Wasser ad 50 µl

Nach einer 5-minütigen Denaturierung im Thermocycler bei 94°C wurde der Amplifikationszyklus in Abhängigkeit von den verwendeten Primern mit folgenden Temperaturen und Zykluszeiten durchgeführt:

<b>mRNA</b>	<b>Primerbindung</b>	<b>Elongation</b>	<b>Denaturierung</b>
GAPDH	60°C, 15 sec	15 sec	15 sec
IFN-γ	63°C, 30 sec	30 sec	30 sec
TNF-α	65°C, 30 sec	30 sec	30 sec
IL-4	62°C, 30 sec	30 sec	30 sec
IL-10	55°C, 30 sec	30 sec	30 sec
IL-1β	60°C, 30 sec	30 sec	30 sec
CD25	60°C, 30 sec	30 sec	30 sec

Diese Zyklusabfolge wurde 30-33 mal wiederholt. Abschließend folgte eine 5-minütige Auffüllphase bei 72°C.

### **3.19.2.3 kompetitive PCR-Analytik**

In der kompetitiven RT-PCR wird ein Kompetitor-Kontrollfragment mit der Proben-cDNA in einem Reaktionsansatz koamplifiziert (Wang et al., 1989; Gilliland et al., 1990). Für jedes Experiment werden mehrere PCR-Reaktionen durchgeführt, die jeweils die gleiche Menge an cDNA, jedoch unterschiedliche Mengen an Kompetitor-DNA enthalten. Die Kompetitor- und Proben-PCR-Produkte können aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe elektrophoretisch voneinander getrennt und unterschieden werden. Die Menge der interessierenden Proben-cDNA kann dann in Relation zur Menge der Standard-DNA abgeschätzt werden. Auf diese Weise können durch mRNA-Präparation, RT-Reaktion und unterschiedliche Amplifikationseffizienzen bedingte Variationen der cDNA-Konzentrationen verschiedener Proben z.B. auf vergleichbare GAPDH-cDNA-Konzentrationen eingestellt werden. Im Anschluß ist mit dieser Methode der Vergleich der Expressionsrate einer mRNA unterschiedlich kultivierter bzw. stimulierter Zellen möglich. Diese vergleichende Analyse kann im Plateau-Bereich der Amplifikationsreaktion durchgeführt werden und muß nicht, wie bei anderen semiquantitativen Methoden, im exponentiellen Reaktionsbereich ablaufen. Dies macht eine Abfolge von 40 oder mehr Zyklen möglich (Bouaboula et al., 1992).

Die heterologen GAPDH-Monokompetitorfragmente wurden in der Abteilung für klinische Biochemie der MHH synthetisiert und für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Analyse der IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10, IL-1 $\beta$  und CD25-mRNA-Expression erfolgte unter Zusatz eines von Siegling et al. (1994) für das Rattensystem entwickelten multispezifischen Kontrollfragmentes, sowie der entsprechenden Primer. Die insgesamt 50  $\mu$ l umfassenden Reaktionsansätze waren wie in 3.19.2.2 beschrieben zusammengesetzt, zusätzlich wurden in jeden Ansatz 5  $\mu$ l einer Kompetitor-Lösung definierter Konzentration gegeben. Die Amplifikationszyklen wurden wie bereits beschrieben durchgeführt, die Zyklusabfolge wurde 40 mal wiederholt.

### **3.19.2.4 Detektion der PCR-Produkte**

5-10  $\mu$ l des PCR-Produktes wurden mit 2,5 ml Probenpuffer (15% Ficoll, 0,25% Bromphenolblau in Wasser) versetzt und auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. Die Agarose wurde zuvor in 1xTAE (0,04 M Tris-Acetat, pH 8,2; 1 mM EDTA) gekocht, bis sie vollständig gelöst war und unter Rühren abgekühlt. Nach Zugabe von Ethidiumbromid (0,5  $\mu$ g/ml) wurde die Agarose in eine mit einem Probenkamm bestückte Gelkammer gegossen. Die Gelkammer wurde mit Laufpuffer aufgefüllt und die Elektrophorese (100 V,

ca. 40 min) gestartet. Die aufgetrennte cDNA-Banden wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und die Ergebnisse anhand eines Videodokumentationssystems (Stratagene, Eagle Eye) oder photographisch festgehalten. In einigen Experimenten wurden die mittels kompetitiver RT-PCR erhaltenen Banden anhand der Analyse-Software des Videodokumentationssystems densitometrisch ausgewertet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Vergleichende Charakterisierung der NK-Linien

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit eingesetzten NK-Langzeit-Linien 3651 und 3075 wurden in der Arbeitsgruppe Wonigeit aus Milz-NK-Zellen des Rattenstammes LEW etabliert. Prof. B. Rolstadt stellte die NK-Tumor-Linie RNK-16 zur Verfügung, welche in der Arbeitsgruppe von Prof. C. W. Reynolds aus F344-Ratten generiert wurde (Axberg et al., 1988). Die Charakterisierung der NK-Linien 3651 und 3075 hinsichtlich Oberflächen-Phänotyp, Expression von Untereinheiten des IL-2-Rezeptors, RT6-Expression und Zytokin-Produktion bildete die Grundlage für weiterführende Untersuchungen. Da die Analysen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Linien 3651 und 3075 aufzeigten, wird im folgenden die Charakterisierung der Linie 3651 stellvertretend für beide Linien beschrieben. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe war die RT6-Expression und die Expression einiger NK-Marker auf den NK-Linien 3651, 3075 und RNK-16 bereits durchflußzytometrisch analysiert worden. Da Zelllinien im Laufe der Langzeit-Kultivierung unter anderem die Expression von Oberflächenmolekülen modulieren, wurde die RT6-Expression der NK-Linien erneut zu Beginn des Promotionsvorhabens und dann in regelmäßigen Abständen durchflußzytometrisch überprüft und abschließend statistisch ausgewertet. Die durchflußzytometrische Untersuchung der RT6-Expression der NK-Linien wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Analysen mittels Immunpräzipitation, Immunfärbung von Zytopräparaten und Untersuchung der Kulturüberstände auf lösliches RT6 erweitert.

#### 4.1.1 Oberflächen-Phänotyp

Die NK-Linien hatten im Verlauf der Langzeit-Kultivierung ihr zytotoxisches Potential verloren. Im Rahmen der Untersuchung des Oberflächen-Phänotyps sollte geklärt werden, ob diesem Verlust eine fehlende Expression bestimmter Oberflächenmoleküle zugrunde liegt. Die Zellen der Linien 3651 und RNK-16 wurden vor den Analysen unter Standardbedingungen kultiviert. Die Separation der NK-Zellen aus Milzen von LEW-Ratten erfolgte durch Abtrennung der B-Zellen über Nylonwolle und der T-Zellen über Panning oder MACS. Die Ergebnisse der durchflußzytometrischen Untersuchungen sind in **Tab. 4.1.1** zusammengestellt. Da bei der Analyse frisch isolierter NK-Zellen zwecks Darstellung der NK-Population Dreifach-Färbungen durchgeführt wurden und daher der Nachweis der



Primärantikörper nicht mit G $\alpha$ M-FITC, sondern mit G $\alpha$ M-PE bzw. SAPE oder SATC erfolgte, können die entsprechenden mittleren Fluoreszenzintensitäten nicht mit den Färbungen der beiden NK-Linien verglichen werden und werden daher nicht aufgeführt.

Beide NK-Linien und Milz-NK-Zellen zeigten die für Ratten-NK-Zellen charakteristische Expression von NKR-P1 bei fehlender Expression von Untereinheiten des CD3/TCR-Komplexes. Im Gegensatz zu der Linie 3651 exprimierten ein Großteil der Milz-NK-Zellen und die Linie RNK-16 CD8 $\alpha$  ( $73,4\% \pm 1,8$  bzw.  $63,9\% \pm 23,4$ ).

Die vergleichende Untersuchung der Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle konnte keine signifikanten Unterschiede aufzeigen, die für den beobachteten Verlust der zytotoxischen Aktivität der NK-Linien verantwortlich sein könnten. Die Linie 3651 exprimierte CD2, LFA-1 (CD11a, CD18) und ICAM-1 in geringerem Ausmaß als die Linie RNK-16. CD28 und CD43 wurden von vergleichsweise mehr Zellen der Linie 3651 als der Linie RNK-16 exprimiert. Der Vergleich mit Milz-NK-Zellen lieferte auch hier für die Zellen der Linie 3651 eine schwächere Expression von CD2 und LFA-1, während sich in Bezug auf CD28, CD44 und ICAM-1 keine signifikanten Expressionsunterschiede zeigten. Bei allen Zellen jeder NK-Linie konnte CD45 nachgewiesen werden.

**Tab. 4.1.1 Vergleichende durchflußzytometrische Analyse des Oberflächen-Phänotyps der NK-Linie 3651**

Oberflächenmolekül (mAK)	NK-Linie 3651 <sup>(*1)</sup>		NK-Linie RNK-16 <sup>(*1)</sup>		Milz-NK-Zellen <sup>(*2)</sup>	
	positive Zellen [%]	mean positive Population	positive Zellen [%]	mean positive Population	positive Zellen [%]	mean positive Population
NKR-P1 (3.2.3)	99,9 ± 0,1	338,3 ± 47,3	99,9 ± 0,6	240,0 ± 155,9	100	(*3)
TCR α/β (R73)	0	0	0	0	0	0
CD3 (G-418)	0	0	0	0	0	0
CD8-α (OX8)	0	0	63,9 ± 23,4	51,7 ± 23,7	73,4 ± 1,8	(*3)
CD2 (OX34)	6,9 ± 2,3	22,9 ± 2,5	78,3 ± 11,9	119,9 ± 83,2	64,5 ± 40,9	(*3)
CD11a (WT1)	35,3 ± 6,7	24,0 ± 2,2	83,7 ± 26,1	69,0 ± 50,7	93,6 ± 9,0	(*3)
CD18 (WT3)	50,9 ± 7,3	52,0 ± 9,7	96,4 ± 7,4	100,9 ± 58,3	83,4 ± 12,4	(*3)
CD28 (JJ319)	52,5 ± 2,2	37,0 ± 2,4	18,5 ± 11,2	22,2 ± 8,9	45,0 ± 13,8	(*3)
ICAM-1 (1A29)	65,1 ± 4,4	33,6 ± 5,8	96,8 ± 4,3	112,3 ± 71,4	72,2 ± 10,9	(*3)
CD43 (W3/13)	91,2 ± 6,0	82,6 ± 15,5	53,2 ± 27,3	52,0 ± 35,5	61,0 ± 32,3	(*3)
CD44 (OX49)	99,6 ± 0,5	259,3 ± 76,6	99,9 ± 0,1	200,8 ± 92,9	n.b.	n.b.
CD45 (OX1)	99,9 ± 1,3	282,4 ± 26,8	99,9 ± 0,3	301,3 ± 24,6	n.b.	n.b.

(\*1): indirekte Einfachfärbungen, Sekundär-AK: GαM-FITC. (\*3): indirekte Dreifachfärbungen, Sekundär-AK: GαM-PE, bei biotinylierten Primär-AK: SATC oder SAPE.

(\*2): NK-Zellen wurden aus LEW-Milzen isoliert, die B-Zellen wurden über Nylonwolle, die T-Zellen durch Panning oder MACS abgetrennt und die Zellen über Nacht mit IL-2 kultiviert. Vor der Analyse wurde das Auswertefenster anhand der Expression des NKR-P1-Moleküls bzw. der fehlenden Expression von CD3 oder TCRα/β auf die NK-Population gesetzt. Die Marker zur Abgrenzung antigenpositiver Zellen wurden anhand der GαM-Kontrollen gesetzt. Angegeben sind MW ± SAW (n ≥ 3).

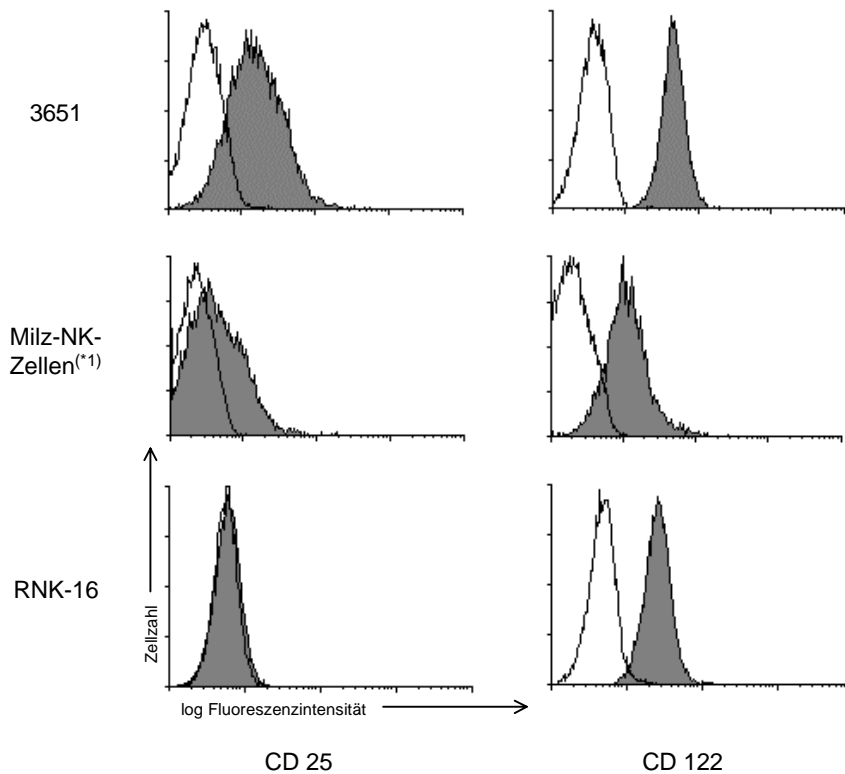
### 4.1.2 Expression des IL-2-Rezeptor-Komplexes

Im Gegensatz zu der NK-Tumorlinie RNK-16 wächst die Linie 3651 IL-2-abhängig. Es stellte sich daher die Frage, ob sich die differenten Wachstumsbedingungen in der Expression des IL-2-Rezeptors (IL-2R) widerspiegeln. Die Induktion der IL-2R $\alpha$ -Kette, die zur Ausbildung des hoch affinen IL-2Rs auf der Zellmembran führt, ist ein Marker für zelluläre Aktivierung. Vor diesem Hintergrund sollten anhand der Expression der  $\alpha$ -(CD25) und  $\beta$ -(CD122)-Kette des IL-2Rs die Aktivierungszustände der NK-Zellen miteinander verglichen werden.

Die Linien wurden unter Standardbedingungen kultiviert. Zur Anreicherung der NK-Zellen aus Milzen von LEW-Ratten wurden die B-Zellen über Nylonwolle und die T-Zellen über Panning oder MACS abgetrennt. Die Analyse der IL-2R-Expression erfolgte durchflußzytometrisch (anti-CD25: mAK OX39; anti-CD122: mAK L-316; Sekundär-Antikörper: G $\alpha$ M-FITC). Die Ergebnisse sind in **Tab. 4.1.2** und **Abb. 4.1.1** dargestellt.

Nahezu alle untersuchten NK-Zellen exprimierten die  $\beta$ -Kette des IL-2Rs. Hinsichtlich der CD25-Expression bestanden hingegen deutliche Unterschiede zwischen den betrachteten NK-Zellen. Während nur etwa 20% der Milz-NK-Zellen CD25 exprimierten, variierte der prozentuale Anteil der CD25-positiven Zellen der Linie 3651 in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer zwischen 50% (frisch aufgetaute Zellen der Linie) und 90%. Der Vergleich der Fluoreszenzintensitäten zeigte zudem, daß die Linie 3651 CD25 in höherer Dichte auf der Zelloberfläche exprimiert als die CD25-positive Population der Milz-NK-Zellen (3651:  $51,1 \pm 24,9$ ; Milz-NK:  $31,7 \pm 1,5$ ). Auf den Zellen der Linie RNK-16 konnte die Expression von CD25 nicht nachgewiesen werden.

Die zusammenfassende Betrachtung der CD25- und CD122-Expression zeigt, daß nahezu alle untersuchten NK-Zellen eine der beiden untersuchten Formen des IL-2Rs exprimierten. Während durchschnittlich etwa 50% der Zellen der Linie 3651 den hoch affinen und die andere Hälfte der Zellen den intermediär affinen IL-2R auf der Zelloberfläche trugen, lag der Anteil der den hoch affinen Rezeptor exprimierenden Milz-NK-Zellen nur bei ca. 20%, etwa 70% exprimierten die intermediär affine Form. Im Fall der Linie RNK-16 trugen alle Zellen den intermediär affinen IL-2R auf der Oberfläche. Aus diesen Befunden kann rückgeschlossen werden, daß die Kultivierung der Linie 3651 mit IL-2 zu der Expansion der CD25-positiven Population und begleitend zu der Erhöhung der CD25-Expressionsdichte geführt hat. Diese Linie repräsentiert somit im Vergleich zu frisch isolierten NK-Zellen und der Linie RNK-16 einen stärker aktivierten Zustand.



	IL-2R $\alpha$		IL-2R $\beta$	
	positive Zellen [%]	mean positive Population	positive Zellen [%]	mean positive Population
Linie 3651	81,7 $\pm$ 12,2	51,1 $\pm$ 24,9	91,3 $\pm$ 9,1	41,3 $\pm$ 14,0
Linie RNK-16	0	0	97,7 $\pm$ 2,1	32,6 $\pm$ 10,0
Milz-NK <sup>(*1)</sup>	19,9 $\pm$ 2,4	31,7 $\pm$ 1,5	90,4 $\pm$ 2,2	22,5 $\pm$ 4,9

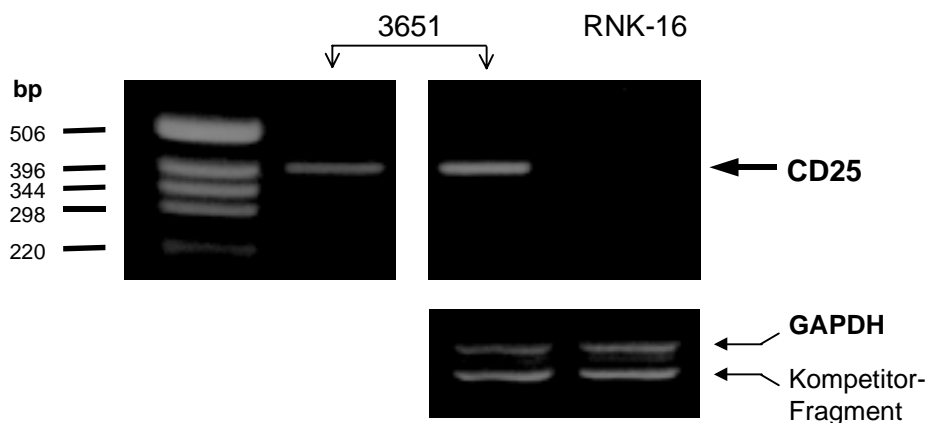
**Abb. 4.1.1 und Tab. 4.1.2: Vergleichende durchflußzytometrische Analyse der Expression von Untereinheiten des IL-2-Rezeptors auf der NK-Linie 3651**

Die FACS-Analyse erfolgte in indirekten Färbungen (CD25: mAK OX39; CD122: mAK L-316; G $\alpha$ M-FITC). In Abb. 4.1.2 sind die Histogramme der G $\alpha$ M-FITC-Kontrollen überlagert dargestellt. In Tab. 4.1.2 sind MW  $\pm$  SAW angegeben (n  $\geq$  5). (\*1): Die NK-Zell-Separation erfolgte aus Milzen (LEW) durch Abtrennung der B-Zellen über Nylonwolle und der T-Zellen durch Panning oder MACS. Die Zellen wurden über Nacht mit IL-2 kultiviert. Vor der Analyse der IL-2R-Expression wurde das Auswertefenster anhand der Expression des NKR-P1-Moleküls bzw. der fehlenden Expression von CD3 oder TCR $\alpha/\beta$  auf die NK-Population gesetzt.

Die Untersuchungen auf Proteinebene hatten gezeigt, daß die Zellen der Linie RNK-16 im Gegensatz zu der NK-Linie 3651 die  $\alpha$ -Kette des IL-2Rs nicht auf der Zelloberfläche exprimieren. Dieser Befund sollte auf mRNA-Ebene anhand RT-PCR überprüft werden.

Die NK-Zellen wurden wie bereits beschrieben kultiviert bzw. separiert. Nach der Lyse der Zellen wurde die Gesamt-RNA der verschiedenen Ansätze isoliert und in cDNA umgeschrieben. Vor der Analyse der CD25 cDNA wurden die Proben mittels kompetitiver RT-PCR auf vergleichbare GAPDH cDNA-Konzentrationen eingestellt. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in 2%igen ethidiumbromidhaltigen Agarosegelen. Die Ergebnisse sind in **Abb. 4.1.2** gezeigt.

Die RT-PCR-Analysen bestätigten die durchflußzytometrisch erhobenen Befunde; die Expression von CD25 konnte bei der Linie RNK-16 auch auf Ebene der Gentranskription nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte in den Gesamt-RNA-Extrakten der Linie 3651 CD25-mRNA detektiert werden.



**Abb. 4.1.2 RT-PCR-Analyse der CD25-Expression der NK-Linien 3651 und RNK-16.**

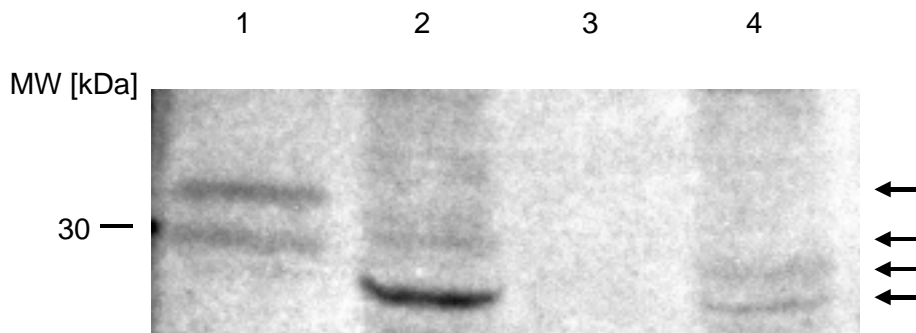
Aus jeweils  $5 \times 10^6$  Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert, je Ansatz wurden  $2 \mu\text{g}$  RNA in cDNA umgeschrieben. Jedem PCR-Reaktionsansatz ( $50 \mu\text{l}$ ) wurden  $1 \mu\text{l}$  der cDNA-Lösung zugesetzt. Die Proben wurden anhand kompetitiver GAPDH-RT-PCR ( $100 \text{ fg}$  Kompetitor) auf vergleichbare cDNA-Konzentrationen eingestellt. Mit den normierten Proben wurde im Anschluß eine CD25-PCR ohne Zusatz von Kompetitor durchgeführt. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in 2%igen ethidiumbromidhaltigen Agarosegelen.

### 4.1.3 RT6-Expression

Die Linie 3651 wurde aus NK-Zellen des Ratten-Inzuchtstammes LEW generiert, der das RT6<sup>a</sup> Allel trägt. Die aus homozygoten F344-Ratten stammende NK-Tumor-Linie RNK-16 exprimiert das RT6<sup>b</sup> Allel. Von T-Zellen exprimiertes, nicht glykosyliertes RT6 besitzt ein apparentes Molekulargewicht von 24-28 kDa (reduzierende Bedingungen). Im Gegensatz zu RT6.2 tritt RT6.1 bei T-Zellen zusätzlich in verschiedenen glykosylierten Varianten auf (30-35 kDa, Koch et al., 1988). Vor diesem Hintergrund sollte das Molekulargewicht des von NK-Zellen exprimierten RT6 untersucht werden.

Nach biosynthetischer radioaktiver Proteinmarkierung (<sup>35</sup>S-Methionin und <sup>35</sup>S-Cystein) wurden RT6.1 bzw. RT6.2 aus Gesamtzell-Lysaten der NK-Linien 3651 und RNK-16 anhand monoklonaler anti-RT6-Antikörper bzw. eines gegen RT6.1 gerichteten Serums immunpräzipitiert (RT6.1: mAK 3G2 bzw. LEW6b  $\alpha$  LEW-Serum; RT6.2: mAK GY1/12). Der Nachweis der präzipitierten Proteine erfolgte nach ihrer Auftrennung unter reduzierenden Bedingungen mittels Autoradiographie. Die Ergebnisse sind in **Abb. 4.1.3** dargestellt.

In Analogie zu den mit T-Zellen erhaltenen Befunden (Crisa et al., 1990) konnte RT6.2 in den Lysaten der Linie RNK-16 mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 24-26 kDa nachgewiesen werden. Nach Präzipitation von RT6.1 mit LEW6b $\alpha$ LEW-Serum traten aus den Zell-Lysaten der Linie 3651 zwei relativ starke Banden mit einem apparenten Molekulargewicht von ~30-35 kDa auf, die vermutlich verschieden glykosylierte Varianten von RT6.1 repräsentieren. Zusätzlich konnte eine sehr schwache Bande von etwa 26 kDa nachgewiesen werden, bei der es sich um das unglykosylierte Protein handeln könnte. Die Präzipitation mit dem monoklonalen anti-RT6.1-Antikörper (3G2) resultierte in einer ~25 kDa- und einer ~30 kDa-Bande. Diese Befunde deuten darauf hin, daß die NK-Linie 3651 RT6.1 unglykosyliert und zusätzlich in verschiedenen glykosylierten Varianten exprimiert, während RT6.2 in Gesamtlysaten der Linie RNK-16 anscheinend nur in nicht glykosylierter Form nachgewiesen werden konnte.

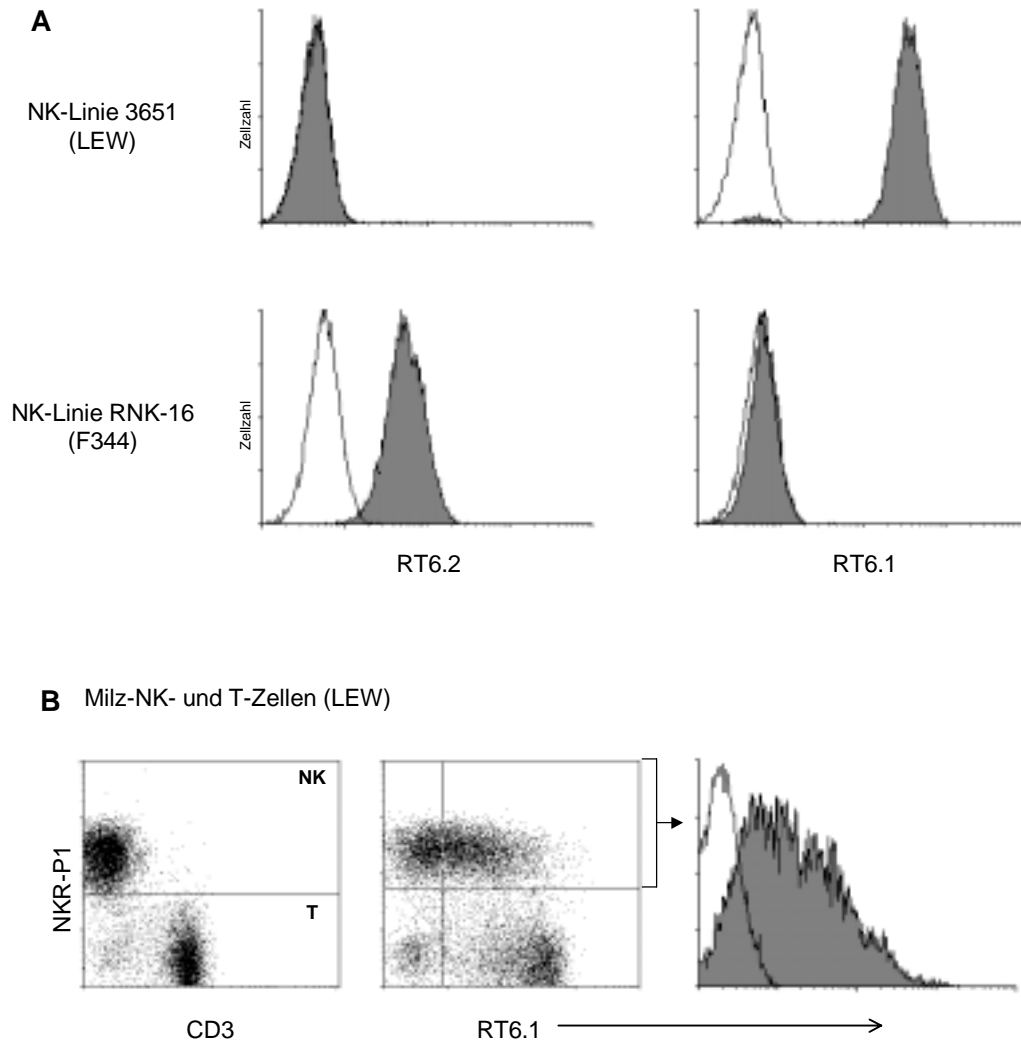


**Abb. 4.1.3: Immunpräzipitation von RT6.1 bzw. RT6.2 aus den NK-Linien 3651 und RNK-16**

20 x 10<sup>6</sup> Zellen der NK-Linien 3651 und RNK-16 wurden über Nacht in Gegenwart von <sup>35</sup>S-Methionin und <sup>35</sup>S-Cystein kultiviert und am darauffolgenden Tag abzentrifugiert und lysiert. Nach Abzentrifugieren der Kerne wurden die Lysate mit einem irrelevanten IgG1- (Lysate der Linie 3651) bzw. IgG2c-mAK (Lysate der Linie RNK-16) und Protein A-Sepharose vorgereinigt. Anschließend wurden RT6.1 bzw. RT6.2 mit spezifischen mAK (3G2 bzw. GY1/12) bzw. anti-RT6.1-Serum (LEW6b α LEW) und Protein A-Sepharose präzipitiert. Die Auftrennung der präzipitierten Proteine erfolgte unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE. Gezeigt ist die Autoradiographie eines 15%igen Polyacrylamidgels.

- 1 NK-Linie 3651, Immunpräzipitation mit LEW6b α LEW-Serum
- 2 NK-Linie 3651, Immunpräzipitation mit anti-RT6.1 mAK
- 3 NK-Linie 3651, Immunpräzipitation mit irrelevantem Antikörper (IgG1)
- 4 NK-Linie RNK-16, Immunpräzipitation mit GY1/12

Die RT6-Oberflächenexpression der NK-Linien und von Milz-NK-Zellen 3651 wurde durchflußzytometrisch (anti-RT6.1: 3G2; anti-RT6.2: GY1/12) untersucht. Die Ergebnisse der Analysen sind in **Abb. 4.1.4** und **Tab. 4.1.3** dargestellt. Die Zellen der Linie 3651 tragen, wie erwartet, RT6.1, aber nicht RT6.2 auf der Zelloberfläche. Die Zellen der NK-Tumor-Linie RNK-16 sind hingegen RT6.1-negativ, exprimieren aber RT6.2. Der Anteil der RT6-positiven Zellen an der Gesamtpopulation beträgt bei beiden Linien annähernd 100% (3651: 97,3% ± 3; RNK-16: 98,4% ± 2). Hingegen trägt nur eine Subpopulation der Milz-NK-Zellen (50,6% ± 9) das RT6.1-Molekül auf der Zelloberfläche. Zudem exprimiert die RT6<sup>+</sup>-Population der Milz-NK-Zellen RT6.1 in wesentlich geringerer Dichte als die Linie 3651 (mean: 74,5 ± 24 bzw. 414,6 ± 81). Dieser Befund läßt den Rückschluß zu, daß die Langzeit-Kultivierung der NK-Zellen mit IL-2 zu der Zunahme der RT6-positiven Zellen und zudem zu einer Erhöhung der RT6-Expressionsdichte auf dieser NK-Population geführt hat.



**Abb. 4.1.4: Durchflußzytometrische Analyse der RT6-Expression der NK-Linien 3651 und RNK-16 und Milz-NK- und T-Zellen einer LEW-Ratte.**

**A** Die Analyse der RT6-Expression erfolgte durch Färbung mit anti-RT6.1-mAK (3G2) bzw. anti-RT6.2-mAK (GY1/12) und G $\alpha$ R-FITC. Die G $\alpha$ R-FITC-Kontrollen sind überlagert dargestellt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus einer Gruppe ( $n \geq 17$ ). **B** NK- und T-Zellen wurden aus der Milz einer LEW-Ratte (RT6<sup>a</sup>) isoliert. Die NK- und T-Zell-Populationen wurden anhand ihrer unterschiedlichen NKR-P1- (mAK 3.2.3-bio+SAPE) und CD3-Expression (mAK G-418+G $\alpha$ M-FITC) dargestellt. In einer weiteren Doppelfärbung wurde RT6.1 (mAK 3G2+G $\alpha$ R-FITC) zusammen mit NKR-P1 nachgewiesen. NK- und T-Zellen bzw. antigenpositive und -negative Zellen wurden durch das Setzen von Quadranten abgegrenzt. Zur Darstellung der RT6.1-Expression der NK-Population in einem Histogramm wurde das Auswertefenster vor der Auswertung der grünen Fluoreszenzsignale auf die NK-Population gesetzt. Die G $\alpha$ R-FITC-Kontrolle ist überlagert dargestellt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus einer Gruppe ( $n=4$ ).



**Tab. 4.1.3: RT6-Expression der NK-Linien 3651 und RNK-16 und von Milz-NK-Zellen (LEW)**

untersuchte NK-Zellen	RT6.1		RT6.2	
	Anteil positiver Zellen [%]	mean <sup>(*3)</sup>	Anteil positiver Zellen [%]	mean <sup>(*3)</sup>
NK-Linie 3651 (LEW) <sup>(*1)</sup>	97,3 ± 3,4	414,6 ± 80,8	0	-
Milz-NK-Zellen (LEW) <sup>(*2)</sup>	50,6 ± 9,1	74,5 ± 23,7	0	-
NK-Linie RNK-16 (F344) <sup>(*1)</sup>	0	-	98,4 ± 1,5	75,8 ± 18,2

(\*1) Die Analyse der RT6-Expression erfolgte durchflußzytometrisch (anti-RT6.1: mAK 3G2; anti-RT6.2: mAK GY1/12 + G $\alpha$ R-FITC). Die Marker zur Abgrenzung der RT6-positiven Zellen wurden anhand der G $\alpha$ R-FITC-Kontrollen gesetzt. Angegeben sind MW  $\pm$  SAW; NK-Linie 3651: n=23; NK-Linie RNK-16: n= 17.

(\*2) Die NK-Zellen wurden aus Milzen von LEW-Ratten (RT6<sup>a</sup>) isoliert. Die NK-Zell-Population wurde in einer Doppel- oder Dreifachfärbung anhand der NKR-P1- (mAK 3.2.3) und CD3 (mAK G-418)- bzw. TCR $\alpha$ / $\beta$ - (mAK R73) Expression von der T-Zell-Population abgegrenzt. In der darauffolgenden durchflußzytometrischen Analyse der RT6-Expression (mAK 3G2 bzw. GY1/12) wurde das Auswertefenster auf die NK-Zell-Population gesetzt. Die Abgrenzung der RT6-positiven Zellen erfolgte anhand der G $\alpha$ R-FITC-Kontrollen. Anzahl der ausgewerteten Experimente: n=4.

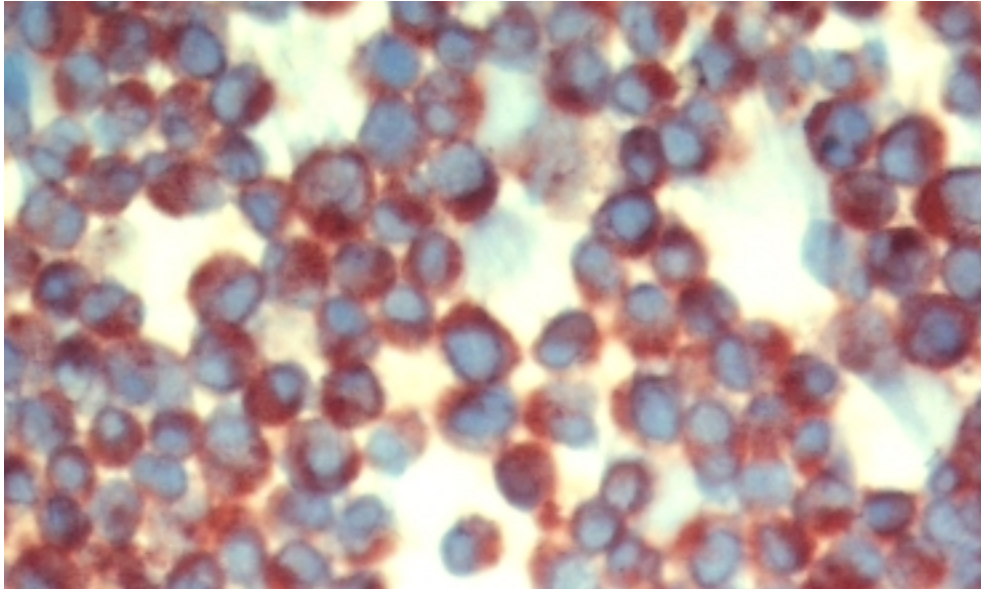
(\*3) Mittlere Fluoreszenzintensität (mean) der RT6-positiven Population. Angegeben sind MW  $\pm$  SAW.

Die immunzytologische Untersuchung der RT6.1-Expression der Linie 3651 bestätigte die anhand Durchflußzytometrie erhaltenen Ergebnisse.

Der Nachweis der RT6.1-Moleküle erfolgte durch schrittweise Inkubation der Präparate mit RT6.1-mAK (3G2), einem mit Merettich-Peroxidase gekoppeltem Sekundär-Antikörper (G $\alpha$ R-POX) und anschließender Zugabe des zur Farbentwicklung führenden Substratgemisches (3-Amino-9-Ethylcarbazol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Im Anschluß wurden die Zellkerne mit Hämalaun nach Weigert gegengefärbt.

Wie in **Abb. 4.1.5** gezeigt, exprimierten alle Zellen der Linie 3651 RT6.1. Neben der Zellmembran wurde auch das Zytoplasma der Zellen stark angefärbt. Kontrollfärbungen der Zellen mit Sekundärantikörper bzw. mit einem irrelevanten Isotyp-Kontrollantikörper (IgG1)

und Sekundärantikörper waren negativ (Daten nicht gezeigt); eine unspezifische Anfärbung der Zellen konnte daher ausgeschlossen werden.



**Abb. 4.1.5 Immunzytologische Analyse der RT6.1-Expression von Zellen der NK-Linie 3651**

Zytopräparate der Linie 3651 wurden schrittweise mit anti-RT6.1 mAK (3G2), G $\alpha$ R-Peroxidase und AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hämalaun nach Weigert.

RT6.1 und RT6.2 konnten bereits in löslicher Form (sRT6) im Serum verschiedener Rattenstämme nachgewiesen werden. Aus Untersuchungen mit thymektomierten und eviszerierten Ratten wurde abgeleitet, daß die Hauptquelle für sRT6.1 intraepitheliale Lymphozyten und nicht, wie zunächst angenommen, periphere T-Zellen sind (Lesma et al., 1998). In diesen Untersuchungen wurde jedoch nicht berücksichtigt, daß auch RT6-positive NK-Zellen als Quelle für sRT6 in Betracht kommen. Vor diesem Hintergrund wurden die Kulturüberstände der NK-Linie 3651 auf RT6.1 untersucht.

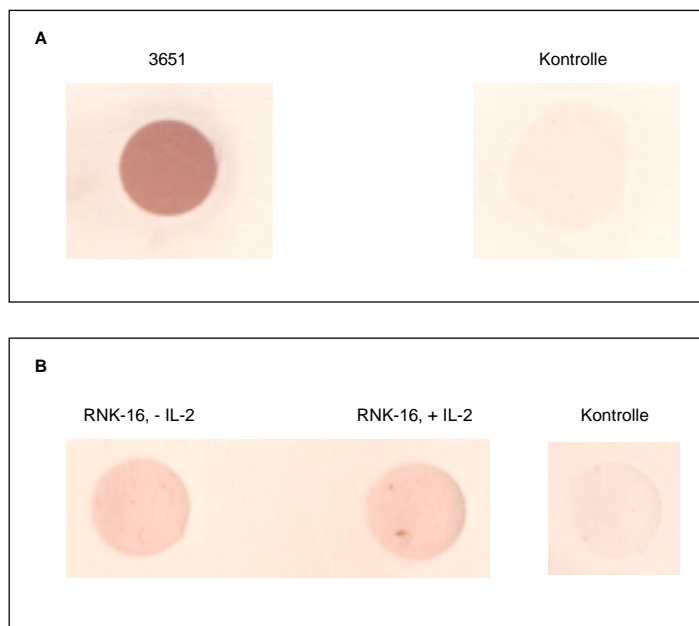
Zellen der Linie 3651 wurden 72 h unter Standardbedingungen kultiviert. Der zellfreie Kulturüberstand wurde anhand einer Dot-Blot-Apparatur durch eine Nitrozellulose-Membran gesaugt. Die im Überstand enthaltenen, löslichen Proteine wurden auf diesem Weg punktförmig auf der Membran immobilisiert und konnten in einer sich anschließenden Immunfärbung (anti-RT6.1 mAK 3G2 + G $\alpha$ R-Peroxidase + AEC) auf sRT6.1 untersucht werden. Das Ergebnis eines repräsentativen Protein-Dot-Blots ist in **Abb. 4.1.6 A** dargestellt.

Im Kulturüberstand der Linie 3651 konnte RT6.1 nachgewiesen werden. Der als Negativ-Kontrolle dienende Dot des Kulturüberstandes der RT6.1-negativen Linie RNK-16 wurde nicht angefärbt; eine unspezifische Farbreaktion kann daher ausgeschlossen werden. Dieses Ergebnis zeigt, daß die NK-Zellen der Linie 3651 RT6.1 in das Medium freisetzen.

Die Signale und Mechanismen, die zu der bei vielen GPI-verankerten Molekülen beobachteten Freisetzung von der Zelloberfläche führen, sind weitestgehend unbekannt. Die Stimulation von Zellen mit verschiedenen endokrinen und parakrinen Molekülen, darunter IL-2, scheint in vielen Fällen zu einer signalvermittelten Freisetzung GPI-verankerter Moleküle von der Zellmembran zu führen (Übersicht in: Nosjean et al., 1997). Da die Linie 3651 IL-2-abhängig wächst, könnte die beobachtete Freisetzung von RT6.1 somit unter anderem auf die Stimulation der Zellen durch dieses Interleukin zurückgehen. Diese Überlegung warf die Frage auf, ob auch die IL-2-unabhängig wachsende Linie RNK-16 RT6 in das Kulturmedium freisetzt. Begleitend sollte der Einfluß von IL-2 auf die Freisetzung von RT6.2 untersucht werden.

Zellen der NK-Linie RNK-16 wurden insgesamt 7 Tage ohne IL-2 bzw. in Gegenwart von IL-2 kultiviert. Nach 4 Tagen wurde das Medium erneuert und die Zellen für weitere 72 h mit bzw. ohne IL-2 kultiviert. In einem Kontrollansatz wurden begleitend Zellen der Linie 3651 in gleicher Zelldichte mitgeführt. Die zellfreien Kulturüberstände wurden mittels Protein-Dot-Blot und anschließender Immunfärbung (anti-RT6.2-mAK GY1/12 + G $\alpha$ R-Peroxidase+AEC) auf RT6.2 untersucht. Die Ergebnisse eines repräsentativen Blots sind in **Abb. 4.1.6 B** dargestellt.

In den Kulturüberständen der Linie RNK-16 konnte RT6.2 nachgewiesen werden; der als Negativ-Kontrolle dienende Überstand der RT6.2-negativen Linie 3651 wurde nicht angefärbt. Die farblichen Intensitäten der Dots der Überstände der mit bzw. ohne IL-2 kultivierten Zellen waren vergleichbar. Vorversuche hatten gezeigt, daß die Variation der Zelldichte oder der auf die Membran aufgetragenen Menge an Kulturüberstand deutliche Unterschiede in der Intensität der Farbreaktion zur Folge hat. Somit können aus der Farbintensität verschiedener Dots einer Färbung vergleichende Rückschlüsse auf die in den Überständen enthaltenen Mengen an sRT6 gezogen werden. Zudem hatten Voruntersuchungen ( $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbau) ergeben, daß IL-2 keinen Einfluß auf das proliferative Verhalten der Linie RNK-16 hat (Daten nicht gezeigt). Aus den vorliegenden Befunden kann daher rückgeschlossen werden, daß IL-2 keinen in diesem experimentellen System nachweisbaren Effekt auf die Freisetzung von RT6.2 durch die Linie RNK-16 hatte.



**Abb. 4.1.6 Nachweis von RT6 im Kulturüberstand der Linien 3651 und RNK-16 mittels Protein-Dot-Blot und Immunfärbung**

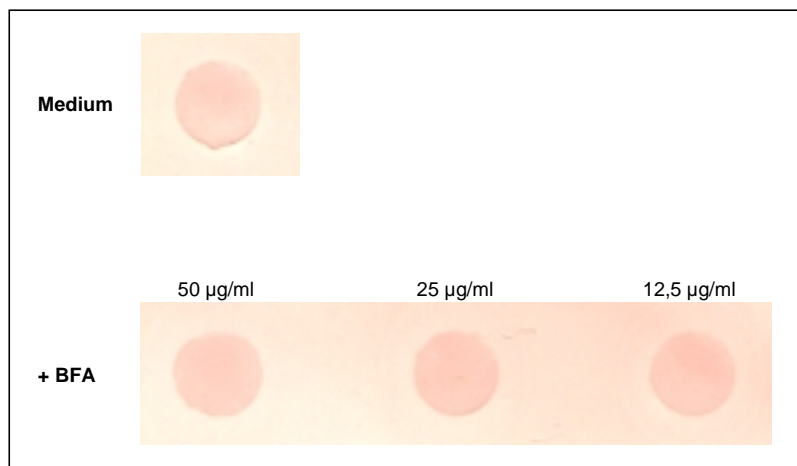
Jeweils 1 ml der zellfreien Kulturüberstandes wurde anhand einer Dot-Blot-Apparatur durch eine Nitrozellulose-Membran gesaugt. Der Nachweis der RT6.1-Moleküle erfolgte durch schrittweise Inkubation mit anti-RT6.1 mAK (3G2) bzw. anti-RT6.2 mAK (GY1/12), G $\alpha$ R-POX und AEC.

- A:** Zellen der Linie 3651 ( $0,8 \times 10^6$  Zellen/ml Medium) wurden 72 h kultiviert. Als Negativ-Kontrolle diente Kulturüberstand der NK-Linie RNK-16.
- B:** Zellen der Linie RNK-16 ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml Medium) wurden 7 Tage ohne, bzw. unter Zusatz von IL-2 bei 37°C kultiviert. Als Negativ-Kontrolle diente Kulturüberstand der NK-Linie 3651.

Die beobachtete Freisetzung von RT6.1 durch die NK-Linie 3651 kann zum einen auf die enzymatische Abspaltung des Moleküls von der Zellmembran, zum anderen auf exozytotische Sekretion zurückgehen. Zur Klärung der Frage nach dem zugrundeliegenden Mechanismus wurde der Effekt von Brefeldin A (BFA), eines Inhibitors des vesikulären intrazellulären Transportes und der Exozytose, auf die Freisetzung von RT6.1 durch die Linie 3651 untersucht.

Zellen der Linie 3651 wurden 7 h in Gegenwart verschiedener BFA-Konzentrationen (50; 25; 12,5 mg/ml) bzw. ohne Zusatz von BFA kultiviert. Der Nachweis von sRT6.1 in den zellfreien Kulturüberständen erfolgte mittels Protein-Dot-Blot und anschließender Immunfärbung.

Wie in **Abb. 4.1.7** gezeigt, unterscheiden sich die farblichen Intensitäten der verschiedenen Dots nicht; somit hatte die Inkubation der NK-Zellen mit BFA keinen in diesem experimentellen System meßbaren Effekt auf die Freisetzung von RT6.1. Dieser Befund deutet darauf hin, daß RT6.1 von den NK-Zellen der Linie 3651 nicht exozytotisch, sondern vermutlich durch Spaltung des GPI-Ankers über Phospholipasen oder des Proteins über Proteasen an das Kulturmedium abgegeben wird.



**Abb. 4.1.7 Untersuchung des Effektes von Brefeldin A auf die Freisetzung von RT6.1 durch die NK-Linie 3651 mittels Protein-Dot-Blot und Immunfärbung**

Zellen der Linie 3651 ( $5 \times 10^6$  Zellen/ml Medium) wurden 7 h unter Zusatz verschiedener BFA-Konzentrationen (50; 25; 12,5 µg/ml) bzw. ohne BFA kultiviert. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen wurden jeweils 600 µl des Kulturüberstandes anhand einer Dot-Blot-Apparatur durch eine Nitrozellulose-Membran gesaugt. Der Nachweis der auf der Membran gebundenen RT6.1-Moleküle erfolgte durch schrittweise Inkubation mit anti-RT6.1 mAK (3G2), G $\alpha$ R-POX und AEC.

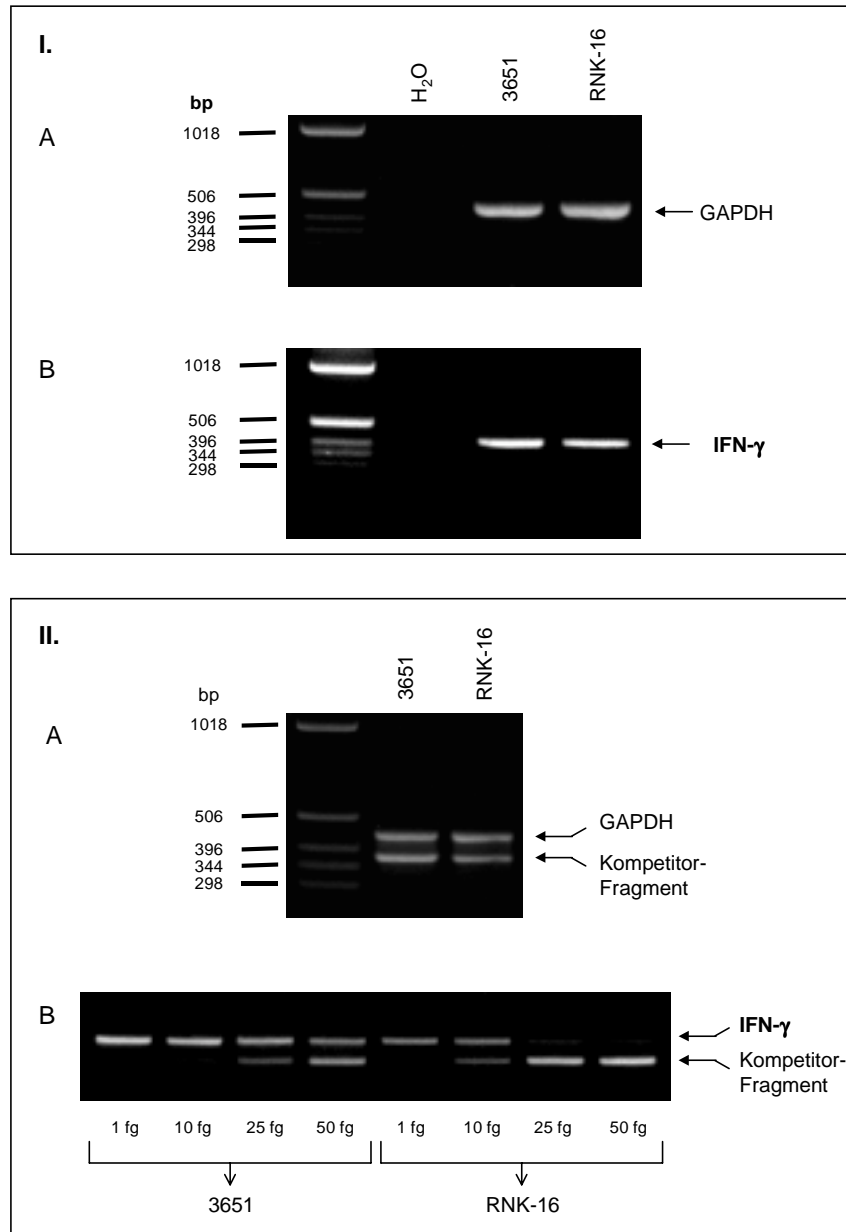
#### 4.1.4 Zytokin-Expression

Die Analyse der Zytokin-Expression der NK-Linien erfolgte auf Ebene der Gentranskription anhand RT-PCR und auf Proteinebene mittels ELISA.

Zellen beider Linien wurden unter Standardbedingungen kultiviert, abzentrifugiert und lysiert. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Proben wurden zunächst mittels kompetitiver RT-PCR auf vergleichbare GAPDH-cDNA-Konzentrationen eingestellt. Die Analyse der Zytokin-Expression erfolgte sowohl semiquantitativ als auch kompetitiv.

Wie in **Abb. 4.1.8** gezeigt, konnte in den Gesamt-RNA-Extrakten beider Linien IFN- $\gamma$ -mRNA nachgewiesen werden. Die kompetitive RT-PCR-Analyse zeigte zudem, daß die Linie RNK-16 IFN- $\gamma$  in wesentlich schwächerem Ausmaß (ca. Faktor 5) exprimiert, als die NK-Linie 3651. Die Koamplifikation von cDNA Proben beider Linien mit verschiedenen Kompetitor-Mengen (1, 10, 25, 50 fg) lieferte für die Linie 3651 eine Doppelbande bei einer Kompetitor-Menge von 50 fg/PCR-Ansatz, während die Doppelbande bei der cDNA der Linie RNK-16 bereits bei einem Zusatz von 10 fg Kompetitor auftrat (**Abb. 4. 1.8 II, B**). NK-Zellen steigern die IFN- $\gamma$ -Transkription und Gleichgewichts- mRNA-Level unter anderem als Antwort auf IL-2 (Farrar et al., 1986). Die unterschiedliche IFN- $\gamma$ -Expression kann somit eine Konsequenz der unterschiedlichen Wachstumsbedingungen der untersuchten NK-Linien sein. Einen weiteren Unterschied hinsichtlich der Zytokin-Expression beider NK-Linien lieferte die Untersuchung der IL-4-mRNA-Synthese. Während in den mRNA-Extrakten der Linie 3651 IL-4-mRNA nicht nachgewiesen werden konnte, exprimiert die Linie RNK-16 IL-4 in geringem Ausmaß (**Abb. 4.1.8 III**).

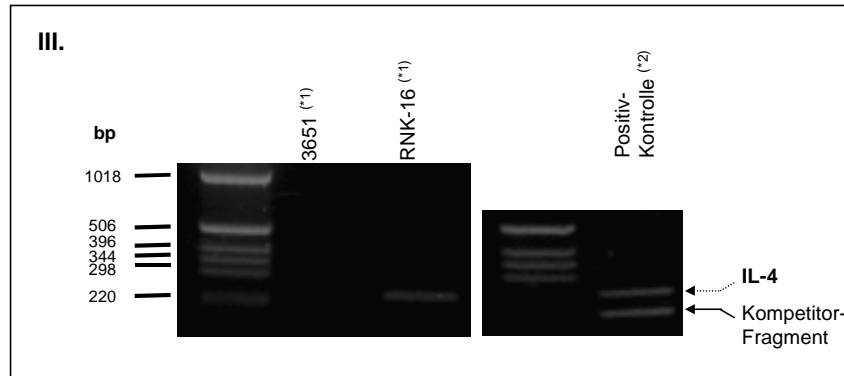
Die Analyse der TNF- $\alpha$ -Expression lieferte bei der Linie 3651 nur in einigen Experimenten schwache Signale, in dem Großteil der Versuche konnte bei diesen Zellen sowie der Linie RNK-16 TNF- $\alpha$ -mRNA nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Bei beiden NK-Linien konnte weder die Expression von IL-10, noch IL-1 $\beta$  gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 4.1.8: Vergleichende Analyse der IFN- $\gamma$  und IL-4-Expression der NK-Linien 3651 und RNK-16 anhand RT-PCR**

Zellen der Linien 3651 und RNK-16 wurden unter Standardbedingungen kultiviert. Aus jeweils  $5 \times 10^6$  Zellen wurden Gesamt-RNA-Extrakte hergestellt. Pro Ansatz wurden 2  $\mu\text{g}$  RNA in cDNA umgeschrieben und diese als Ausgangsmaterial für die 50  $\mu\text{l}$  Reaktionsvolumen umfassenden PCR-Reaktionen verwendet. Jeweils 10  $\mu\text{l}$  der PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem mit Ethidiumbromid versetzten, 2%igen Agarosegel aufgetrennt und die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht.

- I** Die Proben wurden anhand der GAPDH-Expression auf vergleichbare cDNA-Konzentrationen eingestellt (**A**). Mit den normierten Proben wurde im Anschluß eine IFN- $\gamma$ -PCR ohne Zusatz von Kompetitor durchgeführt (**B**).
- II** Die Proben wurden vor der Analyse der IFN- $\gamma$ -cDNA anhand kompetitiver GAPDH-RT-PCR (je Probe 100 fg Kompetitor-Fragment) auf vergleichbare cDNA-Konzentrationen eingestellt (**A**). Im Anschluß wurde jede Probe mit verschiedenen Kompetitor-Mengen (1, 10, 25 und 50 fg) koamplifiziert (**B**).



**Abb. 4.1.8, III** (\*1): Die Proben wurden vor der Analyse der IL-4-cDNA anhand kompetitiver GAPDH-RT-PCR auf vergleichbare cDNA-Konzentrationen eingestellt (Daten nicht gezeigt). Im Anschluß wurde mit den normierten Proben eine IL-4-RT-PCR ohne Zusatz von Kompetitor durchgeführt. (\*2): Aus peripheren Blut-Lymphozyten (PBL, Ratte) wurde im Verlauf einer akuten Abstoßung Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und unter Zusatz von Kompetitor (10 ag) eine IL-4-RT-PCR durchgeführt.

Basierend auf den RT-PCR-Befunden zur Zytokin-Expression der NK-Linien wurden auf Proteinebene nur die Synthese von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  untersucht.

Zellen der Linien 3651 und RNK-16 wurden 4, 8 und 24 h unter Standardbedingungen kultiviert. Zu den gegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen abzentrifugiert und die zellfreien Kulturüberstände mittels ELISA analysiert. Die Ergebnisse sind in **Tab. 4.1.4** dargestellt; die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf eine initiale Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml Kulturmedium.

Im Überstand der Linie 3651 konnten bereits nach 4-stündiger Kultivierung der Zellen geringe Mengen an IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden ( $54,4 \pm 39,4$  pg/ml). Im weiteren Verlauf des Experimentes reicherte sich IFN- $\gamma$  im Überstand der Zellen an (8 h:  $228,3 \pm 230,2$  pg/ml; 24 h:  $330,2 \pm 277,9$  pg/ml). Dieses Ergebnis zeigt, daß zwei wichtige NK-Effektor-Funktionen, nämlich das zytotoxische Potential und die IFN- $\gamma$ -Freisetzung, bei der Linie 3651 nicht koordiniert reguliert werden. In den Kulturüberständen der Linie RNK-16 konnten zu keinem Zeitpunkt des Experimentes signifikante Mengen an IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden (Nachweisgrenze des Assays:  $< 13$  pg/ml). Die IFN- $\gamma$ -Freisetzung beider Linien spiegelt somit deren unterschiedliche IFN- $\gamma$ -mRNA-Expression wider (**Abb. 4.1.8 II, B**). Die ELISA-Ergebnisse zeigen zudem, daß die Translation der IFN- $\gamma$ -mRNA bei der Linie RNK-16 trotz der eindeutig nachgewiesenen Expression auf mRNA-Ebene nur in geringem Ausmaß bzw. gar nicht abläuft. Dieser Befund deutet darauf hin, daß die Regulation der IFN- $\gamma$ -Expression



bei den Zellen der Linie RNK-16 auf der Ebene der Proteinsynthese oder später stattfindet. Beide Linien setzten im betrachteten Zeitraum keine oberhalb der Nachweisgrenze des Assays ( $< 4$  pg/ml) liegenden Mengen an TNF- $\alpha$  in das sie umgebende Medium frei.

**Tab. 4.1.4: Analyse der Freisetzung von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  durch die NK-Linien 3651 und RNK-16**

Dauer der Kultur [h]	Zytokin-Freisetzung			
	NK-Linie 3651		NK-Linie RNK-16	
	IFN- $\gamma$ <sup>(*1)</sup> [pg/ml]	TNF- $\alpha$ <sup>(*2)</sup> [pg/ml]	IFN- $\gamma$ <sup>(*3)</sup> [pg/ml]	TNF- $\alpha$ <sup>(*4)</sup> [pg/ml]
4	54,4 $\pm$ 39,4	0	0	0
8	228,3 $\pm$ 230,2	6,0 $\pm$ 8,4	0	0
24	330,2 $\pm$ 277,9	0	2,0 $\pm$ 2,8	1,4 $\pm$ 1,2

Zellen der NK-Linien 3651 und RNK-16 wurden unter Standardbedingungen 4, 8 und 24 h kultiviert. Im Anschluß wurden die IFN- $\gamma$  bzw. TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in den zellfreien Kulturüberständen mittels ELISA bestimmt. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich jeweils auf eine initiale Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml Kulturmedium.

Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung; (\*1): n = 4; (\*3): n = 6; (\*2) und (\*4): n = 3

## 4.2 Einfluß der RT6-Kreuzvernetzung auf NK-Zell-Funktionen

Die Kreuzvernetzung von RT6 auf T-Zellen in Gegenwart von IL-2 bzw. Phorboltester hat eine gesteigerte Proliferation und die verstärkte Expression der  $\alpha$ -Untereinheit des IL-2-Rezeptors zur Folge (Rigby et al., 1996b). RT6 scheint somit an molekularen Ereignissen beteiligt zu sein, die in der Aktivierung der T-Zellen resultieren. Vor diesem Hintergrund sollte untersucht werden, ob auch auf NK-Zellen exprimiertes RT6 in der Lage ist, Signale zu übermitteln, die Zellfunktionen modulieren.

Die Untersuchung der Signalkapazitäten von RT6 erfolgte im *in vitro* Modellsystem der antikörpervermittelten Kreuzvernetzung. Die Mechanismen, über die GPI-verankerte Proteine Signale übermitteln, sind unbekannt. Der erste Schritt der Signalübertragung scheint jedoch eine aus der Ligandenbindung resultierende Aggregation des GPI-verankerten Proteins zu sein (Horejsi et al., 1999). Die Kreuzvernetzung GPI-verankerter Moleküle durch Antikörper führt zu ihrer Aggregation und somit zu einem Ereignis, das der Bindung des natürlichen Liganden *in vivo* ähnelt. Dieses Modellsystem bietet somit die Möglichkeit, die aus der Ligandenbindung resultierenden zellulären Ereignisse zu untersuchen.

NK-Zellen exprimieren den Fc-Rezeptor Fc $\gamma$ RIII (CD16), über den mit Antikörper beladene Zielzellen erkannt werden. Die Wechselwirkung der ligandenbindenden  $\alpha$ -Kette (CD16) mit Antikörper-beladenen Zielzellen, Immunkomplexen oder anti-CD16-mAK induzierte in humanen NK-Zellen die Transkription des CD25-Gens und die Oberflächen-Expression der IL-2R $\alpha$ -Kette und führte zudem zu der verstärkten Freisetzung von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  (Anegon et al., 1988). Eine Möglichkeit, die Bindung der Antikörper an Fc-Rezeptoren zu verhindern, ist der Einsatz spezifisch gegen CD16 gerichteter, den Rezeptor blockierender Antikörper. Für die Ratte sind bislang jedoch keine derartigen Antikörper gegen CD16 kommerziell erhältlich. Bei der Kreuzvernetzung von RT6 mußten daher auch eventuelle Fc-Rezeptor-vermittelte Effekte auf die untersuchten Zellfunktionen berücksichtigt werden. Um derartige Effekte beurteilen zu können (siehe auch 5.6), wurden in allen Experimenten Isotyp-Kontrollansätze mitgeführt, in denen die Zellen in Gegenwart eines immobilisierten Isotyp-Kontrollantikörpers (IgG1 bzw. IgG2c) kultiviert wurden, dessen zugehöriges Epitop nicht auf den betrachteten NK-Zellen exprimiert wurde. Eine fehlende Bindung der Isotyp-Kontrollantikörper an die NK-Linien und Milz-NK-Zellen wurde durchflußzytometrisch überprüft (Zellen + IgG1- bzw. IgG2c-Kontroll-AK + G $\alpha$ R-FITC). In Negativ-Kontrollansätzen wurden die NK-Zellen ohne Antikörper unter identischen Bedingungen kultiviert.

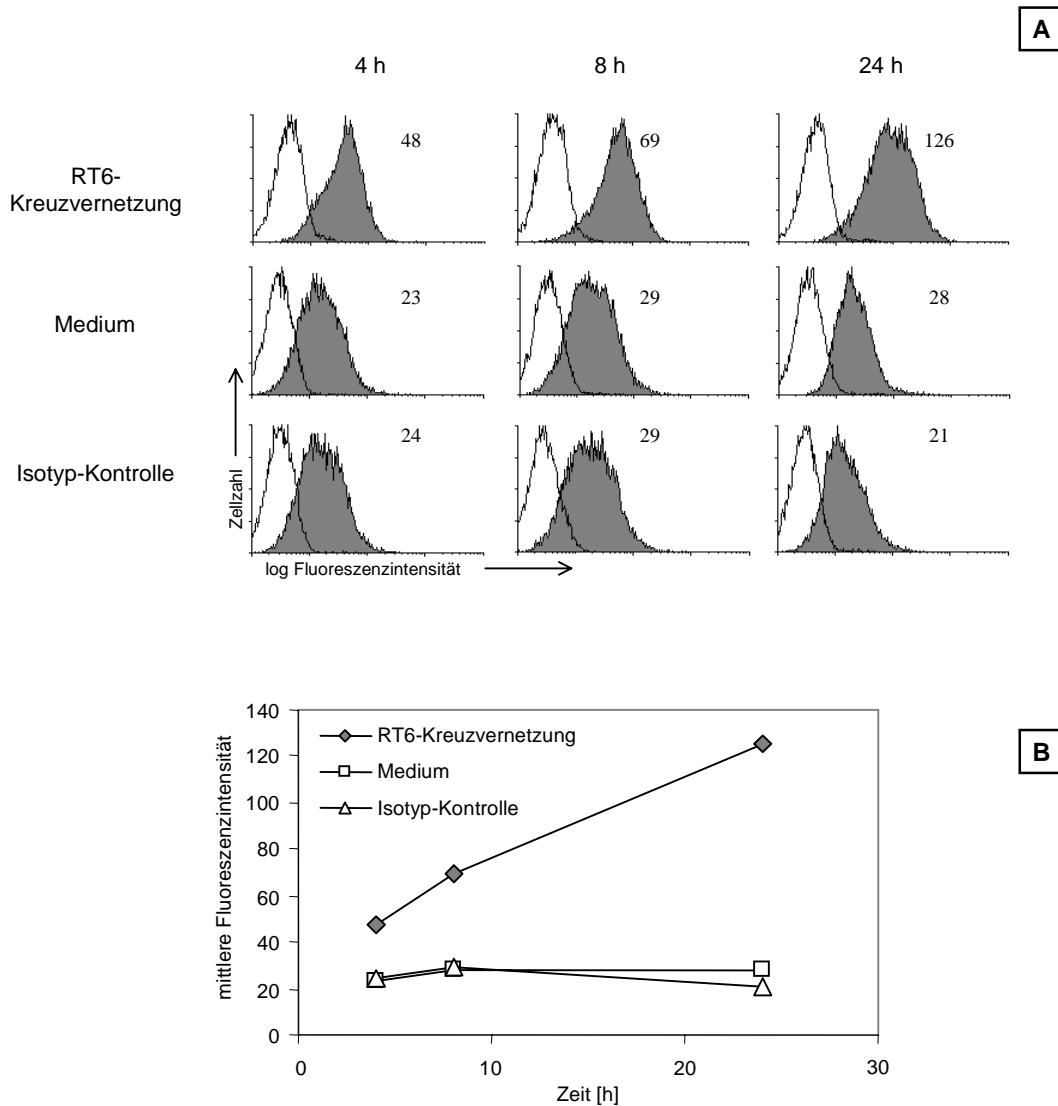
#### 4.2.1 Induktion des hoch affinen IL-2-Rezeptor-Komplexes

Ruhende NK-Zellen exprimieren konstitutiv intermediär affine IL-2-Rezeptoren (IL-2R) bestehend aus den Untereinheiten IL-2R $\beta$  (CD122) und IL-2R $\gamma$  (CD132) (Phillips et al., 1989). Die Induktion der Expression der IL-2R $\alpha$ -Untereinheit (CD25), die zur Ausbildung des hoch affinen IL-2Rs auf der Zelloberfläche führt, ist ein zuverlässiger Marker für zelluläre Aktivierung (Siegel et al., 1987). Um der Frage nachzugehen, ob die Kreuzvernetzung von RT6 zu einer Reaktivitätsänderung der NK-Zellen führt, wurde ihr Effekt auf die Expression der unterschiedlich affinen Formen des IL-2Rs untersucht.

Die NK-Linie 3651 wurde 4, 8 und 24 h in Gegenwart von immobilisiertem RT6.1-Antikörper (3G2) bzw. ohne Zusatz von Antikörper (Negativ-Kontrollansätze) kultiviert. Isotyp-Kontrollansätze wurden mitgeführt (siehe 4.2). Die Analyse der Expression der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit des IL-2Rs erfolgte durchflußzytometrisch in einer indirekten Färbung mit den mAK OX39 (anti-CD25) bzw. L-316 (anti-CD122) und G $\alpha$ M-FITC.

Die Kreuzvernetzung von RT6.1 auf der Linie 3651 induzierte bereits nach 4 h einen Anstieg des prozentualen Anteils der CD25-positiven Population von  $74\% \pm 17$  (Negativ-Kontrolle) auf  $92\% \pm 8$  (**Tab. 4.2.1, Abb. 4.2.1**). Im weiteren Verlauf der Stimulation expandierte die Population geringfügig weiter, bis ihr Anteil an der Gesamtpopulation nach 24 h  $96\% \pm 3$  betrug. Der prozentuale Anteil der CD25-positiven Zellen der Kontrollansätze schwankte während der Stimulation lediglich innerhalb der Fehlergrenzen.

Anhand der mittleren Fluoreszenzintensität kann eine Aussage über die Dichte des betrachteten Moleküls getroffen werden. Die 4-stündige Kreuzvernetzung von RT6.1 resultierte in der Verdoppelung der CD25-Dichte ( $62,5 \pm 28$ ; Kontrolle:  $30,2 \pm 10$ ). Nach 8 bzw. 24 h war eine Steigerung der CD25-Expression um den Faktor 2,5 ( $88,0 \pm 37$ ) bzw. 4 ( $116 \pm 15$ ) zu beobachten. Diese Ergebnisse zeigen, daß neben der Expansion der CD25-positiven Population auch ein Anstieg der CD25-Expressionsdichte induziert wurde. Die Größe der CD25-positiven Population und die CD25-Dichte der Gesamtpopulation der Isotyp- und Negativ-Kontrollansätze waren zu jedem Zeitpunkt vergleichbar. Effekte durch Interaktion von Fc-Rezeptoren mit freien oder über ihren Fab-Teil immobilisierten Antikörper (siehe 5.6) scheinen somit bei dem beschriebenen Effekt keine signifikante Rolle gespielt zu haben. Auf die Expressionsdichte der IL-2R $\beta$ -Kette hatte die RT6-Kreuzvernetzung keinen Einfluß.



**Abb. 4.2.1: Verstärkte Expression der IL-2R $\alpha$ -Kette (CD25) auf der NK-Zelllinie 3651 nach RT6.1-Kreuzvernetzung**

Die NK-Zelllinie 3651 wurde 4 h, 8 h und 24 h in Gegenwart von immobilisiertem anti-RT6.1-mAK (3G2) kultiviert. In Kontrollansätzen wurden Zellen unter identischen Bedingungen ohne AK (Medium-Kontrolle) bzw. in Gegenwart eines irrelevanten mAKs gleichen Isotyps (IgG1) kultiviert. Im Anschluß wurde die CD25-Expression der Zellen in einer indirekten FACS-Färbung analysiert (mAK OX39 + G $\alpha$ M-FITC). Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus einer Gruppe (n = 5).

**A:** Die mittleren Fluoreszenzintensitäten der Gesamtpopulation sind in den Histogrammen eingetragen.

**B:** Darstellung der CD25-Expressionsdichte (mean Gesamtpopulation) in Abhängigkeit von der Dauer der RT6.1-Kreuzvernetzung.

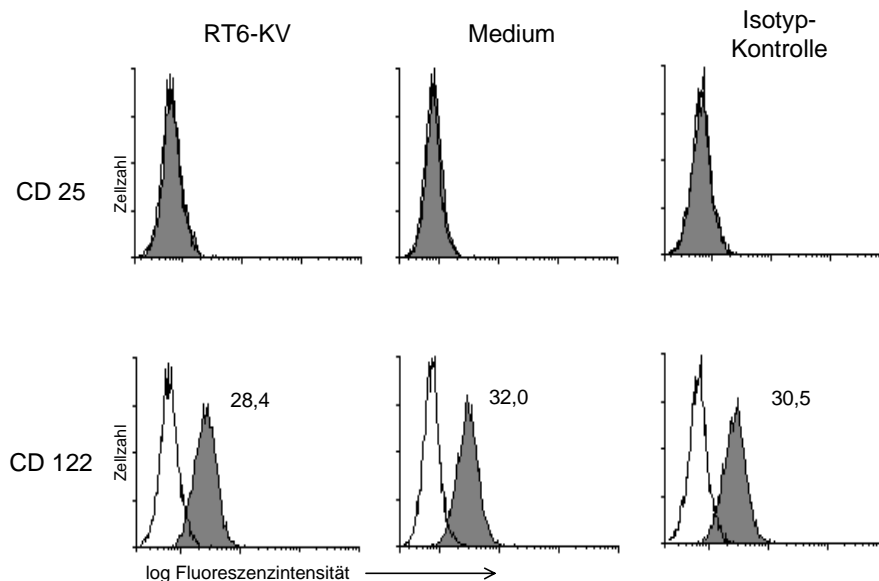
**Tab. 4.2.1: Induktion der Expression der  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors durch Kreuzvernetzung von RT6.1 auf der NK-Linie 3651**

Dauer der Stimulation [h]		Expression von Untereinheiten des IL-2-Rezeptor-Komplexes			
		IL-2-Rezeptor- $\alpha$ -Kette (CD25)		IL-2-Rezeptor- $\beta$ -Kette (CD122)	
		mean (Mittelwert $\pm$ SD)	Positive Zellen [%] (Mittelwert $\pm$ SD)	mean (Mittelwert $\pm$ SD)	positive Zellen [%] (Mittelwert $\pm$ SD)
4	RT6- Kreuzvernetzung	62,5 $\pm$ 27,8	92,2 $\pm$ 7,7	52,3 $\pm$ 14,9	99,3 $\pm$ 0,5
	Negativ- Kontrolle	30,2 $\pm$ 10,3	74,1 $\pm$ 17,4	44,5 $\pm$ 8,8	98,7 $\pm$ 1,6
	Isotyp- Kontrolle	33,2 $\pm$ 14,9	74,5 $\pm$ 17,7	47,8 $\pm$ 16,3	99,0 $\pm$ 1,2
8	RT6- Kreuzvernetzung	88,0 $\pm$ 36,5	94,8 $\pm$ 5,1	40,9 $\pm$ 16,5	99,2 $\pm$ 0,9
	Negativ- Kontrolle	32,3 $\pm$ 7,8	74,9 $\pm$ 17,1	43,1 $\pm$ 16,6	99,2 $\pm$ 1,1
	Isotyp- Kontrolle	34,6 $\pm$ 9,1	75,7 $\pm$ 15,9	45,4 $\pm$ 19,4	99,2 $\pm$ 0,9
24	RT6- Kreuzvernetzung	115,8 $\pm$ 14,8	95,7 $\pm$ 2,8	52,2 $\pm$ 11,2	99,0 $\pm$ 1,2
	Negativ- Kontrolle	33,5 $\pm$ 10,4	80,2 $\pm$ 17,4	54,2 $\pm$ 8,9	99,2 $\pm$ 0,9
	Isotyp- Kontrolle	29,2 $\pm$ 9,2	73,3 $\pm$ 19,6	53,8 $\pm$ 14,4	99,3 $\pm$ 0,5

Die NK-Zelllinie 3651 wurde 4 h, 8 h und 24 h mit immobilisiertem anti-RT6.1-mAK (3G2) stimuliert. Als Kontrollen wurden Zellen unter identischen Bedingungen, jedoch ohne AK (Medium-Kontrolle) bzw. in Gegenwart eines mAK gleichen Isotyps (IgG1-Isotyp-Kontrolle) kultiviert. Im Anschluß wurde die CD25-Expression der Zellen in einer indirekten FACS-Färbung analysiert (mAK OX39 + G $\alpha$ M-FITC). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SAW (n = 5) der mittleren Fluoreszenzintensitäten der Gesamtpopulation bzw. der prozentuale Anteil der antigenpositiven Zellen an der Gesamtpopulation. Die Marker zur Abgrenzung der antigenpositiven Zellen wurden anhand der Negativ-Kontrollen der FACS-Färbung (G $\alpha$ M-FITC) gesetzt.

Die Linie RNK-16 exprimiert den intermediär affinen IL-2R (Abschnitt 4.1.2); die Expression der IL-2R $\alpha$ -Kette konnte weder durchflußzytometrisch noch anhand RT-PCR nachgewiesen werden. Es stellte sich daher die Frage, ob durch Kreuzvernetzung von RT6 bei gleichzeitiger Stimulation mit IL-2 die CD25-Expression induziert werden kann. Zudem war von Interesse, ob RT6.2, das sich auf der Ebene der Proteinsequenz um 4% von RT6.1 unterscheidet, wie RT6.1 der Lage ist, nach seiner Kreuzvernetzung Signale zu übermitteln, die zu in der Expression des hoch affinen IL-2Rs führen.

Die Linie RNK-16 wurde für 72 h mit immobilisiertem anti-RT6.2-mAK kultiviert. IL-2 wurde in Form von CHO-Kulturüberständen zugesetzt und Negativ- bzw. Isotyp-Kontrollansätze mitgeführt. Die Analyse der Expression der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette des IL-2Rs erfolgte durchflußzytometrisch (**Abb. 4.2.2**). Die RT6-Kreuzvernetzung konnte bei der Linie RNK-16 die CD25-Expression nicht induzieren. Auch die Dichte der IL-2R $\beta$ -Kette veränderte sich im Verlauf des Experimentes nicht signifikant. Die CD25-Expression der Zellen der Isotyp- und Negativ-Kontrollansätze war immer vergleichbar.



**Abb. 4.2.2: Analyse der Expression des IL-2Rs nach RT6.2-Kreuzvernetzung auf der Linie RNK-16**

Die Linie RNK-16 wurde 72 h in Gegenwart von immobilisiertem anti-RT6.2-mAk (GY1/12) bzw. eines Isotyp-Kontroll-AKs (IgG2c) und IL-2 kultiviert. In einem Negativ-Kontrollansatz wurden die Zellen ohne mAK mit IL-2 kultiviert. Die Analyse der Expression des CD25- und CD122-Moleküls erfolgte durchflußzytometrisch (CD25: mAK OX39 + G $\alpha$ M-FITC; CD122: mAK L-316 + G $\alpha$ M-FITC). Die Histogramme der G $\alpha$ M-FITC-Kontrollen sind überlagert dargestellt. In den Histogrammen der CD122-Färbung sind die jeweiligen mittleren Fluoreszenzintensitäten der Gesamtpopulation eingetragen.

Es stellte sich nun die Frage; ob bei frisch isolierten NK-Zellen, die nicht wie die Zellen der Linie 3651 durch eine Langzeit-Kultivierung mit IL-2 voraktiviert sind, ein Effekt der RT6-Kreuzvernetzung auf die CD25-Expression beobachtet werden kann. Rigby et al. (1996b) konnten zeigen, daß die Kreuzvernetzung von RT6.2 auf T-Zellen die Expression der IL-2R $\alpha$ -Kette induziert. Voraussetzung für den beobachteten Effekt war die gleichzeitige Stimulation der Zellen mit PMA. Vor diesem Hintergrund sollte begleitend untersucht werden, ob die Kreuzvernetzung von RT6.1 bei gleichzeitigem Zusatz von IL-2 in einer Modulation der CD25-Expression der T-Zell-Population resultiert.

Die Zellen wurden aus Milzen von LEW-Ratten (RT6<sup>d</sup>) isoliert, über Nacht in Gegenwart von IL-2 und am darauffolgenden Tag 4, 8 und 24 h in Gegenwart von immobilisiertem anti-RT6.1-mAK kultiviert. Negativ-Kontrollansätze (Medium) und Isotyp-Kontrollansätze (IgG1) wurden mitgeführt. Die CD25-Expression der Zellen wurde durchflußzytometrisch untersucht. Die Darstellung der NK- und T-Zell-Population erfolgte in einer Doppelfärbung anhand ihrer unterschiedlichen Expression des NKR-P1-Moleküls und des TCR $\alpha/\beta$ -Komplexes. Zur weiteren statistischen Auswertung wurden die NK- und T-Zellen sowie antigenpositive und -negative Zellen durch das Setzen von Quadranten voneinander abgegrenzt. Die CD25-Expression wurde in einer weiteren Doppelfärbung zusammen mit der NKR-P1-Expression unter Beibehaltung der zuvor gesetzten Quadranten analysiert.

Die Kultivierung der Milz-NK-Zellen mit IL-2 führte zu der Vergrößerung der CD25-positiven Population (**Abb. 4.2.3 und Tab. 4.2.2**). Nach 4-stündiger Stimulation exprimierten  $18\% \pm 1$  der NK-Zellen (Negativ-Kontrolle) die IL-2R $\alpha$ -Kette, nach 24 h war ihr Anteil um den Faktor 2 des Anfangswertes auf  $35\% \pm 20$  angestiegen. Die mittlere Fluoreszenzintensität der CD25-positiven Population der Negativ-Kontrolle stieg im gleichen Zeitraum von  $31,7 \pm 1$  auf  $41,8 \pm 23$ .

Die gleichzeitige Stimulation der Zellen durch Kreuzvernetzung von RT6.1 führte zu einer weiteren Zunahme der CD25-exprimierenden Zellen und parallel zu einer zusätzlichen Erhöhung der CD25-Expressionsdichte. Bereits nach 4 bzw. 8 h war die Dichte der IL-2R $\alpha$ -Kette auf den stimulierten Zellen gegenüber den Zellen der Negativ-Kontrolle leicht verstärkt (**4 h**: Negativ-Kontrolle:  $31,7 \pm 1$ ; RT6-Kreuzvernetzung:  $42,4 \pm 1$ ; **8 h**: Negativ-Kontrolle:  $31,7 \pm 2$ ; RT6-Kreuzvernetzung:  $42,4 \pm 3$ ). Nach 24-stündiger Stimulation über RT6 war die CD25-Expressionsdichte im Vergleich zu der Kontrolle um den Faktor 1,6 (Negativ-Kontrolle:  $41,8 \pm 23$ ; RT6-Kreuzvernetzung:  $77,3 \pm 38$ ) gestiegen. Begleitend induzierte die RT6-Kreuzvernetzung zu jedem betrachteten Zeitpunkt der Stimulation in Relation zu der Negativ-Kontrolle eine Vergrößerung der CD25 positiven Population um den Faktor 1,6 (**4 h**:

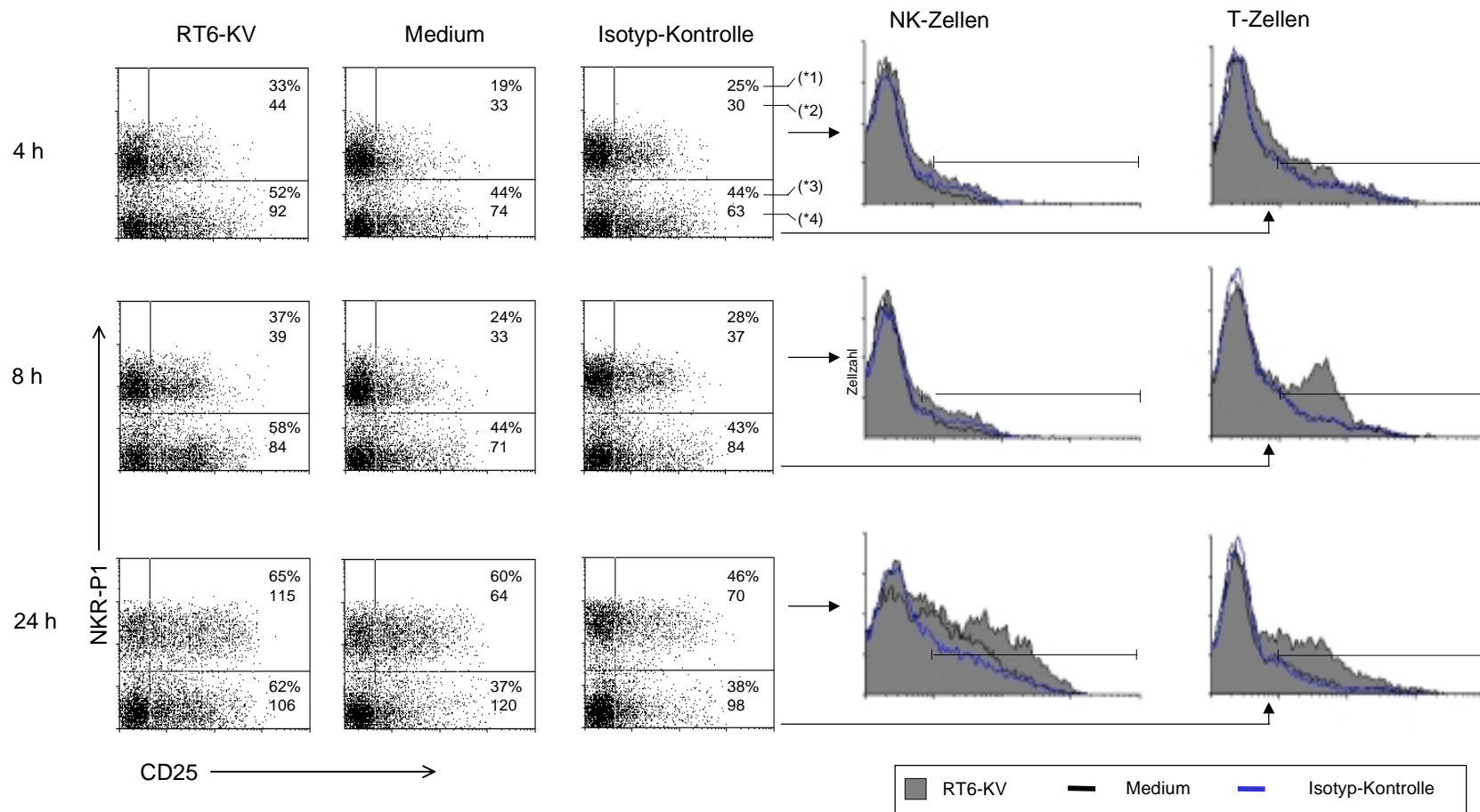
Negativ-Kontrolle: 18,1%  $\pm$  1; RT6-Kreuzvernetzung: 30,3%  $\pm$  2; **8 h:** Negativ-Kontrolle: 21,7%  $\pm$  2; RT6-Kreuzvernetzung: 35,7%  $\pm$  5; **24 h:** Negativ-Kontrolle: 35,4%  $\pm$  20; RT6-Kreuzvernetzung: 48,5%  $\pm$  14). Der beobachtete Effekt der RT6.1-Kreuzvernetzung auf die CD25-Expression war bei der Linie 3651 in stärkerem Ausmaß zu beobachten als bei frisch isolierten Milz-NK-Zellen. Die 24-stündige Stimulation der Linie über RT6 konnte auf nahezu allen Zellen (96%) die Expression des hoch affinen IL-2Rs induzieren. Innerhalb des gleichen Zeitraumes induzierte die RT6-Kreuzvernetzung die CD25-Expression nur auf durchschnittlich 77% der Milz-NK-Zellen. Dieser Befund reflektiert vermutlich die unterschiedlichen Aktivierungszustände der untersuchten NK-Zellen.

Die Isotyp-Kontrollen waren zu jedem Zeitpunkt der Stimulation mit den Negativ-Kontrollen vergleichbar. Effekte durch Interaktion von Fc-Rezeptoren mit freien oder über ihren Fab-Teil immobilisierten Antikörper (siehe 5.6) scheinen somit bei dem beschriebenen Effekt keine signifikante Rolle gespielt zu haben.

Die Analyse der T-Lymphozyten zeigte, daß die Anzahl der IL-2R $\alpha$ -positiven Zellen in Folge der Kreuzvernetzung von RT6 um den Faktor 1,4 zunahm (24 h: Negativ-Kontrolle: 41,4%  $\pm$  16; RT6-Kreuzvernetzung: 57,4%  $\pm$  12). Die CD25-Dichte erhöhte sich im gleichen Zeitraum nur geringfügig (Negativ-Kontrolle: 105,7  $\pm$  14; RT6-Kreuzvernetzung: 113,6  $\pm$  7). Der Großteil der T-Zellen exprimiert keine Fc-Rezeptoren; lediglich eine kleine Subpopulation trägt das Fc $\gamma$ RII-Molekül auf der Oberfläche, das wie Fc $\gamma$ RIII IgG mit niedriger Affinität bindet (Fc $\gamma$ RIII; Fc $\gamma$ RII: K<sub>d</sub> >10<sup>-7</sup>M, Abbas, 1996). Da jedoch auch bei der T-Zell-Population die CD25-Expression der Zellen der Isotyp- und Negativ-Kontrollansätze vergleichbar war, können Effekte der Fc-Rezeptoren ausgeschlossen werden.

Aus diesen Befunden kann rückgeschlossen werden, daß auf NK-Zellen und T-Zellen exprimiertes RT6.1 in dem verwendeten experimentellen System in der Lage war, Signale zu übermitteln, die zu der verstärkten Expression des hoch affinen IL-2Rs und somit einer Reaktivitätsänderung der Zellen führten.





**Abb. 4.2.3: Induktion der IL-2-Rezeptor- $\alpha$ -Kette (CD25) auf Milz-NK- und T-Zellen durch Kreuzvernetzung von RT6.1**

NK- und T-Zellen wurden aus den Milzen von LEW-Ratten isoliert. Die Abtrennung der B-Zellen erfolgte über Nylonwatte. Durch Beladung der T-Zellen mit einem beads-gekoppeltem anti-TCR $\alpha/\beta$  mAK (R73) und anschließender Separation über ein magnetisches Feld (MACS) wurde die NK-Population weiter angereichert. Die Zellen wurden über Nacht in Gegenwart von IL-2 und am darauffolgenden Tag 4, 8 und 24 h mit immobilisiertem anti-RT6.1-mAK (3G2) kultiviert. Isotyp- und Negativ-Kontrollansätze wurden mitgeführt. Die Analyse der CD25-Expression erfolgte durchflußzytometrisch. Die NK- und T-Zell-Populationen wurden anhand der Expression des NKR-P1-Moleküls (mAK 3.2.3-bio + SAPE) und der fehlenden Expression des TCR-Komplexes (mAK R73 + G $\alpha$ M-FITC) dargestellt und zur weiteren statistischen Auswertung durch das Setzen von Quadranten voneinander abgegrenzt. In einer weiteren Doppelfärbung wurden die CD25-Epitope (mAK OX39 + G $\alpha$ M-FITC) zusammen mit den NKR-P1-Molekülen (mAK 3.2.3-bio + SAPE) nachgewiesen. Die statistische Auswertung erfolgte unter Beibehaltung der zuvor gesetzten Quadranten. Die Marker zur Abgrenzung der antigennegativen Zellen wurden anhand der Kontrollen (G $\alpha$ M-FITC, SAPE) gesetzt. Zur Darstellung der CD25-Expression in Histogrammen wurde das Auswertefenster vor der Auswertung der grünen Fluoreszenzsignale auf die NK- bzw. T-Zell-Populationen gelegt. Die Histogramme der Kontrollansätze sind überlagert dargestellt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus einer Gruppe von 3 Experimenten.

- (\*1) prozentualer Anteil der CD25-positiven Zellen an der Gesamtpopulation der NK-Zellen
- (\*2) mittlere Fluoreszenzintensität der in dem Quadranten gelegenen, CD25-positiven NK-Zell-Population
- (\*3) prozentualer Anteil der CD25-positiven Zellen an der Gesamtpopulation der T-Zellen
- (\*4) mittlere Fluoreszenzintensität der in dem Quadranten gelegenen, CD25-positiven T-Zell-Population

**Tab. 4.2.2: Induktion der IL-2-Rezeptor- $\alpha$ -Kette (CD25) auf Milz-NK- und T-Zellen nach Kreuzvernetzung von RT6.1**

Stimulations- zeit [h]		CD25-Expression			
		Milz-NK-Zellen		Milz-T-Zellen	
		mean (MW $\pm$ SD) <sup>(*1)</sup>	positive Zellen [%] (MW $\pm$ SD) <sup>(*2)</sup>	mean (MW $\pm$ SD) <sup>(*3)</sup>	positive Zellen [%] (MW $\pm$ SD) <sup>(*4)</sup>
4	RT6- Kreuzvernetzung	42,4 $\pm$ 1,1	30,3 $\pm$ 2,4	107,9 $\pm$ 16,2	55,7 $\pm$ 4,2
	Negativ- Kontrolle	31,7 $\pm$ 1,3	18,1 $\pm$ 1,2	84,7 $\pm$ 11,4	48,8 $\pm$ 5,3
	Isotyp- Kontrolle	30,8 $\pm$ 0,6	20,7 $\pm$ 4,5	84,9 $\pm$ 22,2	46,9 $\pm$ 3,2
8	RT6- Kreuzvernetzung	42,4 $\pm$ 3,4	35,7 $\pm$ 4,9	96,7 $\pm$ 13,0	56,5 $\pm$ 8,9
	Negativ- Kontrolle	31,7 $\pm$ 1,8	21,7 $\pm$ 1,9	85,2 $\pm$ 14,3	49,6 $\pm$ 5,4
	Isotyp- Kontrolle	32,3 $\pm$ 4,2	26,5 $\pm$ 2,0	100,6 $\pm$ 17,1	53,4 $\pm$ 10,3
24	RT6- Kreuzvernetzung	77,3 $\pm$ 37,4	48,5 $\pm$ 14,4	113,6 $\pm$ 7,2	57,4 $\pm$ 11,6
	Negativ- Kontrolle	41,8 $\pm$ 22,5	35,4 $\pm$ 19,5	105,7 $\pm$ 14,0	41,4 $\pm$ 15,7
	Isotyp- Kontrolle	47,8 $\pm$ 22,0	33,5 $\pm$ 13,6	97,9 $\pm$ 0,1	37,4 $\pm$ 14,4

Die Zellen wurden wie in Abb. 4.2.2 beschrieben isoliert und stimuliert. Die NK- und T-Zell-Populationen wurden anhand der NKR-P1- (mAK 3.2.3-bio + SAPE) und CD3 (mAK G-418 + G $\alpha$ M-FITC) oder TCR-Expression (mAK R73 + G $\alpha$ M-FITC) voneinander abgegrenzt. Die Analyse der CD25-Expression erfolgte durch Färbung mit OX39 + G $\alpha$ M-FITC oder, in einem Experiment von dreien, mit OX39 + G $\alpha$ M-PE. Die Effekte auf die CD25-Expression waren in allen Experimenten vergleichbar. In einem Experiment wurde als Sekundärantikörper GaM-PE verwendet. Die Ergebnisse dieses Experimentes wurden daher nicht in die statistische Auswertung einbezogen.

(\*1) prozentualer Anteil der CD25-pos. NK-Zellen an der Gesamtpopulation der NK-Zellen, n=3

(\*2) mittlere Fluoreszenzintensität der CD25-positiven NK-Zell-Population, n=3

(\*3) prozentualer Anteil der CD25-positiven T-Zellen an der Gesamtpopulation der T-Zellen, n=3

(\*4) mittlere Fluoreszenzintensität der CD25-positiven T-Zell-Population, n=3

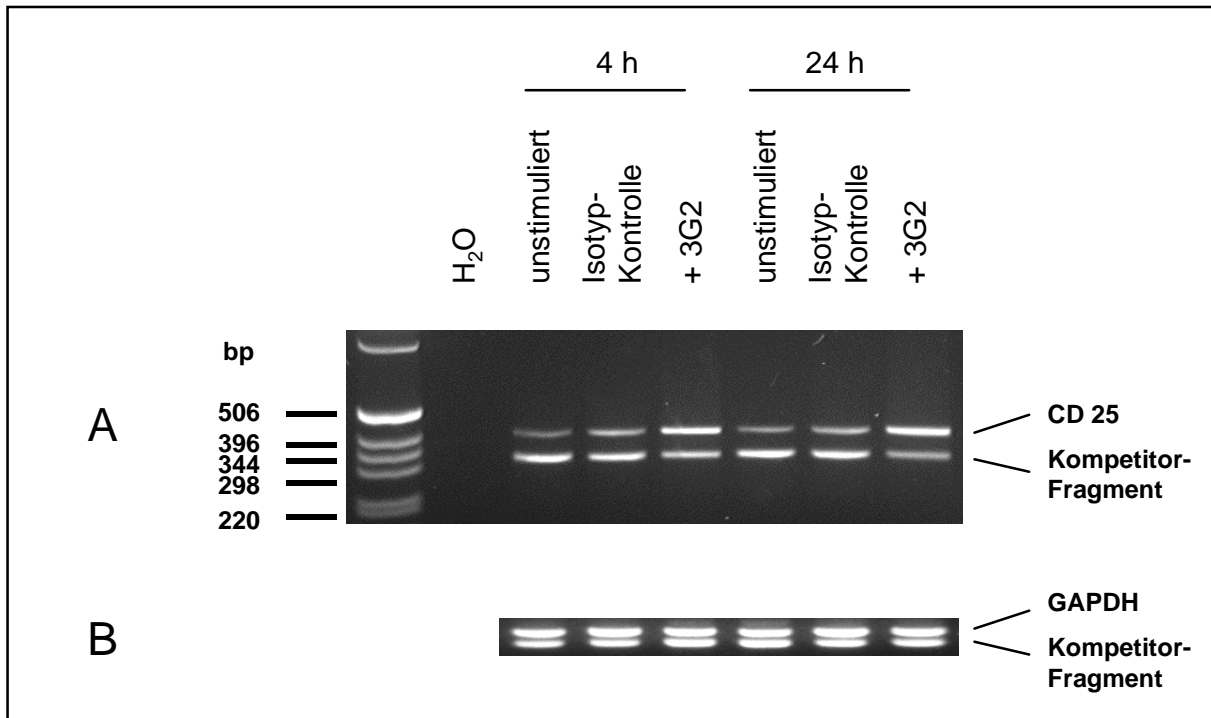
Die Effekte der RT6-Kreuzvernetzung auf die Expression von CD25 der NK-Linien wurden zusätzlich auf der Ebene der Gentranskription mittels RT-PCR untersucht. Die Analyse der mRNA-Synthese erfolgte anhand kompetitiver RT-PCR, welche im Vergleich zu der semiquantitativen RT-PCR eine genauere Quantifizierung der in den Proben vorliegenden cDNA-Mengen erlaubt.

Beide Linien wurden, wie bereits beschrieben, mittels RT6-Kreuzvernetzung für 4 bzw. 24 h stimuliert. Die Gesamt-RNA der verschiedenen Ansätze wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Vor der Analyse der CD25-Expression wurden die Proben mittels kompetitiver RT-PCR auf vergleichbare GAPDH cDNA-Konzentrationen eingestellt. Im Anschluß wurde mit den normierten cDNA-Proben eine kompetitive CD25-PCR durchgeführt. Im Fall der Linie RNK-16 wurden die cDNA-Proben ohne Zusatz von Kompetitor in einer semiquantitativen PCR-Reaktion amplifiziert, um eventuell vorhandene, schwache Signale nicht zu unterdrücken. Nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte wurden auftretende Doppelbanden densitometrisch analysiert.

Die PCR-Analyse konnte die durchflußzytometrischen Befunde bestätigen (**Abb. 4.2.4 und Tab. 4.2.3**). Die RT6.1-Kreuzvernetzung auf der Linie 3651 induzierte bereits nach 4 h eine im Vergleich zu der Negativ-Kontrolle um den Faktor 7 verstärkte CD25-mRNA-Synthese (Ratio CD25-/Kompetitor-cDNA: 0,2 bzw. 1,4). Die 24-stündige Stimulation über RT6.1 führte zu einer geringfügigen weiteren Verstärkung der Aktivierung des IL-2R $\alpha$ -Gens (Ratio 1,9). Bei den Kontrollansätzen blieb das Verhältnis der Bandenintensitäten der CD25-cDNA zu der entsprechenden Kompetitor cDNA im Verlauf der Stimulation relativ konstant. Die CD25-cDNA-Banden der Isotyp-Kontrollen waren etwas stärker als die entsprechenden Banden der Negativ-Kontrollen (4 h: Faktor 2,5; 24 h: Faktor 1,6). Da die Intensitäten der Kompetitor-Banden aller Kontrollansätze vergleichbar waren und somit keine signifikante Verdrängung der Kompetitormoleküle durch die CD25-cDNA aus der PCR-Reaktion stattgefunden hatte, handelte es sich vermutlich um eine Schwankung innerhalb der Fehlergrenzen der Analyse.

Der in Abschnitt 4.1.2 erhobene Befund, daß die NK-Linie RNK-16 im Gegensatz zu der NK-Linie 3651 die IL-2R $\alpha$ -Untereinheit nicht exprimiert, konnte bestätigt werden. (**Abb. 4.2.5**).

Die Kreuzvernetzung von RT6.2 in Gegenwart von IL-2 konnte, wie aufgrund der auf Proteinebene erhaltenen Ergebnisse erwartet, die CD25-mRNA-Expression nicht induzieren.



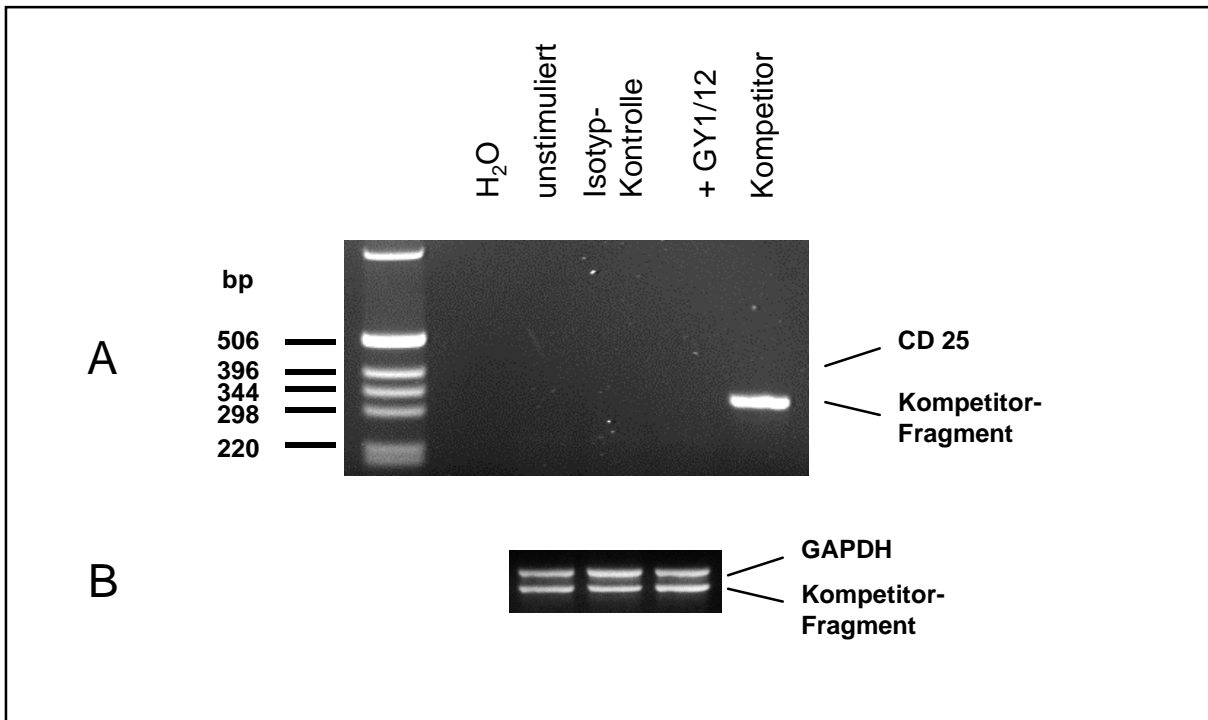
**Abb. 4.2.4: Verstärkte CD25-Expression nach RT6.1-Kreuzvernetzung auf Zellen der NK-Linie 3651**

Die Zellen wurden 4 bzw. 24 h in Gegenwart von immobilisiertem anti-RT6.1-mAK (3G2) bzw. mit Kontroll-AK (Isotyp-Kontrolle) oder ohne Zusatz von AK (Negativ-Kontrolle) kultiviert.  $5 \times 10^6$  Zellen jedes Ansatzes wurden im Anschluß abzentrifugiert, lysiert und die Gesamt-RNA isoliert. Nach Umschreibung der RNA in cDNA wurden die Proben anhand kompetitiver GAPDH-PCR auf gleiche cDNA-Mengen eingestellt. Hierbei wurden jeder Reaktion jeweils 100 fg Kompetitor-Fragment zugesetzt (B). Mit den normierten Proben wurde eine kompetitive CD25-PCR durchgeführt, wobei jede cDNA-Probe mit 10 fg Kompetitor koamplifiziert wurde (A). Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte elektrophoretisch in einem 2%igem, ethidiumbromidhaltigem Agarosegel.

**Tab. 4.2.3: Densitometrische Analyse der kompetitiven CD25-RT-PCR**

cDNA	4 h			24 h		
	Negativ-Kontrolle	Isotyp-Kontrolle	+ 3G2	Negativ-Kontrolle	Isotyp-Kontrolle	+ 3G2
CD 25	7128	15699	34799	11406	18884	41473
Kompetitor-Fragment	30086	27698	23881	34098	33227	21168
Ratio CD25/Komp.	0,2	0,5	1,4	0,3	0,5	1,9

Die in Abb. 4.2.4 dargestellten PCR-Produkt-Banden wurden anhand der Analyse-Software des Video-Dokumentationssystems (Firma Stratagene) densitometrisch ausgewertet.



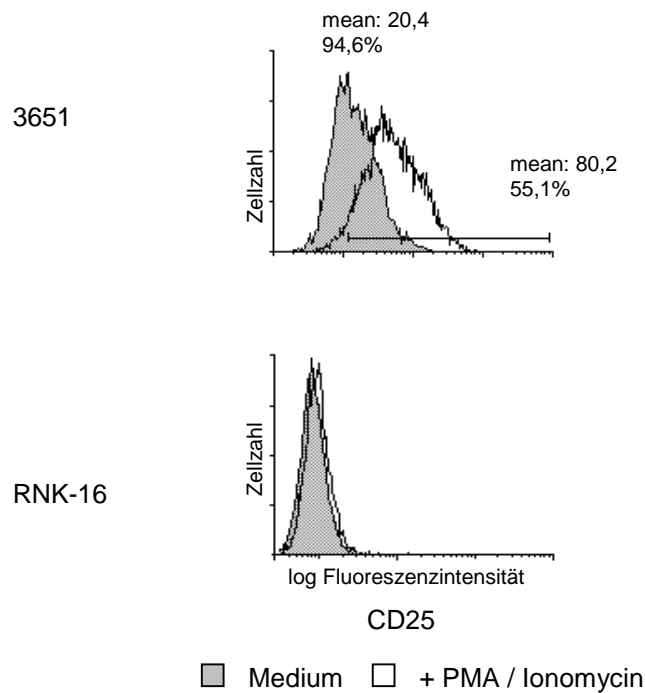
**Abb. 4.2.5:** Analyse der CD25-Expression nach RT6.2-Kreuzvernetzung auf Zellen der Linie RNK-16

Die Zellen wurden 4 h in Gegenwart von immobilisiertem anti-RT6.2-mAK (GY1/12) bzw. mit Kontroll-AK (Isotyp-Kontrolle) oder ohne Zusatz von AK (Negativ-Kontrolle) kultiviert.  $5 \times 10^6$  Zellen jedes Ansatzes wurden im Anschluß abzentrifugiert, lysiert und die Gesamt-RNA isoliert. Nach Umschreibung der RNA in cDNA wurden die Proben anhand kompetitiver GAPDH-PCR auf gleiche cDNA-Mengen eingestellt; jede cDNA wurde mit 100 fg Kompetitor koamplifiziert (B). Mit den normierten Proben wurde eine CD25-PCR ohne Zusatz von Kompetitor durchgeführt; in einem Kontroll-PCR-Ansatz wurde das Kompetitor-Fragment alleine amplifiziert (A). Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte elektrophoretisch in einem 2%igem, ethidiumbromidhaltigem Agarosegel.

Dieses Ergebnis warf die Frage auf, ob im Fall der Linie RNK-16 die Expression von CD25 durch einen anderen, bzw. stärkeren Stimulus induziert werden kann.

Die Linien 3651 und RNK-16 wurden 24 h mit PMA (200 ng/ml) und Ionomycin (100 ng/ml) kultiviert und die Auswirkungen der Stimulation auf die CD25-Expression durchflußzytometrisch (anti-CD25 mAK OX39 + G $\alpha$ M-FITC) untersucht. Die Stimulation führte bei den Zellen der NK-Linie 3651 zu einer Erhöhung der CD25-Expressionsdichte um den Faktor 4 (mean unstimulierte Zellen: 20,4; mean stimulierte Zellen: 80,2). Zugleich stieg der prozentuale Anteil der CD25-positiven Zellen an der Gesamtpopulation von 55,1% auf 94,6% an (Abb. 4.2.6). Die Inkubation der Linie RNK-16 mit PMA und Ionomycin konnte hingegen die Expression der IL-2R $\alpha$ -Kette nicht induzieren (Abb. 4.2.6). Dieser Befund

deutet darauf hin, daß die in der Linie RNK-16 durch RT6.2-Kreuzvernetzung nicht induzierbare CD25-Expression auf den Reaktivitätszustand der Zellen zurückzuführen ist.



**Abb. 4.2.6:** Analyse der CD25-Expression nach RT6.2-Kreuzvernetzung auf Zellen der Linie RNK-16

Zellen der Linie 3651 und RNK-16 wurden 24 h mit PMA (200 ng/ml) und Ionomycin (100 ng/ml) bzw. ohne Zusätze kultiviert (Medium). Die Analyse der CD25-Expression erfolgte am FACScan nach einer indirekten Färbung der Zellen mit anti-CD25-mAK (OX39) und G $\alpha$ M-FITC. Die Marker zur Abgrenzung antigenpositiver Zellen wurden anhand der Negativ-Kontrollen der FACS-Färbung (G $\alpha$ M-FITC) gesetzt. Die Histogramme der stimulierten Zellen sind jeweils überlagert dargestellt.

Die Analyse der Proliferation über Messung des Einbaus von Tritium-markiertem Thymidin zeigte, daß die Kultivierung der NK-Linien in Gegenwart von immobilisierten RT6-Antikörper keine eindeutigen Effekte auf die proliferative Aktivität der Zellen hatte (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise konnte eine Steigerung der Proliferation nicht beobachtet werden, da diese NK-Zellen aufgrund der Kultivierung mit hohen IL-2-Konzentrationen bzw. ihrer Tumorzell-Eigenschaften bereits ihre maximale proliferative Aktivität besaßen.

#### 4.2.2 Verstärkte Freisetzung von IFN- $\gamma$ und TNF- $\alpha$

Im vorangegangenen Abschnitt konnte gezeigt werden, daß die RT6.1-Kreuzvernetzung auf der NK-Linie 3651 und frisch isolierten Milz-NK-Zellen die verstärkte Expression des hoch affinen IL-2-Rezeptor-Komplexes und damit eine Reaktivitätsänderung der NK-Zellen induzierte, während die Kreuzvernetzung von RT6.2 auf der Linie RNK-16 keinen Effekt auf die Expression der Untereinheiten des IL-2Rs hatte. In diesem Kontext stellte sich die Frage, ob die *in vitro*-Stimulation der NK-Zellen durch antikörpervermittelte Kreuzvernetzung von RT6.1 bzw. RT6.2 zu einer Modulation ihrer Zytokin-Expression führt.

Die Stimulation von humanen NK-Zellen über ihren Fc-Rezeptor (Fc $\gamma$ RIII, CD16), z.B. durch Interaktion des Rezeptors mit Immunkomplexen, induziert, wie bereits erwähnt, eine verstärkte Freisetzung von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  (Anegon et al., 1988). Daher wurden, um Fc-Rezeptor-vermittelte Effekte auf die Zytokin-Expression einschätzen zu können, in allen Experimenten Isotyp-Kontrollansätze mitgeführt, in denen die Zellen in Gegenwart eines irrelevanten monoklonalen Antikörpers kultiviert wurden (siehe 4.2).

Zellen der NK-Linie 3651 und RNK-16 wurden 4 h in Gegenwart von immobilisiertem anti-RT6-mAK (anti-RT6.1: 3G2, anti-RT6.2: GY1/12) kultiviert. Negativ- und Isotyp-Kontrollansätze wurden mitgeführt (Linie 3651: IgG1; Linie RNK-16: IgG2c). Im Anschluß an die Stimulation wurden die Zellen abzentrifugiert und lysiert. Die Gesamt-RNA der verschiedenen Ansätze wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Zur Korrektur der durch mRNA-Präparation und RT-Reaktion bedingten Variationen der cDNA-Konzentrationen wurden die Proben vor der Analyse der IFN- $\gamma$  cDNA mittels kompetitiver RT-PCR auf vergleichbare GAPDH-cDNA-Konzentrationen eingestellt. Im Anschluß wurde mit den normierten Proben eine kompetitive IFN- $\gamma$ -PCR durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem ethidiumbromidhaltigem Agarosegel aufgetrennt, die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und die Ergebnisse anhand eines Videodokumentationssystems festgehalten (**Abb. 4.2.7**).

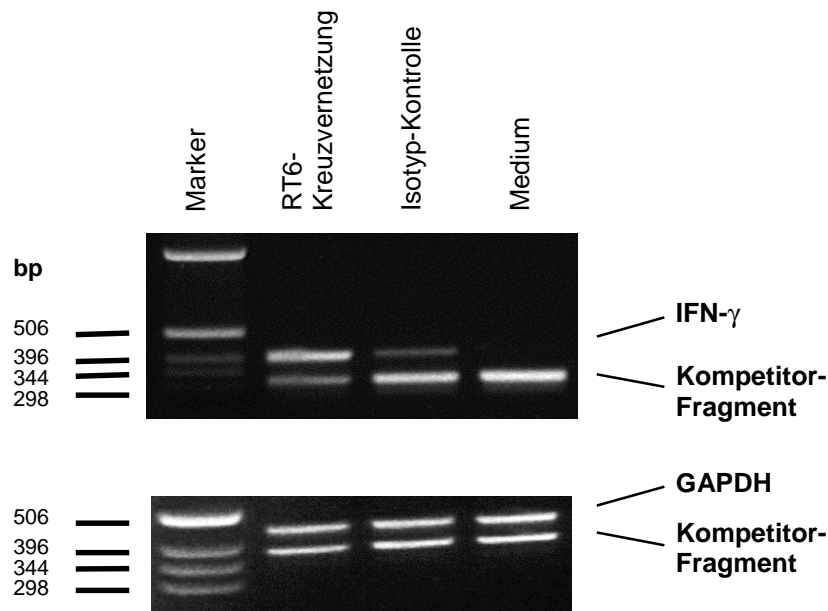
In Abschnitt 4.1.3 konnte auf mRNA- und Proteinebene gezeigt werden, daß die NK-Linie 3651 IFN- $\gamma$  exprimiert. In dem vorliegenden Experiment wurde die Kompetitor-Konzentration der IFN- $\gamma$ -PCR-Reaktion so gewählt, daß die IFN- $\gamma$ -Produkt-Bande des Negativ-Kontrollansatzes nahezu vollständig von der Kompetitor-Bande verdrängt wurde.

Die Kreuzvernetzung von RT6.1 induzierte im Vergleich zu der Negativ-Kontrolle eine verstärkte IFN- $\gamma$ -mRNA Akkumulation. Die Inkubation der Zellen mit dem Isotyp-Kontroll-Antikörper führte in einem Experiment zu einer leicht verstärkten IFN- $\gamma$ -cDNA-Bande. Da



dieser Effekt nur einmal beobachtet wurde, erscheint die Beteiligung Fc-Rezeptor-vermittelter Effekte unwahrscheinlich. Auf die IFN- $\gamma$ -mRNA-Expression der NK-Linie RNK-16 hatte die RT6-Kreuzvernetzung keinen Effekt (Daten nicht gezeigt).

In einer anderen Gruppe von Experimenten wurden die Auswirkungen der RT6.1-Kreuzvernetzung auf der Linie 3651 auf die Expression von IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-4 und TNF- $\alpha$  mittels RT-PCR untersucht. Die Stimulation konnte die Synthese von IL-10-, IL-1 $\beta$ - und IL-4-mRNA nicht induzieren; auch die schwache TNF- $\alpha$ -Expression der Zellen wurde durch die RT6.1-Kreuzvernetzung nicht moduliert (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 4.2.7: Verstärkte IFN- $\gamma$ -mRNA-Expression der NK-Linie 3651 nach RT6.1-Kreuzvernetzung**

Zellen der NK-Linie 3651 wurden für 4 h mit immobilisiertem anti-RT6.1-mAK (3G2), ohne Zusatz von mAK bzw. einem irrelevanten Kontroll-AK gleichen Isotyps (IgG1) kultiviert. Die IFN- $\gamma$ -mRNA-Expression wurde anhand kompetitiver RT-PCR unter Verwendung eines internen Standards analysiert. Zur Korrektur der durch mRNA-Präparation und RT-Reaktion bedingten Variationen der cDNA-Konzentrationen wurden die Proben vor der Analyse der IFN- $\gamma$  cDNA mittels kompetitiver GAPDH-RT-PCR auf vergleichbare cDNA-Konzentrationen eingestellt. Jede cDNA-Probe wurde mit 10 fg (IFN- $\gamma$ -PCR) bzw. 100 fg (GAPDH-PCR) Kompetitor-Fragment koamplifiziert. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte elektrophoretisch in einem 2%igem, ethidiumbromidhaltigem Agarosegel.

Diese Befunde warfen die Frage auf, ob durch Kreuzvernetzung von RT6.1 auf der Linie 3651 auch auf der Ebene der Proteinsynthese eine Modulation der IFN- $\gamma$ -Expression induziert werden kann. Begleitend sollte der Effekt der Stimulation auf die Synthese von TNF- $\alpha$  untersucht werden.

Zellen der NK-Linie 3651 wurden 4, 8 und 24 h in Gegenwart von immobilisiertem anti-RT6.1-mAK (3G2) in einer Dichte von  $2-2,5 \times 10^6$  Zellen/ml Medium kultiviert. Negativ- und Isotyp-Kontrollansätze wurden wie bereits beschrieben mitgeführt. Zu den gegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen abzentrifugiert und die IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in den zellfreien Überständen mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Abb. 4.2.8** und **Tab. 4.2.4** dargestellt; die angegebenen Zytokin-Konzentrationen wurden auf eine initiale Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml Kulturmedium umgerechnet.

In den Überständen der mit Kontrollantikörper bzw. ohne Antikörper kultivierten Zellen konnte nach 4-stündiger Kultivierung kein IFN- $\gamma$  bzw. nur sehr geringe Mengen an IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden ( $0$  bzw.  $43,4 \pm 39,8$  pg/ml). Die RT6.1-Kreuzvernetzung resultierte bereits nach 4 h in einer deutlichen Steigerung der IFN- $\gamma$ -Freisetzung ( $3557,4 \pm 360,6$  pg/ml). Im weiteren Verlauf der Stimulation reicherte sich IFN- $\gamma$  langsam im Medium der Zellen der Kontrollansätze an; so betrug die IFN- $\gamma$ -Konzentration in den Überständen der ohne Antikörper kultivierten Zellen nach 8 h  $228,3 \pm 230,2$  pg/ml, nach 24 h war sie auf  $394,5 \pm 294,1$  pg/ml angestiegen. Im Vergleich zu den Negativ-Kontrollansätzen war die IFN- $\gamma$ -Konzentration im Medium der durch RT6-Kreuzvernetzung stimulierten NK-Zellen nach 8 h um den Faktor 37 ( $8404,7 \pm 568,2$  pg/ml) und nach 24 h um den Faktor 50 ( $19147,5 \pm 2291,3$  pg/ml) erhöht.

In Übereinstimmung mit den in Abschnitt 4.1.3 dargestellten Untersuchungen zur Zytokin-Expression der Linie 3651 konnten in den Überständen der Zellen der Negativ-Kontrollansätze keine signifikanten Mengen an TNF- $\alpha$  nachgewiesen werden. Die Kultivierung der NK-Zellen in Gegenwart des gegen RT6.1 gerichteten Antikörpers konnte jedoch zu jedem Zeitpunkt des Experimentes eine Freisetzung von TNF- $\alpha$  induzieren. So betrug nach 4 h die TNF- $\alpha$  Konzentration im Medium der durch RT6-Kreuzvernetzung stimulierten Zellen  $718,8 \pm 517,3$  pg/ml, nach 8 h  $1816,7 \pm 595,1$  pg/ml und nach 24 h  $1742,5 \pm 715,5$  pg/ml.

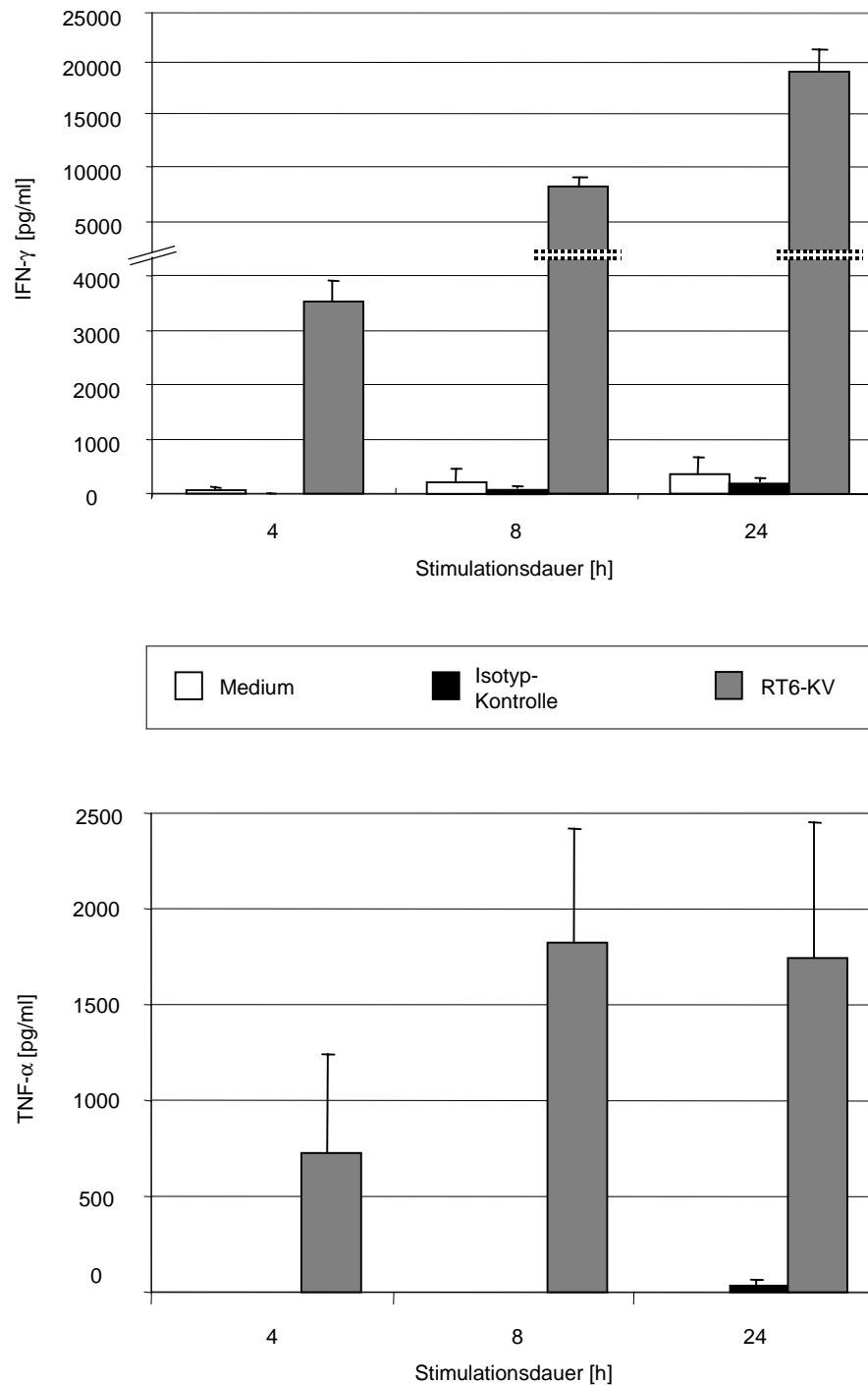
Die Inkubation der NK-Zellen mit dem Isotyp-Kontrollantikörper hatte keinen Einfluß auf die Freisetzung von IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$ . Dieser Befund macht eine Beteiligung Fc-Rezeptor-

vermittelter Effekte durch Bindung freier oder über ihren Fab-Teil immobilisierter Antikörper unwahrscheinlich.

Ein zytotoxischer Effekt der Antikörper hätte den Verlust der Integrität der Zellmembran und damit die Freisetzung eventuell vorhandener präformierter Zytokine aus dem Zytoplasma in das Kulturmedium zur Folge. Um ausschließen zu können, daß die nach RT6.1-Kreuzvernetzung beobachtete Erhöhung der IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in den Kulturüberständen auf einem Absterben der Zellen beruht, wurde daher begleitend die Vitalität der Zellen mikroskopisch durch Färbung mit Trypanblau und durchflußzytometrisch durch Messung der Vorwärts- und Seitwärts-Streulicht Eigenschaften der Zellen überprüft. Ein zytotoxischer Effekt des anti-RT6.1-mAKs konnte anhand dieser Methoden nicht beobachtet werden.

Die Tatsache, daß die in Folge der RT6.1-Kreuzvernetzung verstärkte Freisetzung von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  bereits nach 4- bzw. 8-stündiger Kultivierung der NK-Zellen beobachtet werden konnte, macht eine durch die Stimulation gesteigerte Proliferation der Zellen und daraus resultierende Erhöhung der Gesamtzellzahl als Ursache des beobachteten Effektes unwahrscheinlich. Zum Vergleich der Zellzahlen der verschiedenen Ansätze wurden die Zelldichten zu den gegebenen Zeitpunkten ermittelt. Innerhalb der verschiedenen Ansätze konnten keine signifikanten Variationen der Zellzahlen festgestellt werden. Zudem hatte die Analyse der Proliferation über den Einbau von [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin keinen Effekt der anti-RT6.1-mAK aufzeigen können (Abschnitt 4.1.2).

Zusammenfassend kann aus diesen Befunden rückgeschlossen werden, daß die antikörpervermittelte Kreuzvernetzung von RT6.1 auf der NK-Linie 3651 eine verstärkte Freisetzung von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  induzierte.



**Abb. 4.2.8: Verstärkte Freisetzung von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  nach RT6.1-Kreuzvernetzung auf der NK-Linie 3651**

Zellen der NK-Linie 3651 wurden für 4, 8 und 24 h mit immobilisiertem anti-RT6.1-mAK (3G2) stimuliert. Als Kontrollen wurden Zellen unter identischen Bedingungen, jedoch ohne Antikörper (Medium-Kontrolle) bzw. in Gegenwart eines mAK gleichen Isotyps (IgG1, Isotyp-Kontrolle) kultiviert. Im Anschluß wurden die IFN- $\gamma$ - bzw. TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in den zellfreien Kulturüberständen mittels ELISA bestimmt. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf eine Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml Kulturmedium. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte aus drei Experimenten  $\pm$  SAW.

Es stellte sich nun die Frage, ob die RT6-Kreuzvernetzung auch bei frisch isolierten Milz-NK-Zellen die Sekretion von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  modulieren kann.

NK-Zellen wurden aus LEW-Ratten-Milzen isoliert. Die Abtrennung der B-Zellen erfolgte über Nylonwatte. Eine weitere Anreicherung der NK-Zellen wurde nach Beladung der T-Zellen mit einem beads-gekoppeltem anti-TCR $\alpha/\beta$ -mAK (R73) mittels MACS-Separation erreicht. Der Anteil der NK-Zellen an der Gesamtzellzahl betrug durchschnittlich 55%. Im Anschluß an die Separation wurden die Zellen unter Zusatz von IL-2 über Nacht kultiviert und am darauffolgenden Tag 4, 8 und 24 h mit immobilisiertem anti-RT6.1-mAK inkubiert. Negativ- und Isotyp-Kontrollansätze wurden mitgeführt. Die Zellen wurden zu den gegebenen Zeitpunkten abzentrifugiert und die IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in den zellfreien Kulturüberständen mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Abb. 4.2.9** und **Tab. 4.2.4** dargestellt, die Zytokin-Konzentrationen beziehen sich auf eine initiale Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml Kulturmedium.

Nach 4- bzw. 8-stündiger Kultivierung konnte IFN- $\gamma$  in den Überständen der Kontrollansätze nicht nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf der Experimente reicherte sich IFN- $\gamma$  im Kulturüberstand der Kontrollansätze an (24 h: Negativ-Kontrolle:  $1106,9 \pm 784,2$  pg/ml; Isotyp-Kontrolle:  $1224,9 \pm 868,4$  pg/ml).

Die 8-stündige RT6.1-Kreuzvernetzung konnte die Freisetzung von IFN- $\gamma$  induzieren ( $315,1 \pm 308,3$  pg/ml). Nach 24 h war die IFN- $\gamma$ -Konzentration in den Überständen der durch RT6.1-Kreuzvernetzung stimulierten Zellen in Relation zu den Negativ-Kontrollansätzen um den Faktor 2 erhöht ( $2575,7 \pm 1731,1$  pg/ml).

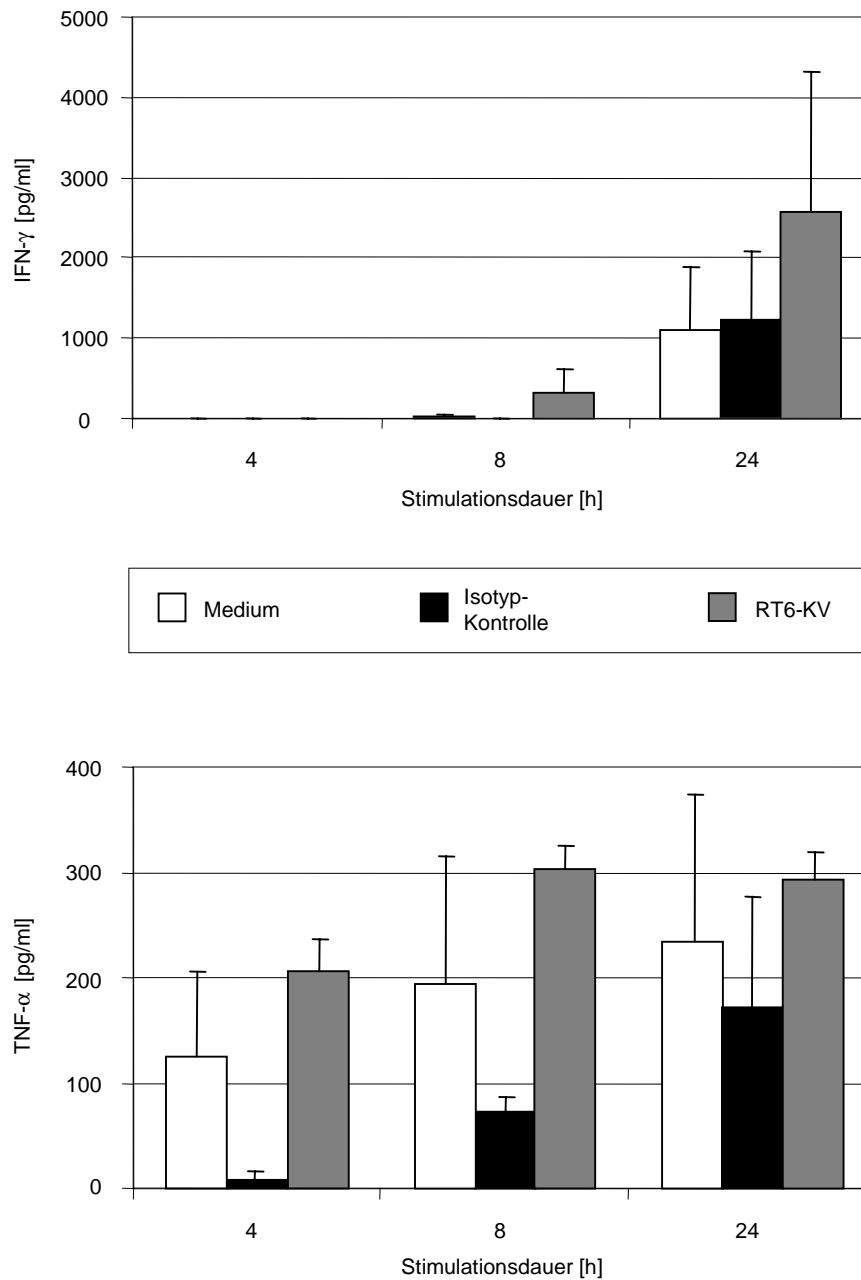
Geringe TNF- $\alpha$ -Mengen konnten bereits nach einer 4-stündigen Kultivierung im Medium der Zellen der Kontrollansätze nachgewiesen werden (Negativ-Kontrolle:  $135,9 \pm 67,7$  pg/ml; Isotyp-Kontrolle:  $7,1 \pm 10,0$  pg/ml). Die Kultivierung der Zellen mit anti-RT6.1-mAK führte im Vergleich zu den Negativ-Kontrollansätzen zu jedem Zeitpunkt der Stimulation nur zu einer geringfügigen Steigerung der TNF- $\alpha$ -Sekretion. Nach 4 h war die TNF- $\alpha$ -Konzentration in den Überständen der mit RT6.1 Antikörper kultivierten Zellen in Relation zu den Negativ-Kontrollansätzen um den Faktor 1,5 ( $205,8 \pm 30,2$  bzw.  $135,9 \pm 67,7$  pg/ml), nach 8 h um den Faktor 1,6 ( $302,1 \pm 22,2$  bzw.  $193,7 \pm 120,8$  pg/ml) und nach 24 h um den Faktor 1,2 ( $293,8 \pm 25,0$  bzw.  $235,1 \pm 139,6$  pg/ml) erhöht.

Die Kultivierung der Zellen in Gegenwart der Isotyp-Kontrollantikörper hatte keinen Effekt auf die Freisetzung von IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$ ; die Differenzen der Zytokin-Konzentrationen in

den Überständen von Isotyp- und Negativ-Kontrollansätzen bewegten sich innerhalb der Fehlergrenzen der Nachweismethode.

Diese Befunde zeigen, daß die Kultivierung der Zellen in Gegenwart des anti-RT6.1-mAKs die Sekretion von IFN- $\gamma$  steigerte, während die Freisetzung von TNF- $\alpha$  nur geringfügig beeinflußt wurde.

Die untersuchten Zellen setzten sich im Durchschnitt aus 55% NK-Zellen, 25% B-Zellen und 20% T-Zellen zusammen. Durchschnittlich 75% der T-Zellen exprimierten RT6.1. Da T-Zellen, im Gegensatz zu B-Zellen, sowohl IFN- $\gamma$ , als auch TNF- $\alpha$  sezernieren können (Müller et al., 1989), konnte in dieser experimentellen Anordnung nicht eindeutig geklärt werden, ob nach RT6.1-Kreuzvernetzung erhöhte Konzentration dieser Zytokine auch auf eine Reaktivitätsänderung der T-Zell-Population zurückgeht, oder allein durch die NK-Zellen vermittelt wird.



**Abb. 4.2.9: Verstärkte Freisetzung von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  nach RT6.1-Kreuzvernetzung auf frisch isolierten NK- und T-Zellen**

NK-Zellen wurden aus LEW-Ratten-Milzen isoliert und über Nacht mit IL-2 kultiviert. Im Anschluß wurden die NK-Zellen für 4 h, 8 h und 24 h mit immobilisiertem anti-RT6.1-mAK (3G2) stimuliert. Als Kontrollen wurden Zellen in unbeschichteten Kulturschalen (Medium-Kontrolle) bzw. in Gegenwart eines immobilisierten mAK gleichen Isotyps (IgG1, Isotyp-Kontrolle) kultiviert. Die IFN- $\gamma$ - und TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in den zellfreien Kulturüberständen wurden mittels ELISA bestimmt. Die im Diagramm dargestellten Konzentrationen beziehen sich auf eine initiale Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml Kulturmedium. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  SAW.

In Abschnitt 4.1.3 wurde gezeigt, daß die Linie RNK-16 keine anhand des verwendeten Testsystems nachweisbaren IFN- $\gamma$ -Mengen sezerniert. Auch die Synthese von TNF- $\alpha$  konnte anhand ELISA nicht nachgewiesen werden. Es stellte sich daher in diesem Zusammenhang die Frage, ob durch Kreuzvernetzung von RT6.2 die Bildung von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  angeregt werden kann. Begleitend sollte untersucht werden, ob IL-2 in diesem experimentellen System einen kostimulatorischen Effekt vermitteln kann.

Zellen der NK-Linie RNK-16 wurden nach Standardprotokoll 4, 8 und 24 h in Gegenwart von immobilisiertem anti-RT6.2-mAK (GY1/12) kultiviert, Negativ- und Isotyp-Kontrollansätze (IgG2c) wurden mitgeführt. Die Zelldichte zu Beginn des Experimentes betrug  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml. Die Zellen aller Ansätze wurden sowohl in Gegenwart von IL-2, als auch ohne Zusatz von IL-2 kultiviert. Zu den gegebenen Zeitpunkten wurden die NK-Zellen abzentrifugiert. Die Bestimmung der IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  Konzentrationen in den zellfreien Kulturüberständen erfolgte mittels ELISA. Die Ergebnisse sind in **Tab. 4.2.4** dargestellt, die angegebenen Zytokin-Konzentrationen wurden auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml Kulturmedium bei Stimulationsbeginn umgerechnet.

Im Überstand der Kontrollansätze konnten zu keinem Zeitpunkt des Experimentes signifikante Mengen an TNF- $\alpha$  nachgewiesen werden. Die Inkubation der Zellen mit IL-2 hatte keinen Effekt auf die Freisetzung von TNF- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$ .

Die Kreuzvernetzung von RT6.2 konnte die Freisetzung von TNF- $\alpha$  innerhalb des gewählten Zeitrahmens nicht induzieren.

Nur in einem von drei Experimenten hatte die 24-stündige Inkubation der Zellen mit anti-RT6.2-mAK bei gleichzeitigem Zusatz von IL-2 in Relation zu den mit IL-2 kultivierten Kontrollansätzen eine verstärkte Freisetzung von IFN- $\gamma$  zur Folge ( $89,5 \pm 126,5$  pg/ml).



**Tab. 4.2.4: Effekte der Kreuzvernetzung von RT6 auf die Freisetzung von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$**

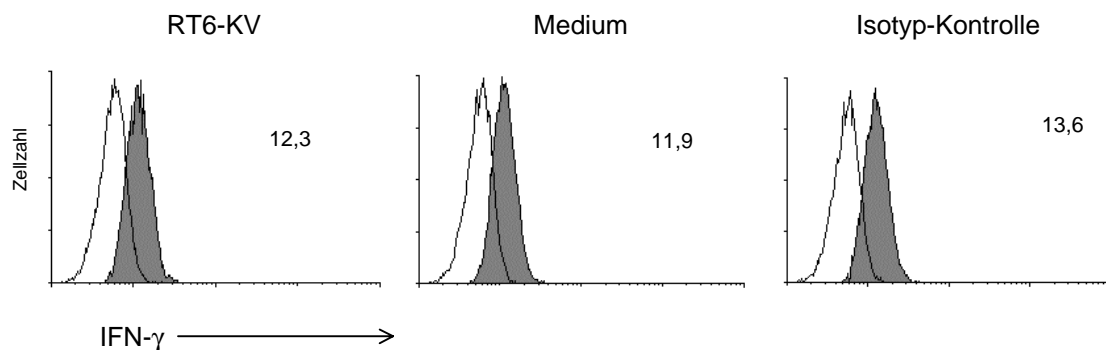
Dauer der Stimulation [h]		Zytokin-Freisetzung <sup>(*4)</sup>							
		NK-Linie 3651 <sup>(*1)</sup>		NK-Linie RNK-16 <sup>(*2)</sup>				Milz-Zellen <sup>(*3)</sup>	
		IFN- $\gamma$ [pg/ml]	TNF- $\alpha$ [pg/ml]	IFN- $\gamma$ [pg/ml]		TNF- $\alpha$ [pg/ml]		IFN- $\gamma$ [pg/ml]	TNF- $\alpha$ [pg/ml]
				+ IL-2	- IL-2	+ IL-2	- IL-2		
4	RT6-KV	3557,4 $\pm$ 360,6	718,8 $\pm$ 517,3	n.b.	n.b.	0	0	0	205,8 $\pm$ 30,2
	Negativ-Kontrolle	43,4 $\pm$ 39,8	0	n.b.	n.b.	0	0	0	135,9 $\pm$ 67,7
	Isotyp-Kontrolle	0	0	n.b.	n.b.	0	0	0	7,1 $\pm$ 10,0
8	RT6-KV	8404,7 $\pm$ 568,2	1816,7 $\pm$ 595,1	n.b.	n.b.	0	0	315,1 $\pm$ 308,3	302,1 $\pm$ 22,2
	Negativ-Kontrolle	228,3 $\pm$ 230,2	6,0 $\pm$ 8,4	n.b.	n.b.	0	0	17,0 $\pm$ 24,1	193,7 $\pm$ 120,8
	Isotyp-Kontrolle	39,6 $\pm$ 28,1	0	n.b.	n.b.	0	0	0	72,0 $\pm$ 14,9
24	RT6-KV	19147,5 $\pm$ 2291,3	1742,5 $\pm$ 715,0	89,5 $\pm$ 126,5	0	1,3 $\pm$ 1,8	1,4 $\pm$ 2,1	2575,7 $\pm$ 1731,1	293,8 $\pm$ 25,0
	Negativ-Kontrolle	394,5 $\pm$ 294,1	0	0	0	0	0,6 $\pm$ 0,8	1106,9 $\pm$ 784,2	235,1 $\pm$ 139,6
	Isotyp-Kontrolle	196,3 $\pm$ 92,6	27,6 $\pm$ 39,1	0	0	3,9 $\pm$ 2,9	1,0 $\pm$ 1,6	1224,9 $\pm$ 868,4	171,5 $\pm$ 104,9

(\*1) Zellen der NK-Linie 3651 wurden wie in Abb. 4.2.8 beschrieben stimuliert (n=3). (\*2) Zellen der NK-Linie RNK-16 wurden in Gegenwart von immobilisiertem anti-RT6.2 bzw. Isotyp-Kontrollantikörper oder ohne AK unter Zusatz von IL-2 bzw. ohne IL-2 kultiviert. (n=3). (\*3) Milz-NK-Zellen wurden wie in Abb. 4.2.9 beschrieben isoliert und stimuliert. (n=3). (\*4) Die angegebenen Zytokin-Konzentrationen (MW  $\pm$  SAW) beziehen sich auf eine initiale Zelldichte von 1 x10<sup>6</sup> Zellen/ml.

Der Effekt der RT6.2-Kreuzvernetzung auf die Produktion von IFN- $\gamma$  durch die Linie RNK-16 wurde mittels intrazellulärer FACS-Analyse erneut untersucht. Auf diesem Wege sollte geklärt werden, ob die oben beschriebenen experimentellen Schwankungen auf eine in diesem Zusammenhang zu geringe Sensitivität des IFN- $\gamma$ -ELISA's (Nachweisgrenze  $\leq 13$  pg/ml) zurückgehen.

Zellen der NK-Linie RNK-16 wurden 24 h in Gegenwart von immobilisiertem anti-RT6.2-mAK (GY1/12) sowie IL-2 und weitere 4 h unter Zusatz von Brefeldin A (10  $\mu$ g/ml) kultiviert. Negativ- und Isotyp-Kontrollansätze wurden mitgeführt. Der Nachweis von intrazellulärem IFN- $\gamma$  erfolgte nach Fixierung (4% Paraformaldehyd) und Permeabilisierung (Saponin, 1 mg/ml) der Zellen durch Färbung mit einem FITC-markierten anti-IFN- $\gamma$ -mAK aus der Maus. Um eine unspezifische Anfärbung ausschließen zu können, wurden die Zellen begleitend mit einem irrelevanten, FITC-markierten mAK gleichen Isotyps (IgG1, Maus  $\alpha$  Ratte) inkubiert. (**Abb. 4.2.10**).

Die intrazelluläre FACS-Analyse zeigte, daß ein Teil der Zellen IFN- $\gamma$  synthetisiert. Ein Effekt der RT6.2-Kreuzvernetzung auf die IFN- $\gamma$ -Synthese der Linie RNK-16 konnte jedoch nicht beobachtet werden.



**Abb. 4.2.10: FACS-Analyse der IFN- $\gamma$ -Synthese nach RT6.2-Kreuzvernetzung auf der NK-Linie RNK-16**  
Zellen der NK-Linie RNK-16 wurden 24 h in Gegenwart von immobilisiertem anti-RT6.2-mAK (GY1/12) sowie IL-2 und weitere 4 h unter Zusatz von Brefeldin A (10  $\mu$ g/ml) kultiviert. Als Kontrollen wurden Zellen ohne Zusatz von AK (Medium) bzw. in Gegenwart eines irrelevanten mAK gleichen Isotyps (Isotyp-Kontrolle, IgG2c) kultiviert. Der Nachweis von intrazellulärem IFN- $\gamma$  erfolgte durchflußzytometrisch nach Fixierung (4% Paraformaldehyd) und Permeabilisierung (Saponin, 1 mg/ml) der Zellen durch Färbung mit einem FITC-markierten anti-IFN- $\gamma$ -mAK (Maus  $\alpha$  Ratte). Vor der Analyse der grünen Fluoreszenzsignale wurden die Auswertefenster anhand der Streulicht-Eigenschaften auf die vitalen Zellen gesetzt (Dot-Blots). Die IFN- $\gamma$ -Expression der Zellen ist in Histogrammen dargestellt, die Kontrollfärbungen mit einem irrelevanten, FITC-markierten mAK gleichen Isotyps (IgG1, Maus  $\alpha$  Ratte) sind überlagert gezeigt. In den Histogrammen sind die jeweiligen mittleren Fluoreszenzintensitäten der Gesamtpopulation eingetragen.

## 4.3 Einfluß der RT6-Kreuzvernetzung auf die RT6-Expression der NK-Zellen

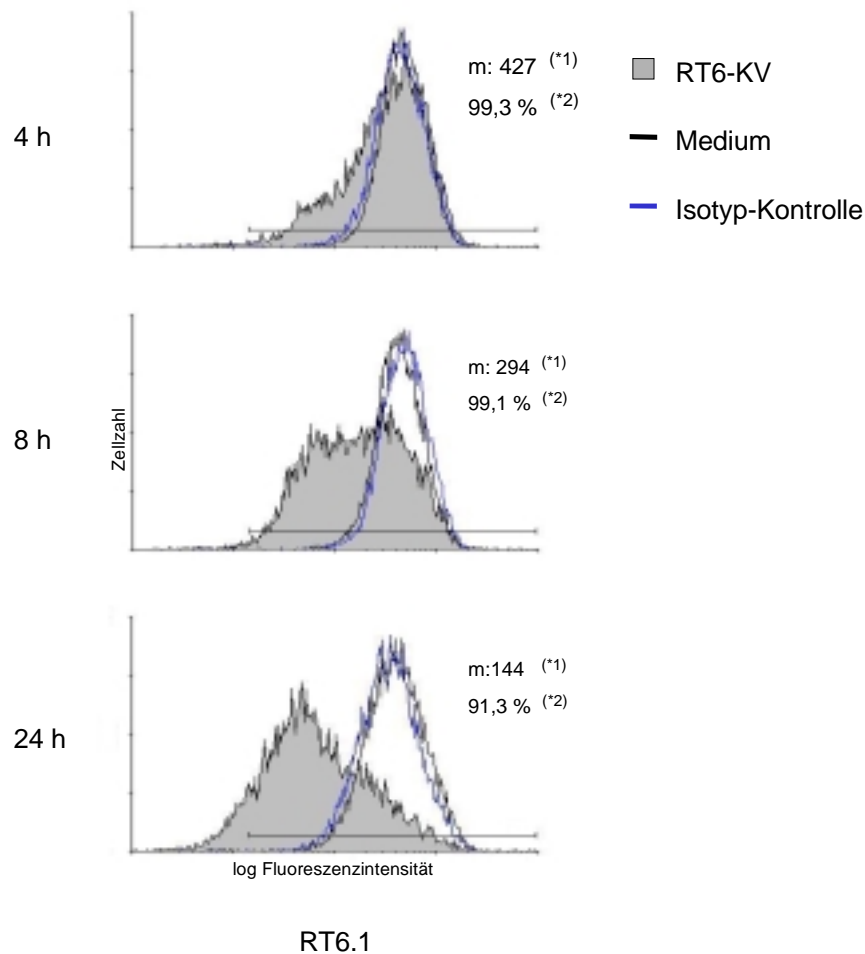
### 4.3.1 Durchflußzytometrische Analyse

Die vorangegangenen Experimente hatten gezeigt, daß die Kreuzvernetzung von RT6.1 zu der verstärkten Expression des hoch affinen IL-2-Rezeptors und der gesteigerten Freisetzung von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  führte. Es stellte sich nun die Frage, ob auch die RT6-Expression im Zuge der beobachteten Aktivierung der NK-Zellen moduliert wird. Zur Beantwortung dieser Frage wurde die RT6.1-Oberflächendichte der NK-Zellen im Verlauf der RT6-Kreuzvernetzung durchflußzytometrisch analysiert.

Zellen der NK-Linie 3651 wurden 4, 8 und 24 h durch Kreuzvernetzung von RT6.1 stimuliert. Wie in den vorangegangenen Experimenten wurde der anti-RT6.1-mAK (3G2) in immobilisierter Form eingesetzt. Isotyp- und Negativ-Kontrollen wurden mitgeführt.

Die RT6.1-Oberflächendichte wurde, in Abhängigkeit von der Dauer der Stimulation, durch die RT6-Kreuzvernetzung deutlich reduziert. (**Abb. 4.3.1 und Tabelle 4.3.1**). Bereits nach 4-stündiger Stimulation war im Vergleich zu den Negativ-Kontrollansätzen eine Reduktion der RT6.1-Dichte zu beobachten (RT6-Kreuzvernetzung:  $400,4 \pm 89,8$ ; Negativ-Kontrolle:  $451,0 \pm 67,2$ ). Im weiteren Verlauf des Experimentes verstärkte sich der beobachtete Effekt: die RT6.1-Expressionsdichte war nach 24 h in Folge der RT6-Kreuzvernetzung im Vergleich zu den Zellen der Negativ-Kontrolle um den Faktor 2,5 reduziert (RT6-Kreuzvernetzung:  $165,1 \pm 38,7$ ; Negativ-Kontrolle:  $406,3 \pm 60,2$ ). Begleitend war nach 24-stündiger RT6-Kreuzvernetzung eine Population RT6.1-negativer Zellen neu entstanden, deren Anteil an der Gesamtpopulation  $9,1\% \pm 2,6$  betrug.

Die Kultivierung der Linie 3651 mit dem Isotyp-Kontrollantikörper führte in keinem Experiment zu einer verringerten RT6.1-Expression. Die beobachtete Reduktion der RT6.1-Dichte ist somit nicht auf Interaktionen immobilisierter oder freier Antikörper mit den Fc-Rezeptoren der NK-Zellen zurückzuführen (siehe 5.6). In einem von fünf Experimenten war die RT6.1-Dichte der Zellen des Isotyp-Kontrollansatzes in Relation zu den ohne Antikörper kultivierten Zellen leicht erhöht. Dieses Ergebnis könnte darauf hindeuten, daß die Bindung der Antikörper an Fc-Rezeptoren der NK-Zellen zu einer verstärkten Expression von RT6.1 führte.



**Abb. 4.3.1: Reduktion der RT6.1-Expression auf der NK-Linie 3651 nach RT6.1-Kreuzvernetzung**

Die NK-Zell-Linie 3651 wurde 4, 8 und 24 h in Gegenwart von immobilisiertem anti-RT6.1-mAK (3G2) kultiviert. Isotyp- und Negativ-Kontrollansätze wurden mitgeführt. Die Analyse der RT6.1-Expression erfolgte durchflußzytometrisch in einer indirekten Färbung (mAK 3G2 + G $\alpha$ R-FITC). Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus einer Gruppe (n = 5). In den Histogrammen sind die Medium- und Isotyp-Kontrollen überlagert dargestellt. Die Marker zur Abgrenzung antigennegativer Zellen wurden anhand der G $\alpha$ R-FITC-Kontrollen der FACS-Färbung gesetzt.

(\*1) mittlere Fluoreszenzintensität (m) der Gesamtpopulation nach RT6.1-Kreuzvernetzung

(\*2) prozentualer Anteil der RT6.1-positiven Zellen an der Gesamtpopulation nach RT6.1-Kreuzvernetzung

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob der beschriebene Effekt auch auf frisch isolierten Milz-NK-Zellen beobachtet werden kann. Zudem stellte sich die Frage, ob die Expression von RT6.1 auf T-Zellen durch Kreuzvernetzung dieses Proteins moduliert werden kann.

NK- und T-Zellen wurden aus LEW-Ratten-Milz durch Abtrennung der B-Zellen mittels Nylonwatte isoliert. Eine weitere Anreicherung der NK-Population erfolgte nach Beladung der T-Zellen mit einem beads-gekoppeltem anti-TCR $\alpha/\beta$ -mAK (R73) über ein magnetisches Feld (MACS). Die separierten Zellen wurden über Nacht in Gegenwart von IL-2 kultiviert.

Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen 4, 8, und 24 h mittels immobilisiertem anti-RT6.1-mAK (3G2) stimuliert. Negativ- und Isotyp-Kontrollen (IgG1) wurden mitgeführt. Die Analyse der RT6.1-Expression erfolgte am FACScan. Die T-Zell- und NK-Zell-Population wurden in einer indirekten Doppelfluoreszenz-Analyse anhand der unterschiedlichen Expression von NKR-P1 (mAK 3.2.3-bio + SAPE) und CD3 (mAK G-418 + G $\alpha$ M-FITC) dargestellt. Zur weiteren statistischen Auswertung wurden diese Populationen sowie antigenpositive und -negative Zellen durch das Setzen von Quadranten voneinander abgegrenzt. Die RT6.1-Expression der Zellen wurde in einer weiteren Doppelfärbung zusammen mit der Expression des NKR-P1-Moleküls untersucht (anti-RT6.1: mAK 3G2 + G $\alpha$ R-FITC; anti-NKR-P1: mAK 3.2.3-bio + SAPE).

Die Stimulation über RT6.1 führte bei den Milz-NK-Zellen in Abhängigkeit von der Dauer der Kreuzvernetzung zu einer deutlichen Verringerung der RT6.1-Expressionsdichte. Begleitend nahm der prozentuale Anteil der RT6.1-positiven Zellen an der Gesamtpopulation der NK-Zellen ab (**Abb. 4.3.2 und Tabelle 4.3.1**).

Nach 4-stündiger RT6.1-Kreuzvernetzung war die RT6.1-Dichte der positiven Population im Vergleich zu der Expressionsdichte der unstimulierten Zellen leicht reduziert (RT6-Kreuzvernetzung:  $52,6 \pm 23,4$ ; Negativ-Kontrolle:  $63,1 \pm 6,3$ ). Der Anteil der RT6.1 positiven Zellen betrug nach 4-stündiger Stimulation  $21,7\% \pm 7$  und war, verglichen mit den Zellen der Negativ-Kontrolle ( $50,6\% \pm 11$ ), um den Faktor 2 reduziert. In Relation zu den Zellen der Negativ-Kontrollen betrachtet, fand bei länger andauernder RT6-Kreuzvernetzung eine weitere Verringerung der RT6.1-Dichte (24 h: Faktor 1,8) statt, während sich die RT6.1-positive Population nicht weiter verkleinerte.

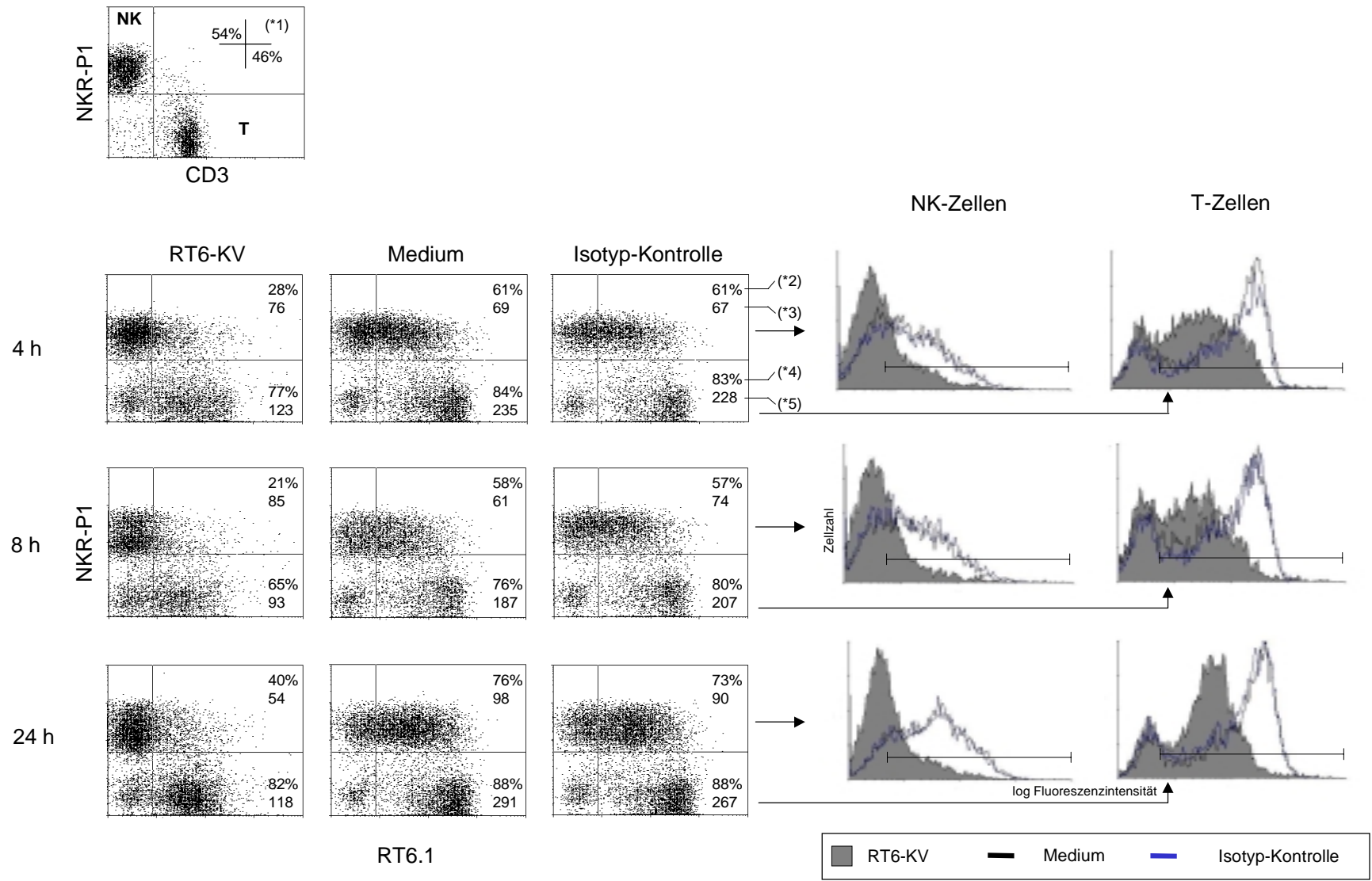
Die Kultivierung mit IL-2 führte bei den Zellen der Negativ-Kontrollansätze zu einer deutlichen Erhöhung der RT6.1-Expressionsdichte und zu der Vergrößerung der RT6-positiven NK-Population. Nach 24 h war der Anteil RT6-positiver Zellen von  $50,6\% \pm 11$  auf  $70,6\% \pm 11$  gestiegen, die mittlere Fluoreszenzintensität hatte sich von  $63,1 \pm 6,3$  auf  $120,9 \pm 49,4$  verdoppelt. Wie in Kapitel 4.1 beschrieben, tragen nahezu alle Zellen der Linie 3651 das RT6.1-Molekül auf der Oberfläche, während nur ca. 30-50% der frisch isolierten NK-Zellen RT6.1-positiv sind (**Tab. 4.3.1**). Die RT6-Expression wird somit in Abhängigkeit vom Aktivierungszustand der Zellen moduliert und, wie auch in diesem Experiment zu beobachten, in Folge der Stimulation der NK-Zellen mit IL-2 heraufreguliert. Die unterschiedliche RT6-Expression der Linie 3651 und frisch isolierter NK-Zellen spiegelt sich in dem vorliegenden Experiment in der Tatsache wider, daß bei der Linie 3651 erst nach 24-stündiger RT6-Kreuzvernetzung das Auftreten RT6-negativer Zellen beobachtet werden

konnte (**Tab. 4.3.1**), während bei frisch isolierten Milz-NK-Zellen bereits nach 4-stündiger Stimulation die Vergrößerung der RT6-negativen Population einsetzte.

Die Untersuchung der T-Zell-Population zeigte, daß die RT6.1-Kreuzvernetzung, wie im Fall der NK-Zellen, zu einer verminderten RT6.1-Dichte führte. Nach 4 h hatte sich die mittlere Fluoreszenzintensität und damit die RT6.1-Dichte im Vergleich zu der Negativ-Kontrolle um den Faktor 2,5 von  $198,3 \pm 36,5$  auf  $80,6 \pm 42,3$  reduziert. Nach 24-stündiger Stimulation war die RT6.1-Dichte in Relation zu der Kontrolle um den Faktor 2,8 verringert ( $278,0 \pm 13,9$  bzw.  $98,5 \pm 14,1$ ). Die Kultivierung der T-Zellen mit IL-2 führte zu der Erhöhung der RT6.1-Expressionsdichte (Negativ-Kontrolle: 4 h:  $198,3 \pm 36,5$ ; 24 h:  $278,0 \pm 13,9$ ). Die RT6.1-positive Subpopulation expandierte nur geringfügig von  $61,4\% \pm 22$  auf  $71,2\% \pm 16$ .

Die Kultivierung der NK- und T-Zellen mit dem Isotyp-Kontrollantikörper konnte in keinem Experiment eine Reduktion der RT6.1-Oberflächen-Expression induzieren. Der beobachtete Effekt der RT6-Kreuzvernetzung geht somit nicht auf die Bindung immobilisierter oder freier Antikörper an Fc-Rezeptoren zurück. Die RT6.1-Dichte der NK- und T-Zellen der Isotyp-Kontrollansätze war zum Teil im Vergleich zu den unstimulierten Zellen leicht erhöht; die beobachteten Differenzen lagen jedoch im Bereich der Standardabweichungen (**Tab. 4.3.1**).

Zusammenfassend deuten die Befunde darauf hin, daß die Kreuzvernetzung von RT6.1 auf NK- und T-Zellen Signale ausgelöst hatte, die zu einer verringerten RT6.1-Expression auf der Oberfläche der Zellen führten.



**Abb. 4.3.2: Reduzierte RT6.1-Expression auf Milz-NK- und -T-Zellen nach RT6-Kreuzvernetzung**

NK- und T-Zellen wurden aus LEW-Ratten-Milz isoliert. Die B-Zellen wurden mittels Nylonwatte abgetrennt. Durch Beladung der T-Zellen mit einem beads-gekoppeltem anti-TCR $\alpha/\beta$ -mAK (R73) und anschließender Separation über ein magnetisches Feld (MACS) wurde die NK-Population weiter angereichert. Die Zellen wurden über Nacht mit IL-2 und am darauffolgenden Tag 4, 8 und 24 h in Gegenwart von immobilisiertem anti-RT6.1-mAK (3G2) und IL-2 kultiviert. Isotyp- und Negativ-Kontrollansätze wurden mitgeführt. Die Analyse der RT6.1-Expression erfolgte durchflußzytometrisch. Die NK- und T-Zell-Populationen wurden zunächst in einer indirekten Doppelfluoreszenz-Analyse anhand ihrer NKR-P1- (mAK 3.2.3-bio + SAPE) und CD3- (mAK G-418 + G $\alpha$ M-FITC) Expression dargestellt und zur weiteren statistischen Auswertung durch das Setzen von Quadranten voneinander abgegrenzt. In einer weiteren Doppelfärbung wurde RT6.1 (mAK 3G2 + G $\alpha$ R-FITC) zusammen mit NKR-P1 (mAK 3.2.3-bio + SAPE) nachgewiesen. Die statistische Auswertung erfolgte unter Beibehaltung der zuvor gesetzten Quadranten. Zur Darstellung der RT6.1-Expression in Histogrammen wurde das Auswertefenster vor der Auswertung der grünen Fluoreszenzsignale auf die NK- bzw. T-Zell-Population gesetzt. Die Marker zur Abgrenzung der antigennegativen Zellen wurden anhand der G $\alpha$ R-FITC-Kontrollen gesetzt. Die Histogramme der Negativ- und Isotyp-Kontrollansätze sind jeweils überlagert dargestellt.

- (\*1) prozentualer Anteil der in dem Quadranten gelegenen Population an der Gesamtpopulation
- (\*2) prozentualer Anteil der RT6.1-positiven Zellen an der Gesamtpopulation der NK-Zellen
- (\*3) mittlere Fluoreszenzintensität der in dem Quadranten gelegenen, RT6.1-positiven NK-Zell-Population
- (\*4) prozentualer Anteil der RT6.1-positiven Zellen an der Gesamtpopulation der T-Zellen
- (\*5) mittlere Fluoreszenzintensität der in dem Quadranten gelegenen, RT6.1-positiven T-Zell-Population

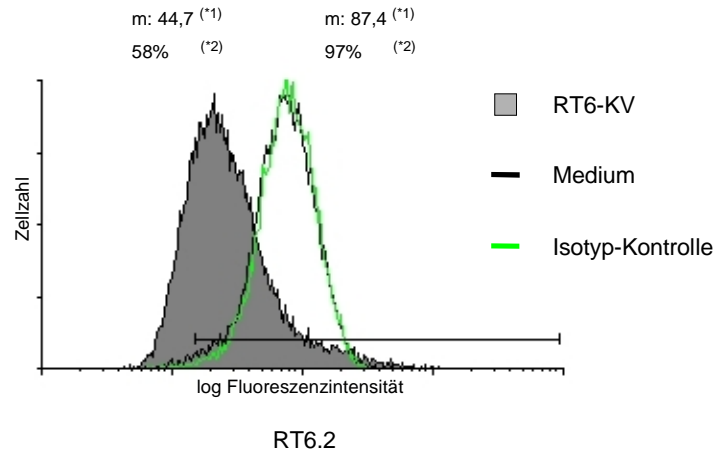
Es stellte sich nun die Frage, ob die aus der RT6.1-Kreuzvernetzung resultierende Modulation der RT6-Expression auch bei der RT6.2 exprimierenden Linie RNK-16 induziert werden kann.

Zellen der NK-Linie RNK-16 wurden 24 h mit immobilisiertem anti-RT6.2-mAK GY1/12 kultiviert. Isotyp- und Negativ-Kontrollansätze wurden mitgeführt. Die Auswirkungen der Stimulation auf die RT6.2-Dichte wurden am FACScan in einer indirekten Färbung (mAK GY1/12 + G $\alpha$ R-FITC) untersucht.

Wie in **Abb. 4.3.3** und **Tab. 4.3.1** gezeigt, führte auch bei der Linie RNK-16 die Kreuzvernetzung von RT6 zu einer deutlichen Herabregulation der RT6-Dichte. Nach 24-stündiger Stimulation hatte sich der Anteil der RT6.2-positiven Zellen an der Gesamtpopulation um nahezu die Hälfte von  $97,7\% \pm 1$  auf  $56,1\% \pm 3$  verringert. Begleitend sank die mittlere Fluoreszenzintensität der Gesamtpopulation von  $85,7 \pm 1,3$  auf  $40,8 \pm 5,3$ . Die RT6.2-Dichte auf der Zelloberfläche wurde somit um mehr als die Hälfte reduziert. Die RT6.2-Expression der Zellen der Isotyp- und Negativ-Kontrollansätze waren miteinander vergleichbar.



Aus diesen Befunden kann abgeleitet werden, daß RT6.2 in der Lage war, Signale zu übermitteln, die eine reduzierte RT6-Oberflächenexpression zur Folge hatten.



**Abb. 4.3.3: Reduzierte RT6-Expression auf der NK-Linie RNK-16 nach RT6.2-Kreuzvernetzung**

Die Linie RNK-16 wurde 24 h in Gegenwart von immobilisiertem anti-RT6.2-mAK (GY1/12) kultiviert. Als Kontrollen wurden Zellen unter identischen Bedingungen ohne mAK (Medium-Kontrolle) bzw. mit einem , irrelevanten mAK gleichen Isotyps (Isotyp-Kontrolle) kultiviert. Die RT6.2-Expression der Zellen wurde durchflußzytometrisch mittels indirekter Färbung (mAK GY1/12 + G $\alpha$ R-FITC) untersucht. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus einer Gruppe (n = 3). Die Medium- und Isotyp-Kontrollansätze sind überlagert dargestellt. Die Marker zur Abgrenzung antigennegativer Zellen wurden anhand der G $\alpha$ R-FITC-Kontrollen der FACS-Färbung gesetzt.

(\*1) mittlere Fluoreszenzintensität (m) der Gesamtpopulation

(\*2) prozentualer Anteil der RT6.2-positiven Zellen an der Gesamtpopulation

**Tab. 4.3.1: Reduktion der RT6-Oberflächenexpression nach antikörpervermittelter RT6-Kreuzvernetzung**

Dauer der Stimulation [h]		RT6-Expression							
		NK-Linie 3651 <sup>(*1)</sup>		NK-Linie RNK-16 <sup>(*2)</sup>		Milz-NK-Zellen <sup>(*3)</sup>		Milz-T-Zellen <sup>(*3)</sup>	
		positive Zellen [%] (MW ± SD)	mean Gesamtpop. (MW ± SD)	positive Zellen [%] (MW ± SD)	mean Gesamtpop. (MW ± SD)	positive Zellen [%] (MW ± SD)	mean positive Pop. (MW ± SD)	positive Zellen [%] (MW ± SD)	mean positive Pop. (MW ± SD)
4	RT6-Kreuzvernetzung	97,4 ± 2,8	400,4 ± 89,8	n.b.	n.b.	21,7 ± 6,6	52,6 ± 23,4	54,3 ± 22,3	80,6 ± 42,3
	Negativ-Kontrolle	97,8 ± 3,4	451,0 ± 67,2	n.b.	n.b.	50,6 ± 10,8	63,1 ± 6,3	61,4 ± 22,4	198,3 ± 36,5
	Isotyp-Kontrolle	97,7 ± 3,2	442,8 ± 67,0	n.b.	n.b.	54,4 ± 6,5	72,1 ± 4,8	63,6 ± 19,5	219,2 ± 8,4
8	RT6-Kreuzvernetzung	97,1 ± 3,2	288,2 ± 49,4	n.b.	n.b.	18,2 ± 2,8	56,9 ± 27,6	53,3 ± 11,8	64,2 ± 28,6
	Negativ-Kontrolle	97,9 ± 3,1	441,5 ± 53,9	n.b.	n.b.	50,5 ± 7,1	61,8 ± 0,6	59,1 ± 16,7	184,7 ± 1,8
	Isotyp-Kontrolle	97,8 ± 3,3	456,0 ± 61,9	n.b.	n.b.	54,7 ± 2,2	81,4 ± 7,1	62,2 ± 17,6	237,2 ± 29,8
24	RT6-Kreuzvernetzung	90,9 ± 2,6	165,1 ± 38,7	56,1 ± 3,2	40,8 ± 5,3	31,9 ± 12,6	67,9 ± 23,8	63,9 ± 13,1	98,5 ± 14,1
	Negativ-Kontrolle	97,5 ± 3,4	406,3 ± 60,2	97,7 ± 1,3	85,7 ± 1,3	70,6 ± 10,7	120,9 ± 49,4	71,2 ± 16,2	278,0 ± 13,9
	Isotyp-Kontrolle	97,5 ± 3,6	384,2 ± 34,2	98,4 ± 0,6	85,3 ± 1,7	72,5 ± 8,1	128,4 ± 50,3	69,7 ± 19,8	296,3 ± 28,1

(\*1) Die Zellen der NK-Linie 3651 wurden wie in Abb. 4.3.1 beschrieben stimuliert (n=5).

(\*2) Die Zellen der NK-Linie RNK-16 wurden wie in Abb. 4.3.3 beschrieben stimuliert (n=3).

(\*3) Die Zellen wurden wie in Abb. 4.3.2 beschrieben isoliert und stimuliert. (n=3)

### 4.3.2 Immunzytometrische Analyse

Die in Folge der RT6-Kreuzvernetzung verminderte RT6-Expression warf die Frage nach dem Mechanismus auf, der dem beobachteten Effekt zugrunde liegt. Ein möglicher Mechanismus wäre die Endozytose des RT6-Antikörper-Komplexes, an die sich, wie für die Freisetzung einer der beiden Formen von CD14 von Monozyten gezeigt (Durieux et al., 1994), nach Abspaltung von Membran-Komponenten die Sekretion des betrachteten Moleküls anschließen könnte. Um zu klären, ob eine Internalisierung der RT6-Antikörper-Komplexe dem beobachteten Effekt zugrunde liegt, wurden die Auswirkungen der RT6-Kreuzvernetzung auf die RT6-Expression durch Färbung von Zytopräparaten untersucht. Neben auf der Oberfläche exprimierten Molekülen können mit dieser Methode auch zytoplasmatisch vorliegende Proteine nachgewiesen werden.

Zellen der Linie 3651 wurden 24 h durch Kreuzvernetzung von RT6.1 stimuliert. Als Kontrollen wurden Zellen ohne Antikörper bzw. in Gegenwart eines Isotyp-Kontrollantikörpers (**Abb. 4.3.4, C**) kultiviert.

Der Nachweis von RT6 erfolgte durch schrittweise Inkubation der Zytopräparate mit anti-RT6.1-mAK (mAK 3G2) und Merettich-Peroxidase gekoppeltem Ziege-anti-Ratte-AK (GαR-POX). Die Umsetzung des Substratgemisches 3-Amino-9-Ethylcarbazol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch das Enzym führt zu einer roten Farbentwicklung. Im Anschluß wurde mit Hämalaun nach Weigert eine Kerngegenfärbung durchgeführt. Zur Kontrolle der Spezifität der Färbung wurden Zellen des Isotyp-Kontrollansatzes nur mit Sekundärantikörper inkubiert (**Abb. 4.3.4, D**).

Alle unstimulierten Zellen exprimierten RT6.1. Neben der Zellmembran wurde auch das Zytoplasma der Zellen stark angefärbt (**Abb. 4.3.4, A**). Die RT6-Kreuzvernetzung hatte eine deutliche Reduktion der membranständigen und zytoplasmatischen RT6.1-Moleküle zur Folge und führte zu der Entstehung RT6.1-negativer Zellen (**Abb. 4.3.4, B**). Dieser Befund läßt die Internalisierung von RT6 als den der Modulation der RT6-Dichte zugrundeliegenden Mechanismus unwahrscheinlich erscheinen. Es kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden, daß RT6.1 gegebenenfalls nach seiner Endozytose sofort in zytoplasmatischen Kompartimenten abgebaut oder, nach Abspaltung des GPI-Ankers, innerhalb eines kurzen Zeitraumes wieder freigesetzt wurde und somit nicht mehr nachweisbar war. Der Befund der deutlich reduzierten zytoplasmatischen RT6.1-Menge deutet zudem darauf hin, daß die vor der Stimulation vorhandenen, intrazellulären RT6-Moleküle in Folge der RT6-Kreuzvernetzung entweder freigesetzt oder alternativ intrazellulär degradiert wurden.

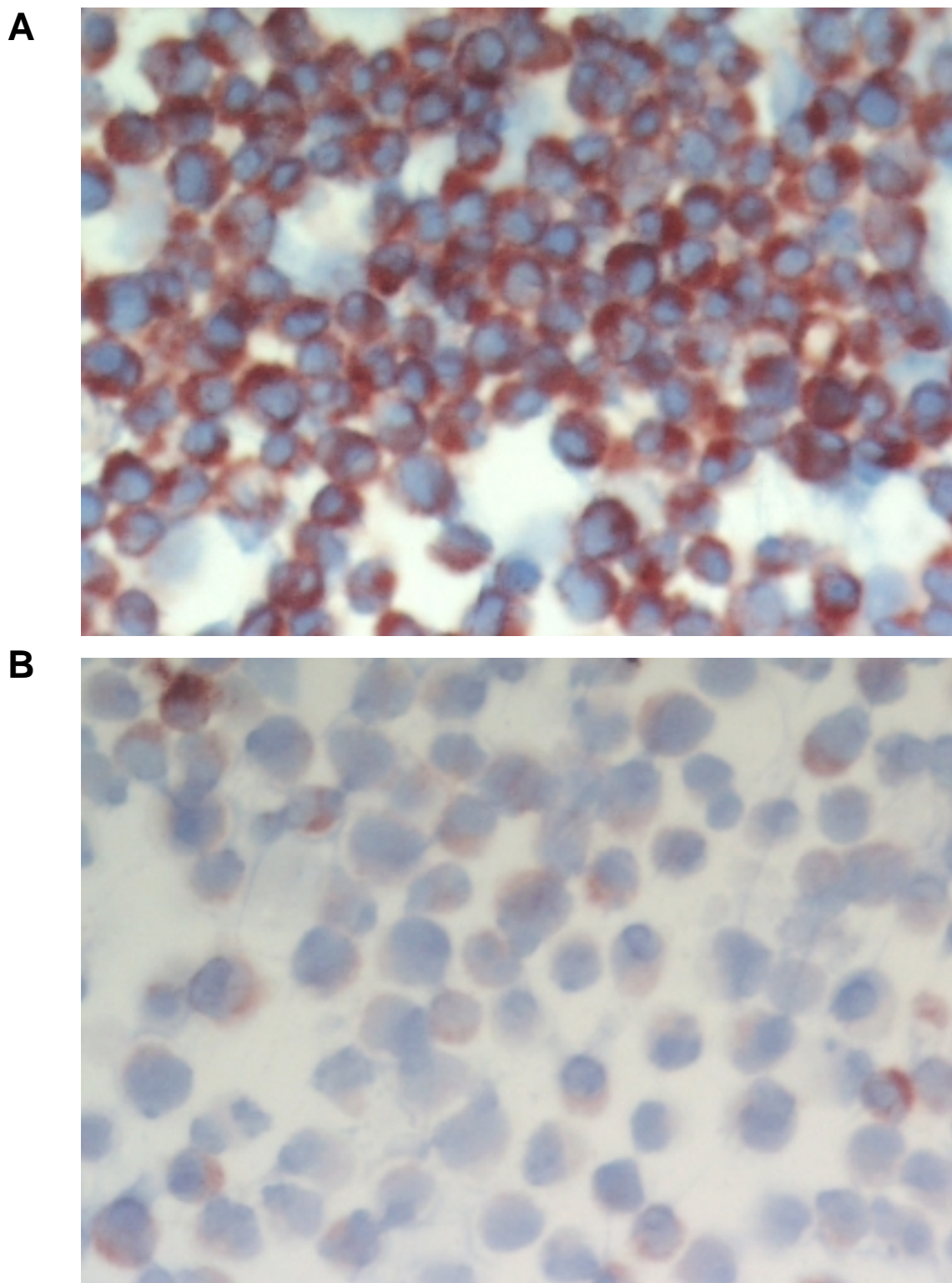
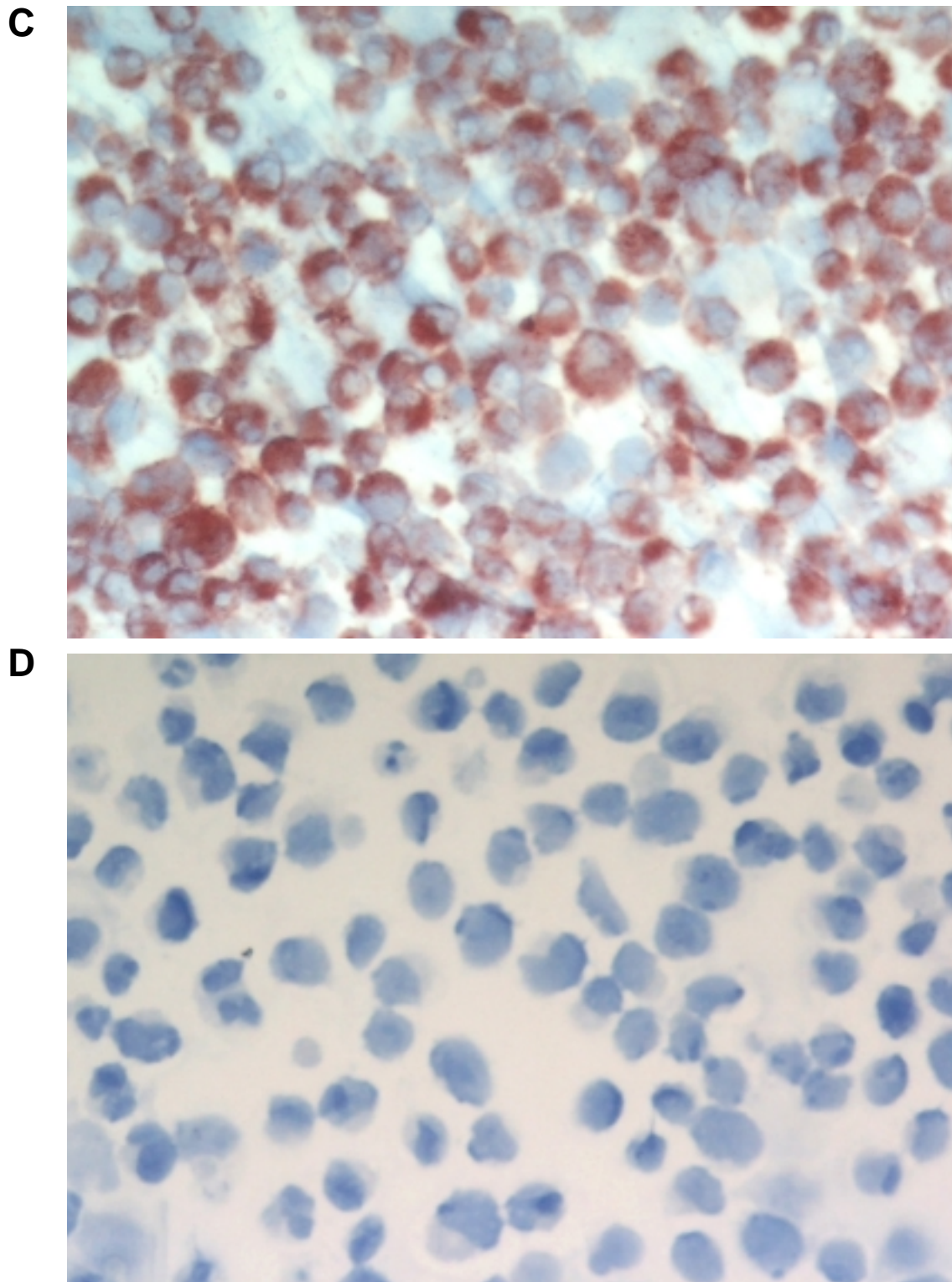


Abb. 4.3.4 Immunzytometrische Analyse der RT6.1-Expression der Linie 3651 nach RT6-Kreuzvernetzung  
Zytopräparate der Linie 3651 wurden mit anti-RT6.1-mAK (3G2) und G $\alpha$ R-Peroxidase + AEC/H $_2$ O $_2$  gefärbt.  
Die Darstellung der Zellkerne erfolgte mit Hämalaun nach Weigert.

**A.** Unstimulierte Zellen (Medium-Kontrolle) **B:** Zellen nach 24stündiger RT6.1-Kreuzvernetzung



**Abb. 4.3.4 Immunzytometrische Analyse der RT6.1-Expression der Linie 3651 nach RT6-Kreuzvernetzung**

**C:** Zellen nach 24stündiger Kultivierung mit Kontrollantikörper (Isotyp-Kontrolle)

**D:** G $\alpha$ R-Peroxidase/Substrat, Negativ-Kontrollfärbung (ohne anti-RT6.1-mAK) der Isotyp-Kontrolle

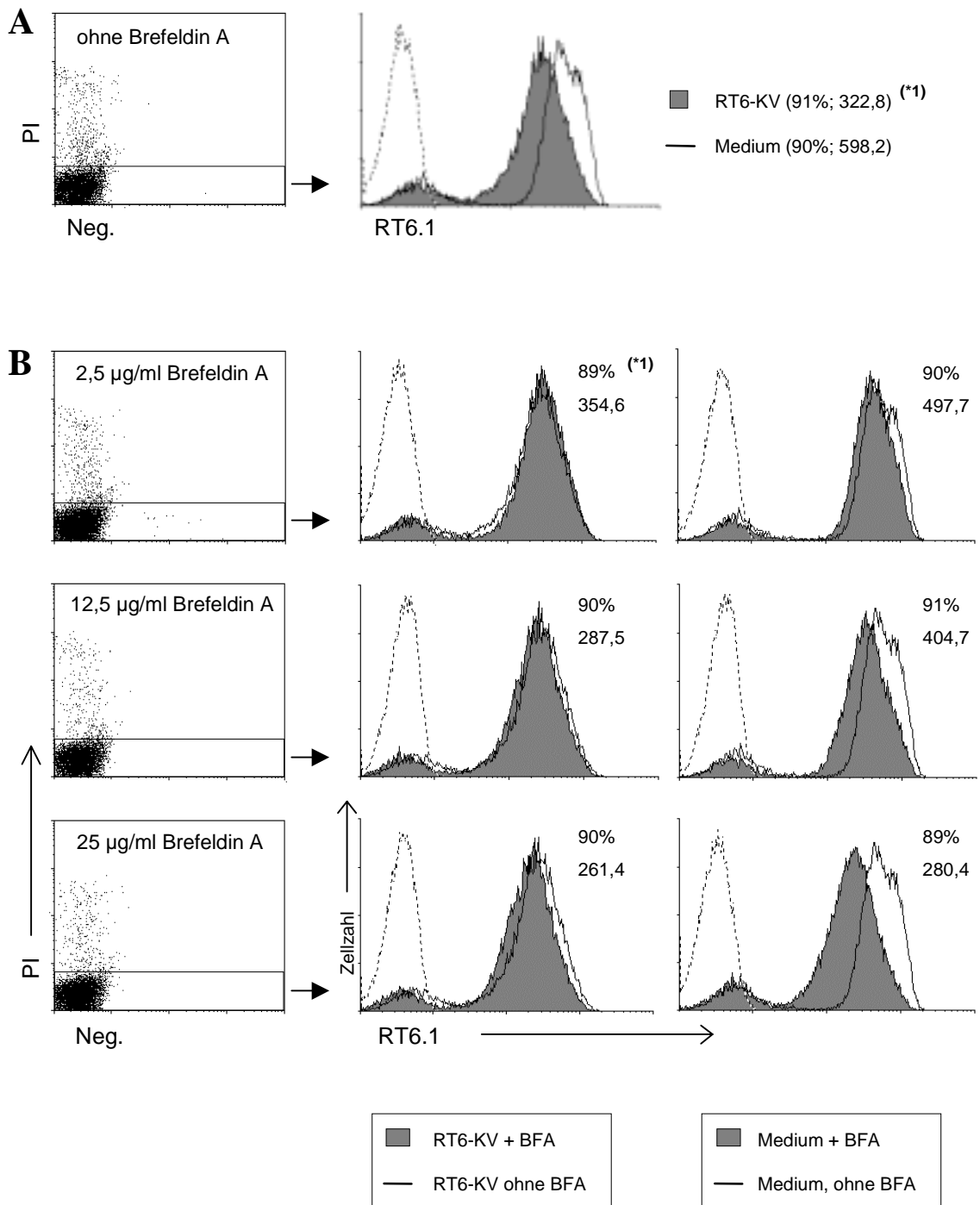
### 4.3.3 RT6-Kreuzvernetzung in Gegenwart von Brefeldin A

Im vorangegangenen Experiment konnte eine Internalisierung von RT6.1 nach dessen Kreuzvernetzung nicht ausgeschlossen werden. Eine Möglichkeit zur eindeutigen Klärung dieser Frage bietet der Einsatz von Brefeldin A (BFA), eines Inhibitors von Endozytose und vesikulärem Transport. Dieser sollte, wenn ein endozytotischer Mechanismus zugrunde liegt, die Herabregulation der RT6.1-Dichte unterdrücken können.

Die Linie 3651 wurde 3 h in Gegenwart von immobilisiertem anti-RT6.1-mAK (3G2) kultiviert. Als Kontrollen wurden Zellen ohne Zusatz von Antikörper mitgeführt. In weiteren Ansätzen erfolgte die Kultivierung bzw. die RT6-Kreuzvernetzung bei gleichzeitigem Zusatz von BFA in verschiedenen Konzentrationen (25; 12,5; 2,5 µg/ml). Im Anschluß wurde die RT6.1-Expression der Zellen durchflußzytometrisch analysiert. Zur Überprüfung der Zellvitalität wurde gleichzeitig mit Propidiumiodid gefärbt. Vor der statistischen Auswertung der RT6-Expression wurde das Auswertefenster auf die vitalen Zellen gesetzt (**Abb. 4.3.5**).

Die Stimulation der Zellen über RT6 führte zu einer reduzierten RT6.1-Dichte (**Abb. 4.3.5, A**). Der Zusatz von BFA konnte die durch Kreuzvernetzung von RT6 bedingte Verringerung der RT6.1-Expression nicht inhibieren (**Abb. 4.3.5, B**); die Inkubation der Zellen mit 25 µg/ml BFA führte im Gegenteil zu einer leichten Verstärkung des beschriebenen Effektes (mean RT6-Kreuzvernetzung + BFA: 261,4; mean RT6-Kreuzvernetzung, ohne BFA: 322,8). Die durch RT6-Kreuzvernetzung induzierte Reduktion der RT6.1-Dichte auf der Linie 3651 ist somit nicht auf eine Internalisierung des Moleküls zurückzuführen.

Im Fall der ohne Antikörper kultivierten Zellen führte der Zusatz von BFA im Vergleich zu den Negativ-Kontrollansätzen konzentrationsabhängig zu einer deutlich verminderten RT6.1-Expression (**Abb. 4.3.5, B**). BFA inhibiert bereits in relativ geringen Konzentrationen (200 nM) den anterograden vesikulären Transport vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat. Die Ausschleusung neu synthetisierter Membranproteine wird somit blockiert. Der Zusatz von BFA (25 µg/ml) führte bereits innerhalb einer relativ kurzen Zeitspanne (3 h) zu einer auf die Hälfte reduzierten RT6.1-Dichte (mean Zellen ohne BFA: 598,2; Zellen mit BFA: 280,4).



**Abb. 4.3.5: RT6.1-Expression der Linie 3651 nach RT6-Kreuzvernetzung in Gegenwart von Brefeldin A**  
**A:** Zellen der Linie 3651 wurden 3 h in Gegenwart von immobilisiertem anti-RT6.1-mAK (3G2), sowie ohne mAK kultiviert. **B:** In parallelen Ansätzen erfolgte die RT6-Kreuzvernetzung bei gleichzeitigem Zusatz von Brefeldin A (2,5; 12,5; 25 µg/ml). Die RT6.1-Expression wurde durchflußzytometrisch (mAK 3G2 + GαR-FITC) analysiert; durch Färbung mit Propidiumiodid (PI) konnte das Auswertefenster auf die vitalen Zellen gesetzt werden (Dot-Blots). In den Histogrammen sind die jeweiligen GaR-FITC-Kontrollen (Zellen ohne RT6-Kreuzvernetzung + BFA) überlagert (-----) dargestellt. (\*1): prozentualer Anteil und mittlere Fluoreszenzintensität der RT6.1-positiven Population.

#### 4.3.4 Analyse der an der Freisetzung von RT6.1 beteiligten Enzyme

Im vorangegangenen Abschnitt konnte gezeigt werden, daß die nach RT6-Kreuzvernetzung beobachtete Reduktion der RT6.1-Dichte nicht auf eine Endozytose der RT6-Antikörper-Komplexe zurückgeht. Dieser Befund läßt vermuten, daß RT6 durch enzymatische Spaltung des GPI-Ankers oder des Proteins von der Zelloberfläche freigesetzt wird. Aus den mit BFA durchgeführten Experimenten kann außerdem rückgeschlossen werden, daß die beteiligten Enzyme Zellmembran-assoziiert oder frei im Kulturmedium vorliegen und der zu der Freisetzung von RT6 führende Mechanismus an der Zelloberfläche abläuft. Demzufolge sollte der Zusatz bestimmter spezifischer Enzyminhibitoren während der RT6-Kreuzvernetzung die beobachtete Reduktion der RT6-Dichte hemmen können.

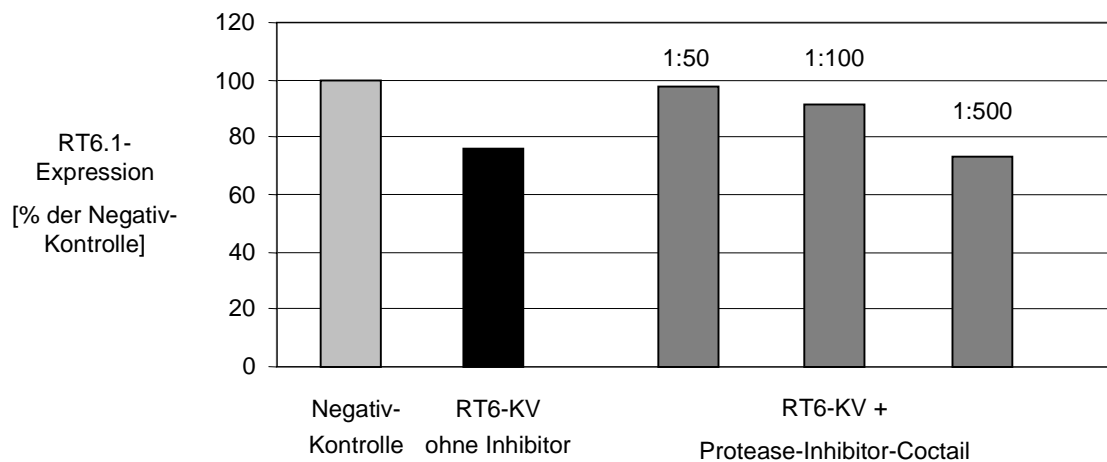
Um zunächst zu klären, ob Proteasen an der beobachteten Modulation der RT6-Dichte beteiligt sind, wurde die RT6-Kreuzvernetzung unter Zusatz eines kommerziell erhältlichen Protease-Inhibitor-Coctails durchgeführt. Es handelt sich um eine Mischung verschiedener wasserlöslicher Protease-Inhibitoren, die eine breite Spezifität für die Hemmung der enzymatischen Aktivität von Serin-, Cystein-, Asparaginsäure- und Metallo-Proteasen besitzt. Zellen der Linie 3651 wurden 3 1/2 h in Gegenwart von immobilisiertem anti-RT6.1-mAK (3G2) bzw. ohne mAK kultiviert. Parallel erfolgte die RT6-Kreuzvernetzung unter Zusatz verschiedener Verdünnungen des Inhibitor-Coctails (1:10; 1:50; 1:100; 1:500). Die RT6.1-Expression wurde durchflußzytometrisch (mAK 3G2 + G $\alpha$ R-FITC) analysiert. Um zytotoxische Effekte der Enzyminhibitoren ausschließen zu können, wurde das Auswertefenster vor der Untersuchung der RT6-Expression durch Messung der Vorwärts- und Seitwärts-Streulicht-Eigenschaften auf die vitalen Zellen gesetzt. Die Vitalität der Zellen wurde zusätzlich mikroskopisch durch Färbung mit Trypanblau überprüft.

Die RT6-Kreuzvernetzung hatte trotz der kurzen Stimulationsdauer eine deutlich reduzierte RT6.1-Expression zur Folge (**Abb. 4.3.6 (I) und (II)**); die RT6.1-Expressionsdichte der Zellen wurde durch die Kreuzvernetzung in Relation zu den Zellen der Negativ-Kontrolle (ohne Zusatz von AK bzw. Inhibitor) um 25% verringert. Der Inhibitor-Coctail, eingesetzt in einer 1:10-fachen Verdünnung, konnte die beobachtete Modulation der RT6-Dichte vollständig blockieren (**Abb. 4.3.6. und Tab. 4.3.2**). Die inhibierende Wirkung des Coctails war konzentrationsabhängig; in einer 1:500-Verdünnung eingesetzt, hatte der Inhibitor-Coctail keinen Einfluß auf die RT6.1-Oberflächen-Expression.



Diese Ergebnisse lassen den Rückschluß zu, daß auf die RT6-Kreuzvernetzung eine enzymatische Abspaltung des Moleküls folgt, an der eine oder verschiedene Unterklassen von Proteasen maßgeblich beteiligt sind.

Die RT6.1-Expression der unstimulierten, ohne Antikörper kultivierten Zellen wurde durch den Zusatz der Inhibitor-Mischung in dem beobachteten Zeitrahmen nicht signifikant beeinflusst (**Abb. 4.3.6 (II)**)



**Abb. 4.3.6 (I): Konzentrationsabhängiger Effekt eines Protease-Inhibitor-Coctails auf die durch RT6-Kreuzvernetzung bedingte Reduktion der RT6.1-Oberflächen-Expression**

**A:** Zellen der Linie 3651 wurden 3 1/2 h in Gegenwart von immobilisiertem anti-RT6.1-mAK (3G2) bzw. ohne mAK kultiviert. **B:** Parallel erfolgte die RT6-Kreuzvernetzung unter Zusatz verschiedener Verdünnungen eines Protease-Inhibitor-Coctails (Sigma, 1:10; 1:50; 1:100; 1:500). Die Analyse der RT6.1-Expression erfolgte anhand Durchflußzytometrie. Angegeben sind jeweils die mittleren Fluoreszenzintensitäten der Gesamtpopulation in Prozent der mittleren Fluoreszenzintensität der Negativ-Kontrolle (Zellen ohne RT6-Kreuzvernetzung und ohne Inhibitor-Coctail).

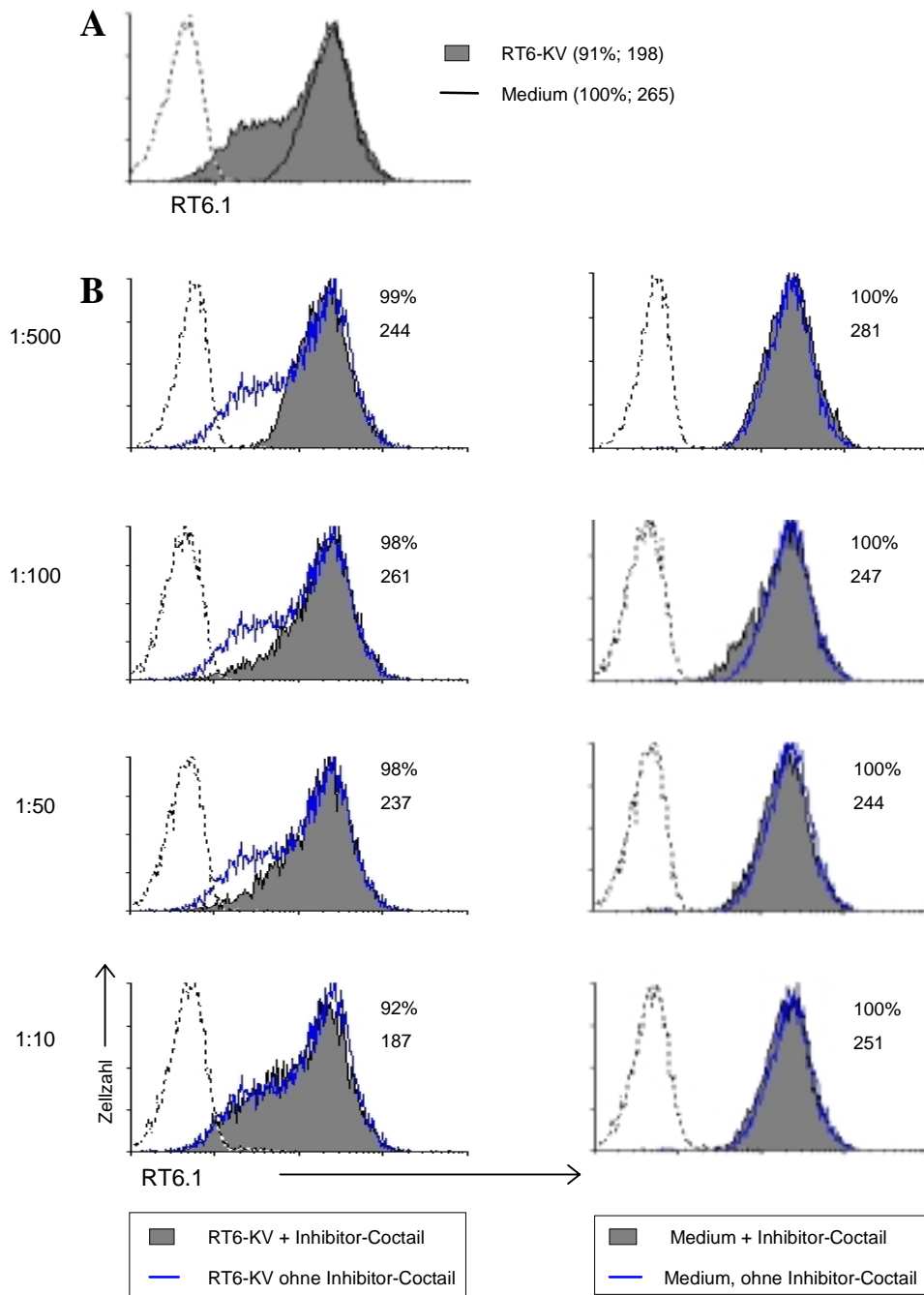


Abb. 4.3.6 (II): RT6.1-Expression der Linie 3651 nach RT6-Kreuzvernetzung in Gegenwart eines Protease-Inhibitor-Coctails

Zellen der Linie 3651 wurden wie in 4.3.6 (I) beschrieben unter Zusatz verschiedener Verdünnungen des Inhibitor-Coctails durch RT6-Kreuzvernetzung stimuliert. Die RT6.1-Expression wurde durchflußzytometrisch (mAK 3G2 + G $\alpha$ R-FITC) analysiert; das Auswertefenster wurde zuvor durch Messung der Vorwärts- und Seitwärts-Streulicht-Eigenschaften auf die vitalen Zellen gesetzt. Die jeweiligen G $\alpha$ R-FITC-Kontrollen (Zellen ohne RT6-Kreuzvernetzung + Inhibitor) sind überlagert (----) dargestellt; der prozentuale Anteil der RT6-positiven Zellen und die mittleren Fluoreszenzintensitäten der Gesamtpopulation sind angegeben.

Es stellte sich nun die Frage, welche Unterklasse von Proteasen an der Freisetzung von RT6.1 nach dessen Kreuzvernetzung beteiligt ist. Zudem sollte untersucht werden, ob der Mechanismus der RT6.1-Abspaltung nach Kreuzvernetzung die Aktivierung einer Phospholipase vom Typ D (PLD) beinhaltet. Um den für die Abspaltung von RT6.1 verantwortlichen enzymatischen Mechanismus weiter eingrenzen zu können, wurde die RT6.1 Kreuzvernetzung auf der Linie 3651 in Gegenwart verschiedener Inhibitoren durchgeführt, die spezifisch die Enzymaktivität bestimmter Enzym-Unterklassen blockieren.

Da einige Inhibitoren zytotoxisch wirken können, wurde die Vitalität der Zellen in jedem Experiment mikroskopisch nach Färbung mit Trypanblau und durchflußzytometrisch durch Färbung mit Propidiumiodid und/oder anhand der Vorwärts- und Seitwärts-Streulicht Eigenschaften der Zellen überprüft. Die Auswahl der Inhibitoren wurde, mit einer Ausnahme (PMSF, gelöst in Isopropanol), auf wasserlösliche Substanzen beschränkt, um Lösungsmittel-Effekte ausschließen zu können. Alle Inhibitoren wurden in Konzentrationen eingesetzt, von denen die spezifische Hemmung der jeweiligen Enzym-Unterklasse sowie eine nicht zytotoxische Wirkung in der Literatur hinreichend belegt sind. Um die Inhibitor-Wirkung gegebenenfalls konzentrationsabhängig untersuchen zu können, wurden begleitend höhere und niedrigere Konzentrationen der jeweiligen Substanz eingesetzt.

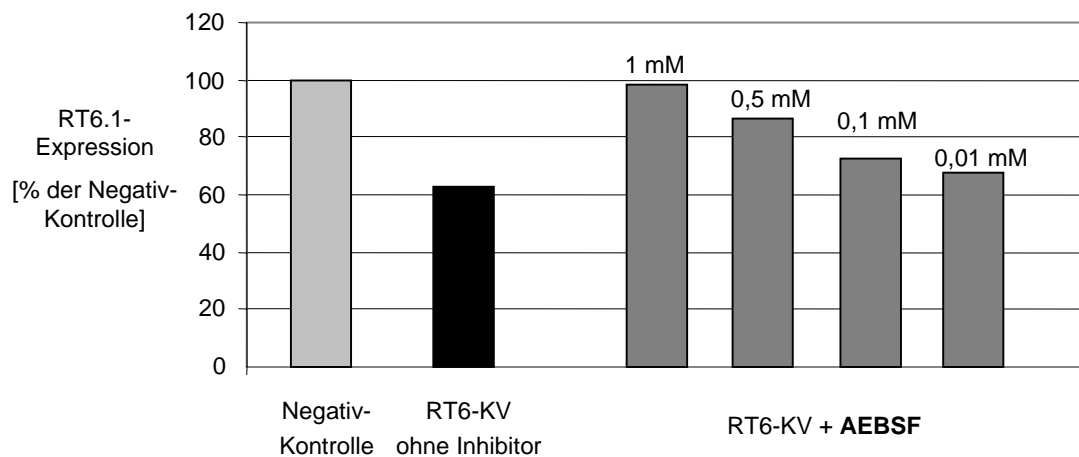
Die Ergebnisse, zusammengefaßt in **Tab. 4.3.2**, zeigten, daß E-64, ein Inhibitor von Cystein-Proteasen mit irreversibler Wirkung (Barrett et al., 1982), 1,10-Phenanthrolin und sein nicht membrangängiges Derivat Bathophenanthrolin, beides Inhibitoren von  $Zn^{2+}$ -abhängigen Metallo-Proteasen und der von divalenten Kationen abhängigen GPI-PLD (Powers und Harper, 1986), EDTA, ein Inhibitor von Metallo-Proteasen mit reversibler Wirkung und Aprotinin, ein Inhibitor von Serin-Proteasen mit reversibler Wirkung, keinen signifikanten Einfluß auf die durch Kreuzvernetzung induzierte Abspaltung von RT6.1 hatten.

Der Zusatz von AEBSF und PMSF, beides Inhibitoren von Serin-Proteasen mit irreversibler Wirkung (Baker et al., 1971; Moss et al., 1978), hatte jedoch in den optimalen Konzentrationen jeweils eine 100%ige Hemmung der Reduktion der RT6.1-Dichte zur Folge (**Abb. 4.3.7, I und II; Abb. 4.3.8**). Der inhibierende Effekt war in beiden Fällen konzentrationsabhängig, die prozentuale Hemmung der Abspaltung nahm mit sinkenden Inhibitor-Konzentrationen ab (**Tab. 4.3.2**).

Aus diesen Ergebnissen kann rückgeschlossen werden, daß an der Freisetzung von RT6.1 nach dessen Kreuzvernetzung Serin-Proteasen maßgeblich beteiligt sind. Die Tatsache, daß Aprotinin als Inhibitor von Serin-Proteasen im Gegensatz zu AEBSF und PMSF die RT6.1-

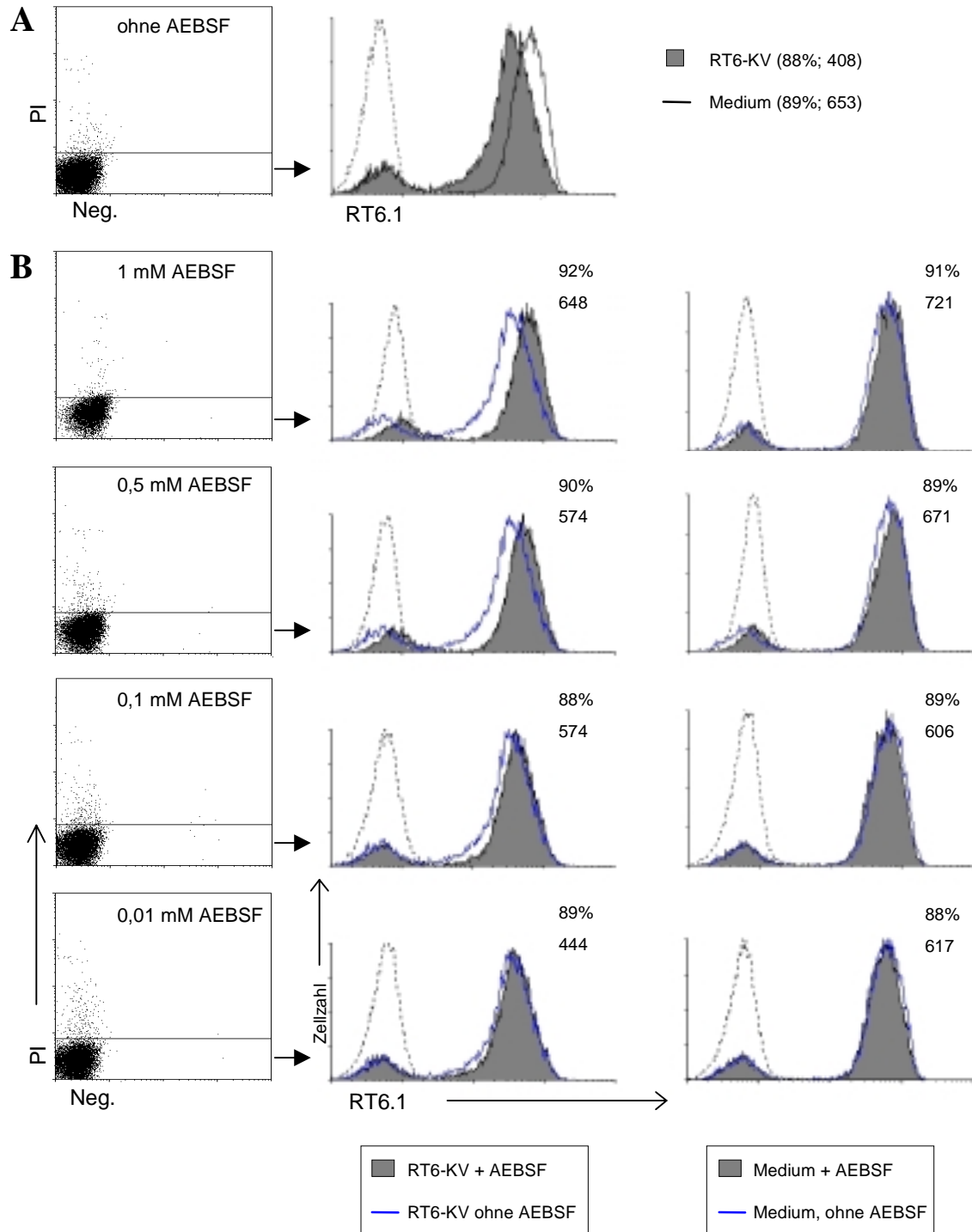
Abspaltung nicht blockieren konnte, ist vermutlich auf seine kompetitive und reversible Wirkungsweise zurückzuführen.

Darüber hinaus deuten die Befunde darauf hin, daß der RT6.1-Freisetzungsmechanismus nach RT6-Kreuzvernetzung nicht die Aktivierung von Cystein- und Metallo-Proteasen oder der GPI-PLD beinhaltet.

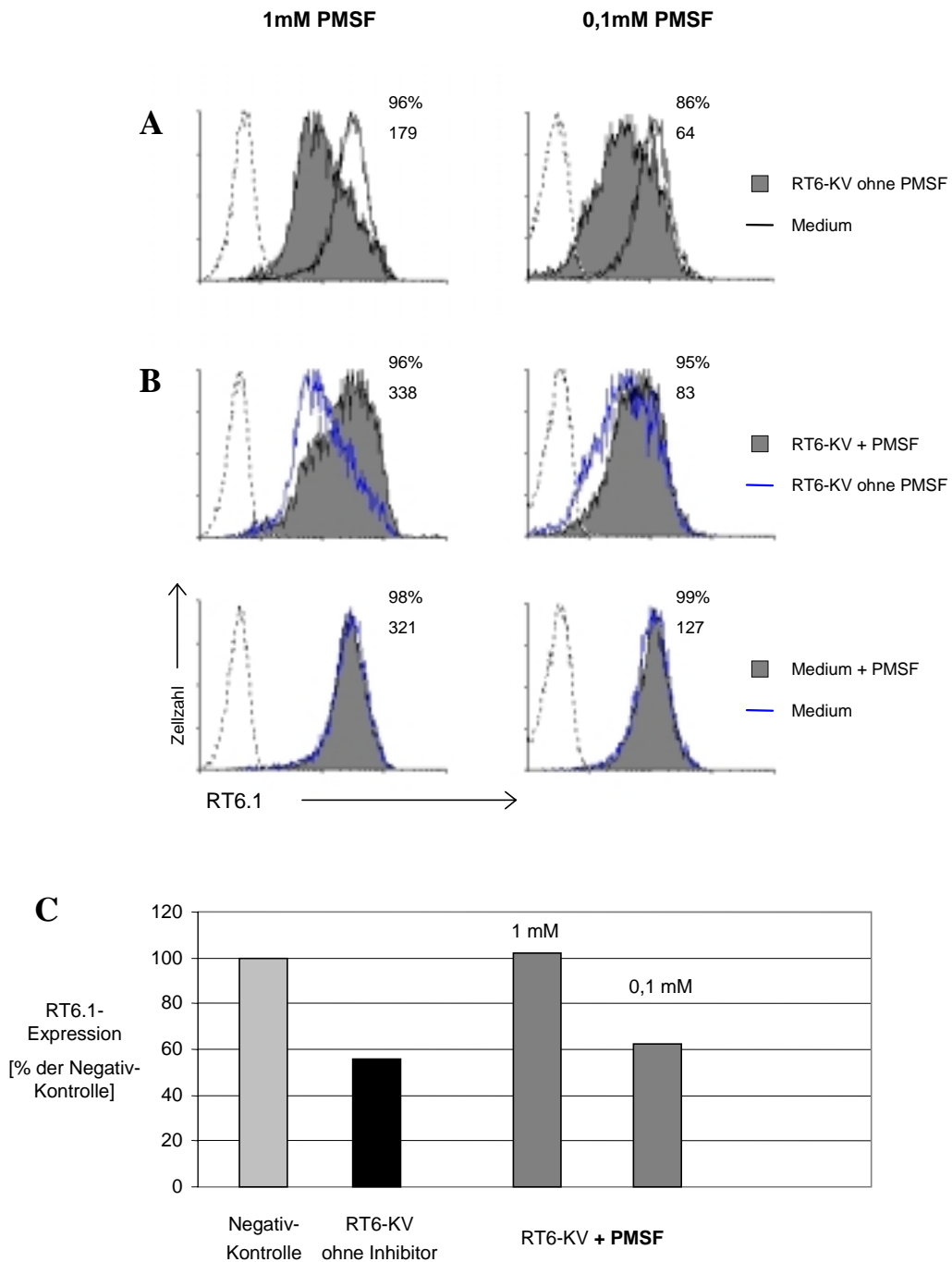


**Abb. 4.3.7 (I): Konzentrationsabhängige Hemmung der durch Kreuzvernetzung induzierten Reduktion der RT6.1-Oberflächen-Expression durch AEBSF**

Zellen der Linie 3651 wurden 3 h in Gegenwart von immobilisiertem anti-RT6.1-mAK (3G2) bzw. ohne mAK kultiviert. In parallelen Ansätzen erfolgte die RT6-Kreuzvernetzung unter Zusatz von AEBSF (1; 0,5; 0,1; 0,01 mM). Die Analyse der RT6.1-Expression erfolgte anhand Durchflußzytometrie. Angegeben sind jeweils die mittleren Fluoreszenzintensitäten der Gesamtpopulation in Prozent der mittleren Fluoreszenzintensität der Negativ-Kontrolle (Zellen ohne RT6-Kreuzvernetzung und ohne Inhibitor-Coctail).



**Abb. 4.3.7 (II): RT6.1-Expression der Linie 3651 nach RT6-Kreuzvernetzung in Gegenwart von AEBSF**  
 A: Zellen der Linie 3651 wurden 3 h in Gegenwart von immobilisiertem anti-RT6.1-mAK (3G2) bzw. ohne mAK kultiviert. B: In parallelen Ansätzen erfolgte die RT6-Kreuzvernetzung unter Zusatz von AEBSF (1; 0,5; 0,1; 0,01 mM). Die RT6.1-Expression wurde durchflußzytometrisch (mAK 3G2 + GαR-FITC) analysiert; durch Färbung mit Propidiumiodid (PI) konnte das Auswertefenster auf die vitalen Zellen gesetzt werden (Dot-Blots). In den Histogrammen sind die jeweiligen GaR-FITC-Kontrollen (Zellen ohne RT6-Kreuzvernetzung + AEBSF) überlagert (----) dargestellt, der prozentuale Anteil der RT6-positiven Zellen und die mittleren Fluoreszenzintensitäten der Gesamtpopulation sind in den Histogrammen angegeben.



**Abb. 4.3.8: Hemmung der durch Kreuzvernetzung induzierten Reduktion der RT6.1-Oberflächen-Expression durch PMSF**

**A:** Die Linie 3651 wurde 3 h in Gegenwart von anti-RT6.1-mAK (3G2) bzw. ohne mAK kultiviert. **B:** Parallel erfolgte die RT6-Kreuzvernetzung unter Zusatz von PMSF (1 mM bzw. 0,1 mM). Die RT6.1-Expression wurde durchflußzytometrisch (mAK 3G2 + G $\alpha$ R-FITC) analysiert; das Auswertefenster wurde zuvor durch Messung der Vorwärts- und Seitwärts-Streulicht-Eigenschaften auf die vitalen Zellen gesetzt. In den Histogrammen sind die jeweiligen GaR-FITC-Kontrollen (Zellen ohne RT6-Kreuzvernetzung + PMSF) überlagert (---) dargestellt, der prozentuale Anteil der RT6-positiven Zellen und die mittleren Fluoreszenzintensitäten der Gesamtpopulation sind angegeben. **(C)** Die mittleren Fluoreszenzintensitäten der Gesamtpopulation sind in Prozent der mittleren Fluoreszenzintensität der Negativ-Kontrolle (Zellen ohne RT6-Kreuzvernetzung und ohne PMSF) angegeben.



Inhibitor	Spezifität	Inhibition der Abspaltung [%]	Inhibitor-Konzentration bzw. -Verdünnung
Coctail <sup>(*)</sup>	Serin-, Cystein-, Asparagin-, Metallo-Proteasen	93,4	1:50
		58,1	1:100
		0	1:500
AEBSF	Serin-Proteasen, irreversible Inhibition	97,9	1 mM
		67,6	0,5 mM
		26,7	0,1 mM
		14,5	0,01 mM
PMSF	Serin-Proteasen, irreversible Inhibition	100	1 mM
		30,0	0,1 mM
E-64	Cystein-Proteasen, irreversible Inhibition	0	10 µM; 1 µM; 0,1 µM
1,10-Phenanthrolin	Zn <sup>2+</sup> -Metalloproteasen PI-PLD, intrazelluläre Wirkung	0	10 mM; 1 mM; 0,1 mM
Bathophenanthrolin	Zn <sup>2+</sup> -Metalloproteasen PI-PLD, extrazelluläre Wirkung	0	10 mM; 5 mM; 1 mM; 0,2 mM; 0,04 mM
EDTA	Metalloproteasen, reversible Inhibition	0	10 mM; 1 mM; 0,1 mM
Aprotinin	Serin-Proteasen, kompetitiv, reversible Inhibition	0	10 µg/ml



**Tab. 4.3.2: Effekte verschiedener Enzyminhibitoren auf die durch RT6-Kreuzvernetzung bedingte Reduktion der RT6.1-Oberflächen-Expression**

Zellen der NK-Linie 3651 wurden 3-4 h in Gegenwart von immobilisiertem anti-RT6.1-mAK (3G2) bzw. ohne mAK kultiviert. In parallelen Ansätzen erfolgte die RT6-Kreuzvernetzung unter Zusatz verschiedener Enzyminhibitoren in den angegebenen Konzentrationen. Die RT6.1-Expression wurde durchflußzytometrisch (mAK 3G2 + G $\alpha$ R-FITC) analysiert; das Auswertefenster wurde zuvor durch Messung der Vorwärts- und Seitwärts-Streulicht-Eigenschaften bzw. nach Färbung mit Propidiumiodid auf die vitalen Zellen gesetzt.

(\*1): AEBSF (20 mM), EDTA (10 mM), Bestatin (1,3 mM), E-64 (14  $\mu$ M), Leupeptin (10  $\mu$ M), Aprotinin (3  $\mu$ M).

Die prozentuale Inhibition wurde aus den mittleren Fluoreszenzintensitäten (mean) der Gesamtpopulationen wie folgt ermittelt:

$$\frac{(\text{mean Zellen mit RT6} - \text{KV mit Inhibitor}) - (\text{mean Zellen mit RT6} - \text{KV ohne Inhibitor})}{(\text{mean Zellen ohne RT6} - \text{KV ohne Inhibitor}) - (\text{mean Zellen mit RT6} - \text{KV ohne Inhibitor})}$$

## 4.4 Frühe Signaltransduktionseignisse nach Kreuzvernetzung von RT6

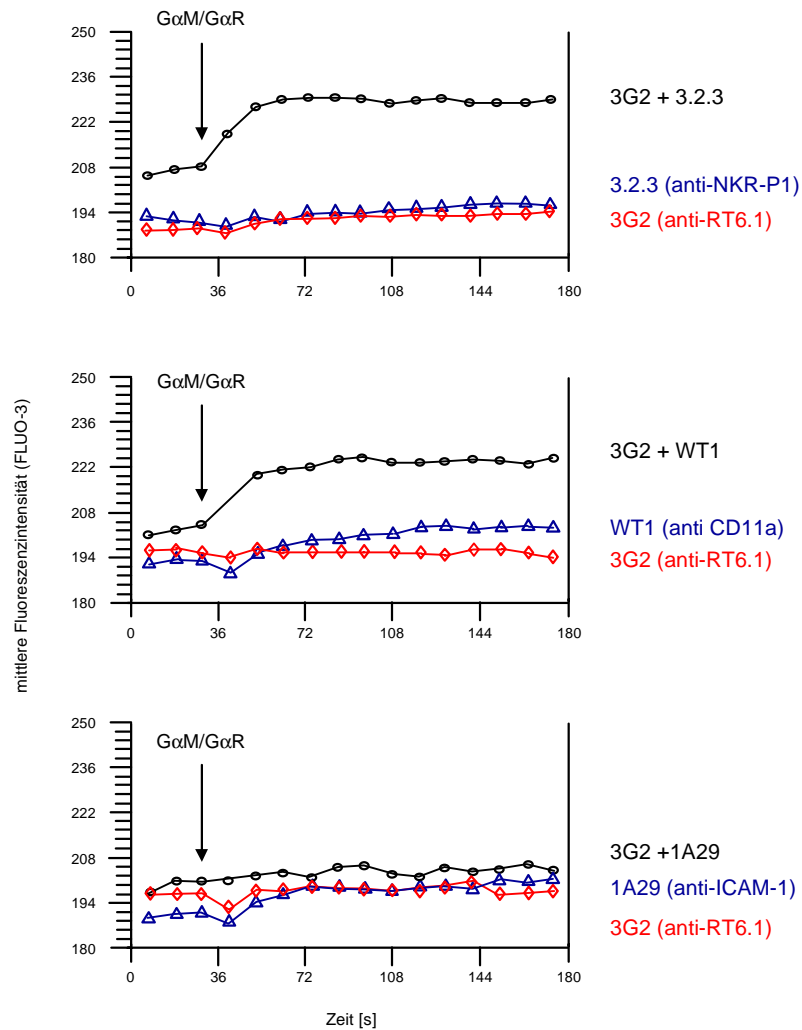
Im Abschnitt 4.2 konnte gezeigt werden, daß die Kreuzvernetzung von RT6.1 bei der NK-Linie 3651 und Milz-NK-Zellen zu der Modulation der Zytokin-Expression und der verstärkten Expression des hoch affinen IL-2R-Komplexes führte. Begleitend hatte die Interaktion von RT6 mit anti-RT6.1-mAK eine reduzierte RT6-Oberflächenexpression der betrachteten Zellen zur Folge (Abschnitt 4.3). Die Mechanismen, über die ein GPI-verankertes Molekül wie RT6 transmembranöse Signale vermitteln könnte, sind weitgehend unbekannt. Für unterschiedliche GPI-verankerte Moleküle konnte jedoch gezeigt werden, daß ihre Kreuzvernetzung zu einer transienten Erhöhung der zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und der Tyrosinphosphorylierung zellulärer Substrate führt. Der Signalübermittlung unterschiedlicher GPI-verankerter Moleküle könnte somit ein gemeinsamer Mechanismus zugrunde liegen. Es stellte sich daher die Frage, ob die Kreuzvernetzung von RT6 entsprechende Signale induzieren kann.

### 4.4.1 Erhöhung der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die RT6.1-vermittelte Signaltransduktion die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) mit einbezieht. In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob in Folge der RT6-Kreuzvernetzung ein transienter Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu beobachten ist.

Die Analyse der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erfolgte am FACScan. Zellen der Linie 3651 wurden mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Fluoreszenzfarbstoff FLUO-3-AM beladen. Im Anschluß wurde ein Teil der Zellen jeweils mit anti-RT6.1-mAK (3G2), anti-NKR-P1-mAK (3.2.3), anti-CD11a-mAK (WT1) und anti-ICAM-1-mAK (1A29) allein, oder mit Kombinationen dieser Antikörper inkubiert. Um begleitend die Auswirkungen der Bindung der Antikörper ohne anschließende Kreuzvernetzung analysieren zu können, wurde ein weiteres Aliquot der Zellen nach Inkubation mit FLUO-3-AM unbehandelt belassen. Nach Erfassung der Basisfluoreszenz am FACScan wurden zu den mit Primärantikörper beladenen Zellen die kreuzvernetzenden Sekundärantikörper ( $\text{G}\alpha\text{R}$  bzw.  $\text{G}\alpha\text{M}$ ) und zu den nicht mit Antikörper vorbehandelten Zellen die jeweiligen Primärantikörper zugesetzt und die Änderungen der mittleren Fluoreszenzintensitäten zeitabhängig aufgenommen. Die Ergebnisse sind in **Abb. 4.4.1** dargestellt.

Der Zusatz der gegen RT6.1, NKR-P1, CD11a und ICAM-1 gerichteten Antikörper hatte ohne anschließende Kreuzvernetzung keinen meßbaren Einfluß auf die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der Zellen (Daten nicht gezeigt). Die Kreuzvernetzung von gebundenem anti-NKR-P1, anti-CD11a- und anti-ICAM-1-mAK durch  $\text{G}\alpha\text{M}$  führte jeweils nur zu einer geringfügigen Erhöhung der zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. In Folge der Kreuzvernetzung von anti-RT6.1-mAK durch  $\text{G}\alpha\text{R}$  konnte keine signifikante Änderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beobachtet werden. Wurden jedoch RT6.1 und NKR-P1 bzw. RT6.1 und CD11a gleichzeitig kreuzvernetzt, so resultierte eine deutlich meßbares  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal. Dieser Effekt konnte bei gleichzeitiger Kreuzvernetzung von RT6.1 und ICAM-1 nicht beobachtet werden.



**Abb. 4.4.1: Durchflußzytometrische Analyse der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Kreuzvernetzung von RT6.1, NKR-P1, CD11a und ICAM-1 auf der NK-Linie 3651**

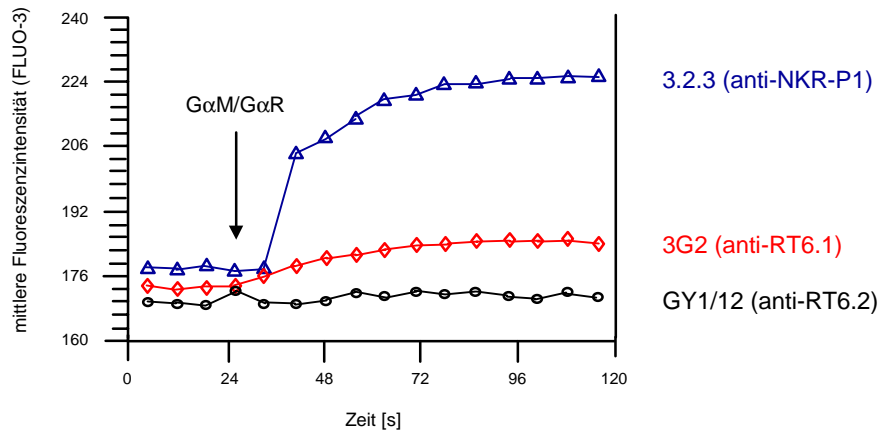
NK-Zellen der Linie 3651 wurden mit FLUO-3-AM beladen und im Anschluß jeweils mit anti-RT6.1-mAK (3G2), anti-NKR-P1-mAK (3.2.3), anti-CD11a-mAK (WT1) und anti-ICAM-1-mAK (1A29) allein oder mit den angegebenen Kombinationen dieser mAK inkubiert. Nach Erfassung der Basisfluoreszenz wurden zu den mit Primärantikörper beladenen Zellen die kreuzvernetzenden Sekundärantikörper (GαR bzw. GαM) zugesetzt und die Änderungen der mittleren Fluoreszenzintensitäten als Funktion der Zeit aufgenommen.

NK-Zellen wurden aus LEW-Ratten-Milzen isoliert. Die Abtrennung der B-Zellen erfolgte über Nylonwatte. Eine weitere Anreicherung der NK-Zellen wurde nach Beladung der T-Zellen mit einem beads-gekoppeltem anti-TCR $\alpha/\beta$ -mAK (R73) mittels MACS-Separation erreicht. Die Zellen wurden im Anschluß an die Separation 4 Tage in Gegenwart von IL-2 kultiviert. Die untersuchten Zellen setzten sich aus 55% NK-Zellen, 5% B-Zellen und 40% T-Zellen zusammen. 61% der NK-Zellen waren RT6.1-positiv. Innerhalb der T-Zell-Population exprimierten 84% RT6.1. Die Analyse der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration erfolgte durchflußzytometrisch. Die Zellen wurden mit FLUO-3-AM beladen. Im Anschluß wurde ein Teil der Zellen jeweils mit anti-RT6.1-mAK (3G2), anti-NKR-P1-mAK (3.2.3) oder anti-RT6.2-mAK (GY1/12) inkubiert. Um die Auswirkungen der Bindung der Antikörper ohne anschließende Kreuzvernetzung analysieren zu können, wurde ein Teil der Zellen nach Inkubation mit FLUO-3-AM unbehandelt belassen. Nach Aufnahme der Basisfluoreszenz wurden zu den mit Primärantikörper beladenen Zellen die kreuzvernetzenden Sekundärantikörper (G $\alpha$ R bzw. G $\alpha$ M) und zu den nicht mit Antikörper vorbehandelten Zellen die jeweiligen Primärantikörper zugesetzt und die Änderungen der mittleren Fluoreszenzintensitäten zeitabhängig aufgenommen. Die Ergebnisse sind in **Abb. 4.4.2** dargestellt.

Der gegen NKR-P1 gerichtete Antikörper konnte ohne Kreuzvernetzung durch G $\alpha$ M keine Änderung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration induzieren (Daten nicht gezeigt). Die Kreuzvernetzung dieses Antikörpers hatte hingegen eine deutlich meßbare Mobilisierung von intrazellulären Kalziumionen zur Folge. Auch der gegen RT6.1 gerichtete Antikörper induzierte erst nach Kreuzvernetzung durch G $\alpha$ R einen Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität. Die durch den anti-RT6.1-Antikörper hervorgerufene Änderung der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration war jedoch wesentlich geringer als die durch den anti-NKR-P1-mAK bedingte Variation der Fluoreszenzintensität. Der als Kontrolle mitgeführte, gegen RT6.2 gerichtete Antikörper hatte auch nach Kreuzvernetzung keinen Einfluß auf die Fluoreszenzintensität, so daß eine Beteiligung Fc-Rezeptor-vermittelter Effekte ausgeschlossen werden konnte.

Wie bereits erwähnt, setzten sich die untersuchten Zellen aus NK-Zellen, T-Zellen und B-Zellen zusammen. Eine Abgrenzung der NK- und T-Zell-Population anhand ihrer NKR-P1- bzw. TCR-Expression vor der Analyse der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration war nicht möglich, da die für eine durchflußzytometrische Untersuchung nötige Anfärbung der Zellen über Antikörper die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration beeinflusst hätte. Da Subpopulationen von NK- und T-Zellen RT6.1 exprimieren, konnte daher in dieser experimentellen Anordnung nicht geklärt

werden, auf welche Zellpopulation die beobachteten Effekte zurückgehen. Die vorliegenden Befunde lassen jedoch den Rückschluß zu, daß die Kreuzvernetzung von RT6.1 Signaltransduktionsereignisse zur Folge hatte, die in einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration resultierten.



**Abb. 4.4.2: Durchflußzytometrische Analyse der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Kreuzvernetzung von RT6.1 und NKR-P1 auf frisch aus Milz isolierten NK- und T-Zellen**

Die Zellen wurden aus LEW-Ratten-Milzen isoliert und 4 Tage in Gegenwart von IL-2 kultiviert. Zur durchflußzytometrischen Analyse der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurden die Zellen mit FLUO-3-AM beladen und im Anschluß jeweils mit anti-RT6.1-mAK (3G2), anti-NKR-P1-mAK (3.2.3) oder anti-RT6.2-mAK (GY1/12) inkubiert. Nach Aufnahme der Basisfluoreszenz wurden zu den mit Primärantikörper beladenen Zellen die kreuzvernetzenden Sekundärantikörper (G $\alpha$ R bzw. G $\alpha$ M) zugesetzt und die Änderungen der mittleren Fluoreszenzintensitäten zeitabhängig aufgenommen.

#### 4.4.2 Induktion von Tyrosinphosphorylierungen

Um zu klären, ob Proteintyrosinkinassen (PTK) oder Phosphatasen an der RT6-vermittelten Signaltransduktion beteiligt sind, wurde das nach Kreuzvernetzung von RT6 auftretende Tyrosinphosphorylierungsmuster untersucht.

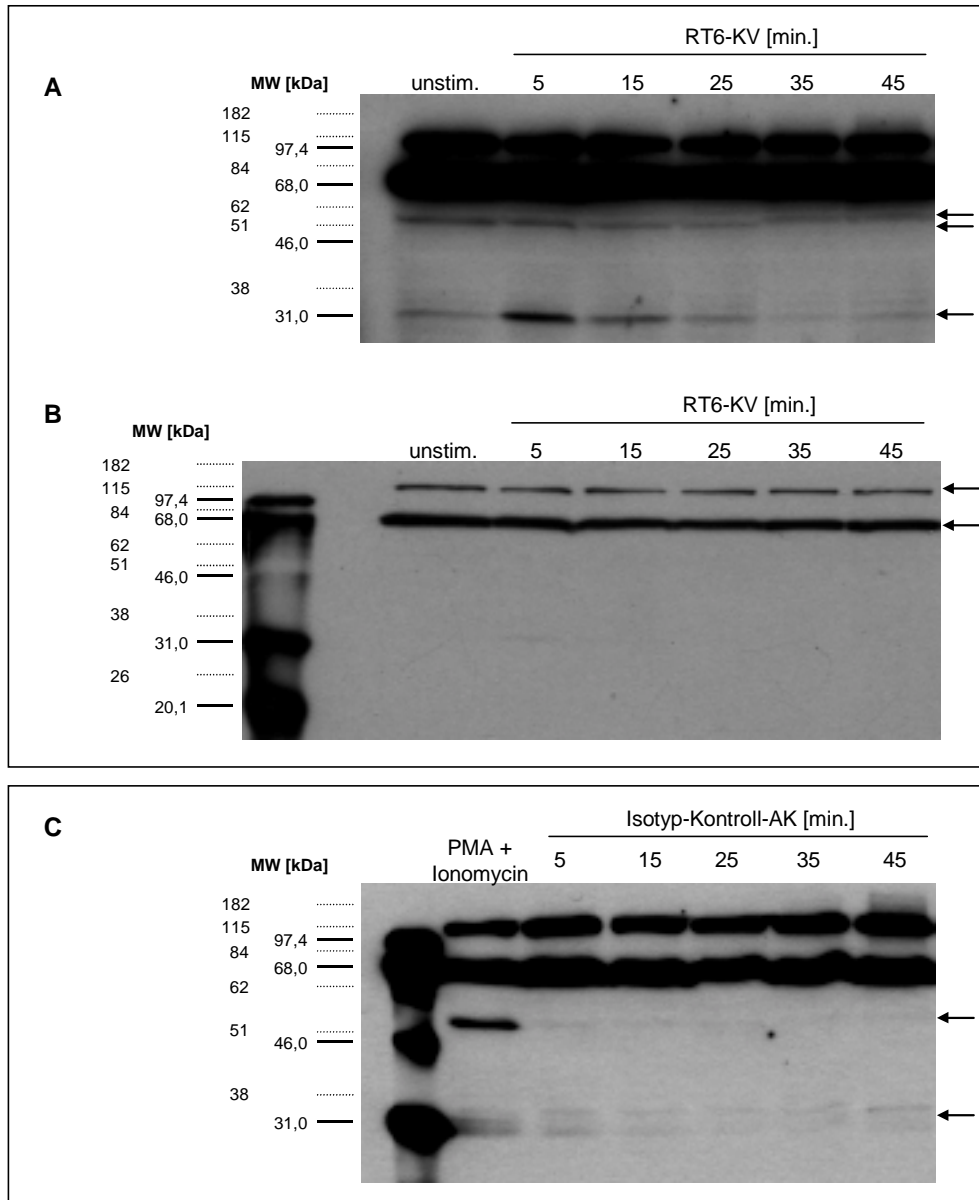
Zellen der Linie 3651 wurden 5, 10, 15, 25, 35 und 45 min in Gegenwart von immobilisiertem anti-RT6.1-mAK (3G2) kultiviert. Negativ- und Isotyp-Kontrollansätze wurden mitgeführt. Begleitend wurden Zellen durch Zusatz von PMA (200 ng/ml) und Ionomycin (100 ng/ml) stimuliert. Der Nachweis tyrosinphosphorylierter Proteine erfolgte mittels Western-Blot (anti-Phosphotyrosin-mAK: 4G10).

In Folge der RT6.1-Kreuzvernetzung konnte eine transiente Zunahme der Intensität einer Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 33 kDa beobachtet werden (**Abb. 4.4.3, A**). Die maximale Intensität dieser Bande trat nach 5-minütiger RT6-Kreuzvernetzung auf. Auf die Intensität einer ~55 kDa-Bande, bei der es sich unter anderem um die PTK p56<sup>lck</sup> oder die PTK p60<sup>fyn</sup> handeln könnte, hatte die Stimulation keinen sichtbaren Effekt. Nach 35-minütiger Stimulation konnte jedoch bei dieser Bande eine leichte Verschiebung des apparenten Molekulargewichtes zu einer schwereren Form von etwa 60 kDa beobachtet werden, bei der es sich z.B. um die p60-Isoform der p56<sup>lck</sup> handeln könnte. Stimulationsereignisse, die in einer Aktivierung der p56<sup>lck</sup> resultieren, führen zu einer Modifikation dieser PTK, welche mit einer zeitlich verzögerten Verschiebung des apparenten Molekulargewichtes zu 60 kDa einher geht (Veillette et al., 1988). Die Intensitäten zweier im Bereich von etwa 68 kDa bzw. 100 kDa auftretenden Banden wurden in Folge der RT6.1-Kreuzvernetzung nicht moduliert (**Abb. 4.4.3, B**). Eine Induktion von *de novo* tyrosinphosphorylierten Proteinen konnte nicht beobachtet werden.

Der Isotyp-Kontrollantikörper hatte keinen Effekt auf die Bandenintensitäten, ein Einfluß von Fc-Rezeptor-vermittelten Signaltransduktions-Ereignissen durch Bindung freier oder immobilisierter Antikörper konnte somit ausgeschlossen werden (**Abb. 4.4.3, B**).

Die Simulation der Zellen mit PMA (Aktivator der PKC) und dem Kalziumionophor Ionomycin für 15 min hatte eine Verstärkung der Intensität der ≈ 60 kDa-Bande zur Folge. Ob gleichzeitig eine Verschiebung des Molekulargewichtes stattfand, konnte nicht eindeutig geklärt werden (**Abb. 4.4.3, B**). Auf die Intensität der bei etwa 33 kDa gelegenen Bande hatte die Inkubation der Zellen mit PMA und Ionomycin keinen signifikanten Einfluß.

Diese Befunde deuten darauf hin, daß durch RT6.1 eine Signalkaskade ausgelöst wird, welche die Aktivierung von PTK einschließt.



**Abb. 4.4.3: Tyrosinphosphorylierungsmuster nach RT6.1-Kreuzvernetzung auf der NK-Linie 3651**

Die Linie 3651 wurde 5, 15, 25, 35 und 45 min. in Gegenwart von immobilisiertem anti-RT6.1-mAK (3G2) kultiviert. Negativ- und Isotyp-Kontrollen wurden mitgeführt. Begleitend wurden Zellen 15 min mit PMA (200 ng/ml) und Ionomycin (100 ng/ml) kultiviert. Die Lysate von jeweils  $2 \times 10^6$  Zellen wurden unter reduzierenden Bedingungen in einem 12%igem SDS-PAA-Gel aufgetrennt und die Proteine auf Nitrozellulose transferiert. Nach Immunfärbung der tyrosinphosphorylierten Proteine (4G10-bio + Streptavidin-Peroxidase-Konjugat) wurden die Protein-Antikörper-Komplexe mittels ECL-Reaktion durch Autoradiographie nachgewiesen. Um alle auftretenden Banden optimal darzustellen, wurde die Expositionsdauer variiert. Zur genaueren Eingrenzung der Molekulargewichte wurden die Lysate unter Verwendung eines zweiten Protein-Markers parallel in einem weiteren Gel unter identischen Bedingungen aufgetrennt und über anti-Phosphotyrosin-mAK (4G10 + G $\alpha$ M-AP + NBT/BCIP) detektiert. Die Positionen der Standardproteine sind aufgeführt. (-----): BenchMark, GibcoBRL; (·····): ECL-Protein-Marker, amersham pharmacia biotech

A: Expositionsdauer: 1 min.; B: Expositionsdauer: 10 sec; C: Expositionsdauer: 1 min



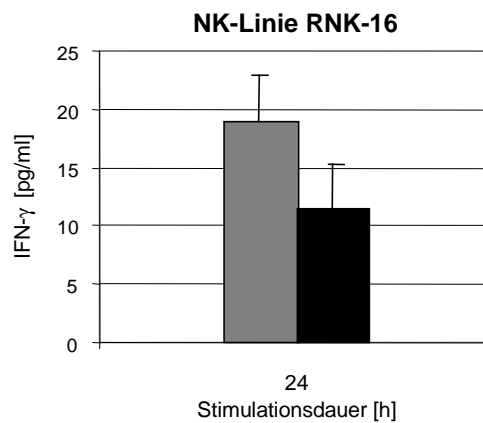
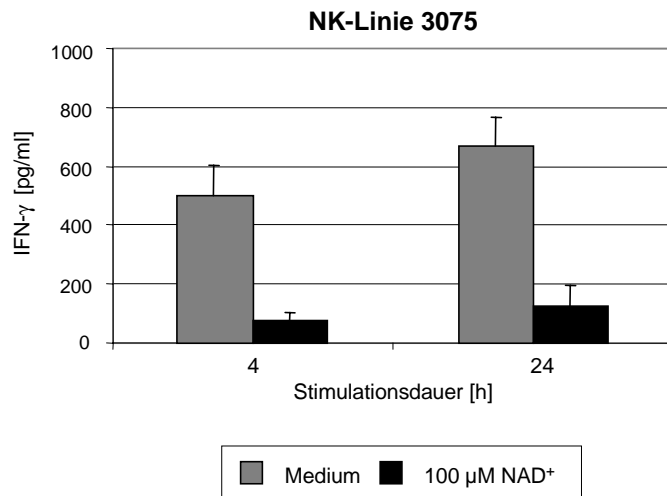
## 4.5 Effekte von $\text{NAD}^+$ auf NK-Zell-Funktionen

In einer weiteren Gruppe von Experimenten wurde der Frage nachgegangen, ob durch die enzymatische Aktivität von RT6 NK-Zell-Funktionen moduliert werden. In diesem Zusammenhang wurden die Effekte von exogenem  $\text{NAD}^+$  ( $\text{eNAD}^+$ ), dem Substrat von RT6, auf die  $\text{IFN-}\gamma$ -Freisetzung, das proliferative Verhalten und den Oberflächenphänotyp der NK-Linien 3075 und RNK-16 analysiert. Wie in Abschnitt 4.1 erwähnt, ist die NK-Linie 3075 im Hinblick auf NK-Effektor-Funktionen, Oberflächenphänotyp und RT6-Expression mit der NK-Linie 3651 gleichzusetzen.

Die NK-Linie 3075 wurde 4 bzw. 24 h in Gegenwart von  $\text{NAD}^+$  ( $100\mu\text{M}$ ) und ohne Zusatz von  $\text{NAD}^+$  kultiviert. Da die Zellen der NK-Linie RNK-16 nur sehr geringe  $\text{IFN-}\gamma$ -Mengen freisetzen (siehe Abschnitt 4.1.4) sollte versucht werden, die Bildung von  $\text{IFN-}\gamma$  durch 3-tägige Kultivierung mit IL-2 zu steigern. Im Anschluß wurde die Linie für weitere 24 h mit IL-2 bei gleichzeitigem Zusatz von  $\text{NAD}^+$  bzw. ohne  $\text{NAD}^+$  kultiviert. Die Bestimmung der  $\text{IFN-}\gamma$ -Konzentrationen in den zellfreien Kulturüberständen erfolgte mittels ELISA. Die Ergebnisse sind in **Abb.** und **Tab. 4.5.1** dargestellt.

Die Inkubation der NK-Linie 3075 mit  $\text{NAD}^+$  hatte eine drastisch verringerte Freisetzung von  $\text{IFN-}\gamma$  zur Folge; die  $\text{IFN-}\gamma$ -Konzentration in den Überständen der mit  $\text{NAD}^+$  behandelten Zellen war im Vergleich zu den ohne  $\text{NAD}^+$  kultivierten Zellen um den Faktor 6,5 (4 h) bzw. 5 (24 h) reduziert. Die insgesamt 4-tägige Kultivierung der Linie RNK-16 mit IL-2 konnte eine meßbare Freisetzung von  $\text{IFN-}\gamma$  induzieren; die  $\text{IFN-}\gamma$ -Konzentrationen waren jedoch im Vergleich zu den in den Überständen der Linie 3075 ermittelten Werten sehr gering. Der gleichzeitige Zusatz von  $\text{NAD}^+$  hatte auch bei dieser Linie eine reduzierte Freisetzung von  $\text{IFN-}\gamma$  zur Folge, der Effekt war jedoch wesentlich schwächer als der bei der Linie 3651 beobachtete (24 h: Faktor 1,6).  $\text{NAD}^+$  (100; 10;  $1\mu\text{M}$ ) hatte keinen Effekt auf die proliferative Aktivität der NK-Linien (Daten nicht gezeigt). Ein zytotoxischer Effekt von  $\text{NAD}^+$  konnte durch Färbung der Zellen mit Trypanblau und durch durchflußzytometrische Analyse ihrer Streulicht-Eigenschaften ausgeschlossen werden. Die nach Zusatz von  $\text{NAD}^+$  beobachtete reduzierte  $\text{IFN-}\gamma$ -Freisetzung kann somit nicht auf eine verringerte Proliferation bzw. ein Absterben der Zellen zurückgehen. Auf die  $\text{IFN-}\gamma$ -mRNA-Expression der NK-Linien hatte  $\text{NAD}^+$  keine eindeutigen Effekte. Zudem konnte  $\text{NAD}^+$  (100; 10;  $1\mu\text{M}$ ; Inkubationszeit: 1; 3; 24; 48 h) weder eine Modulation der Expression von RT6, noch verschiedener

Adhäsionsmoleküle (CD11a, CD18, ICAM-1, CD28, CD44, CD2, CD43), des IL-2-Rezeptor-Komplexes oder des NKR-P1-Moleküls induzieren (Daten nicht gezeigt).



	IFN- $\gamma$ -Freisetzung		
	3651		RNK-16
	4 h	24 h	24 h
ohne NAD <sup>+</sup>	498,3 $\pm$ 106,4	666,7 $\pm$ 97,0	18,9 $\pm$ 4,1
mit NAD <sup>+</sup>	77,0 $\pm$ 24,3	126,3 $\pm$ 71,8	11,5 $\pm$ 3,7

**Abb. und Tab. 4.5.1: Reduktion der IFN- $\gamma$ -Freisetzung der NK-Linien 3075 und RNK-16 durch eNAD<sup>+</sup>**

Die Linie 3075 wurde für 4 und 24 h mit NAD<sup>+</sup> (100  $\mu$ M) bzw. ohne Zusatz von NAD<sup>+</sup> kultiviert. Die Linie RNK-16 wurde 3 d mit IL-2 vorstimuliert und dann weitere 24 h mit IL-2 und mit bzw. ohne NAD<sup>+</sup> (100  $\mu$ M) kultiviert. Im Anschluß wurde die IFN- $\gamma$ -Konzentration in den zellfreien Kulturüberständen mittels ELISA bestimmt. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf eine initiale Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml Kulturmedium. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SAW.

## 5 Diskussion

Die Untersuchungen dieser Arbeit bauten auf der Entdeckung auf, daß NK-Zellen der Ratte das Ektoenzym RT6 exprimieren, das zuvor nur als T-Zell-Differenzierungsmarker bekannt war (Wonigeit et al., 1997). Von besonderem Interesse war, daß die Expression von RT6 auf aktivierte NK-Zellen beschränkt zu sein scheint. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit der Frage nachgegangen, ob und über welche Mechanismen RT6 an der Ausübung bzw. Regulation der Effektor-Funktionen von NK-Zellen beteiligt ist.

Einen Schwerpunkt bildete in diesem Zusammenhang die Frage, ob RT6 Rezeptorfunktionen besitzt und in der Lage ist, Signale an das Zellinnere weiterzuleiten, die NK-Funktionen modulieren. Für die Untersuchungen wurde ein *in vitro* Modellsystem benutzt, in dem RT6, exprimiert auf NK-Zelllinien bzw. frisch aus der Milz isolierten NK-Zellen, anhand immobilisierter anti-RT6-mAK (anti-RT6.1: mAK 3G2; anti-RT6.2: mAK GY1/12) kreuzvernetzt wurde. Einen weiteren Teil der Arbeit bildeten Untersuchungen zu der Bedeutung der enzymatischen Aktivität von RT6 für die Funktion von NK-Zellen. RT6 besitzt als Mitglied der Enzymfamilie der mADP-Ribosyltransferasen Auto-Ribosyltransferase- und NAD-Glykohydrolase-Aktivitäten. Die ADP-Ribosylierung von Proteinen ist eine posttranslationale Modifikation, über die zentrale zelluläre Funktionen moduliert werden können. Vor diesem Hintergrund wurde untersucht, welche Effekte der Zusatz von NAD<sup>+</sup>, dem Substrat von RT6, *in vitro* auf NK-Effektor-Funktionen hat.

### 5.1 Vergleichende Charakterisierung der NK-Linien

Die Etablierung von NK-Linien der Ratte ist schwierig; dementsprechend wurden bislang nur zwei NK-Klone beschrieben (Brisette-Storkus et al., 1995), über deren RT6-Expression jedoch bisher nichts bekannt ist. Für die Bearbeitung der oben ausgeführten Fragestellungen wurden zwei in der Arbeitsgruppe generierte NK-Linien (3651 und 3075), die NK-Leukämie-Linie RNK-16 (Axberg et al., 1988) und frisch isolierte Milz-NK-Zellen verwendet. Die Grundlage für die Untersuchungen bildete die vergleichende Charakterisierung der Linien 3651 und 3075 im Hinblick auf Oberflächenphänotyp, Zytokin- und RT6-Expression.

Die durchflußzytometrische Analyse der RT6-Expression zeigte, daß nahezu alle Zellen der Linien 3075 und 3651 RT6.1 konstitutiv in hoher Dichte auf der Zellmembran tragen (Tab. 4.1.3, Abb. 4.1.4). Die NK-Linien 3651 und 3075 wurden aus Milz-NK-Zellen von

homozygoten LEW-Ratten (*RT6<sup>a</sup>*) etabliert; dementsprechend konnte eine Expression von RT6.2 nicht nachgewiesen werden.

Die Untersuchung von Zytopräparaten der Linie 3651 im Hinblick auf ihre RT6.1-Expression zeigte in Analogie zu den durchflußzytometrischen Befunden eine starke Anfärbung der Zellmembran nahezu aller Zellen. Zusätzlich konnte RT6.1 auch im Zytoplasma der Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.1.5). Dies könnte darauf hindeuten, daß ein Pool von RT6-Molekülen in submembranen Vesikeln für den Einbau in die Zellmembran bereitgehalten wird, die nach endo- oder exogenen Signalen mit der Membran fusionieren. Ein derartiger Mechanismus wurde z.B. in Neutrophilen für die GPI-verankerten Moleküle alkalische Phosphatase, CD16 und DAF beobachtet (Cain et al., 1993 und 1995). Das RT6-Gen besteht aus 8 Exons, wobei Exon 7 das vollständige, native Protein kodiert (Haag et al., 1996). Die proximalen Exons 1 bis 6 treten in verschiedenen alternativen Spleiß-Varianten auf; Exon 5 kodiert die N-terminale Signalsequenz. Obwohl das Haupttranskript in Milzzellen aus den Exons 2,5,7 und 8 zusammengesetzt ist (Haag et al., 1997), existieren auch Spleiß-Varianten, die Exon 5 nicht enthalten und Polypeptide kodieren, die aufgrund der veränderten N-Termini keine klassischen Signalpeptid-Sequenzen enthalten. Die im Zytoplasma der NK-Zellen detektierten Moleküle könnten somit auch intrazelluläre Isoformen von RT6 darstellen.

Die vergleichende Analyse frisch aus LEW-Ratten-Milzen isolierter NK-Zellen ergab, daß hier, im Unterschied zu den NK-Linien, nur durchschnittlich 50% der Zellen RT6.1-positiv waren. Diese NK-Population exprimierte RT6.1 zudem in wesentlich niedrigerer Dichte als die beiden NK-Linien (Tab. 4.1.3, Abb. 4.1.4). Dieser Befund zeigt, daß die Langzeit-Kultivierung der Milz-NK-Zellen im Rahmen der Etablierung der NK-Linien eine deutliche Zunahme der RT6-positiven Zellen zur Folge hatte. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt wäre eine durch die Kultivierung hervorgerufene *de novo* Expression von RT6.1 auf zuvor RT6-negativen NK-Zellen. Auslöser dieser Expression könnte das dem Kulturmedium zugesetzte IL-2 sein, das ein potenter Aktivator von NK-Zellen ist (Kuribayashi et al., 1981) und eine wichtige Voraussetzung für das Überleben und die Proliferation von NK-Zellen *in vitro* darstellt. Diese Überlegungen werden durch die Beobachtung gestützt, daß eine 24-stündige *in vitro* Inkubation frisch isolierter LEW-Milz-NK-Zellen mit hohen IL-2-Konzentrationen eine Vergrößerung der RT6.1-positiven Population zur Folge hatte, die mit einer erhöhten RT6-Expressionsdichte einher ging (Tab. 4.3.1 und Wonigeit et al., 1997). Eine weitere denkbare Ursache für die charakteristische RT6-Expression der beiden NK-Linien ist ein präferentielles Absterben der RT6-negativen Milz-NK-Subpopulation *in vitro*, das von der Proliferation und Expansion der RT6-positiven Subpopulation begleitet wurde.

Die Tatsache, daß die bei Milz-NK-Zellen beobachtete Zunahme der RT6-positiven Zellen bereits in einem Zeitrahmen von 24 h beobachtet werden konnte, macht diese Erklärung jedoch unwahrscheinlich.

Die Inkubation der Milz-NK-Zellen mit IL-2 führte neben der verstärkten RT6.1-Expression begleitend zu einer Vergrößerung der CD25-positiven NK-Population (Abb. 4.2.3 und Tab. 4.2.2). Ruhende NK-Zellen exprimieren konstitutiv intermediär affine IL-2-Rezeptoren bestehend aus den Untereinheiten IL-2R $\beta$  (CD122) und IL-2R $\gamma$  (CD132) (Phillips et al., 1989). Die Induktion der Expression der IL-2R $\alpha$ -Untereinheit (CD25), die zur Ausbildung des hoch affinen IL-2-Rezeptor-Komplexes (IL-2R $\alpha\beta\gamma$ ) auf der Zelloberfläche führt, dient auch bei NK-Zellen als zuverlässiger Marker für zelluläre Aktivierung (Siegel et al., 1987).

Daraus kann abgeleitet werden, daß die Stimulation der frisch isolierten NK-Zellen mit IL-2 zu einer Aktivierung der Zellen führte. Aus der parallelen Induktion der RT6-Oberflächenexpression kann rückgeschlossen werden, daß die Expression dieses Moleküls auf NK-Zellen in Abhängigkeit von ihrem Aktivierungszustand reguliert wird und ein Stadium aktivierter NK-Zellen kennzeichnet.

Ein interessanter Aspekt in diesem Zusammenhang ist, daß IL-2 auch die *de novo* Expression eines als gp42 bezeichneten, GPI-verankerten Moleküls unbekannter Funktion induziert, das nach Kreuzvernetzung aktivierende Signale vermittelt (Seaman et al., 1991). Auch für andere auf NK-Zellen exprimierte Oberflächenmoleküle (z.B. CD69, CD27, ANK44, ANK66, ANK7, ANK123, verschiedene Adhäsionsmoleküle) konnte eine durch IL-2 hervorgerufene bzw. verstärkte Expression gezeigt werden; einige dieser Proteine scheinen zudem über noch nicht geklärte Mechanismen an der Regulation der zytolytischen Aktivität der NK-Zellen beteiligt zu sein (Lanier et al., 1988; Moretta et al., 1991; Giezeman-Smits et al., 1998). Die bei IL-2-aktivierten NK-Zellen beobachtete effizientere Lyse von Zielzellen könnte somit unter anderem auf eine verstärkte Expression bestimmter Oberflächenmoleküle, darunter auch RT6, zurückzugehen. Eine mögliche Funktion dieser auf der NK-Zelle exprimierten Moleküle könnte in der Erkennung und Bindung auf der Zielzelle exprimierter Liganden bestehen. Auf diesem Weg würden die Moleküle zu der Aufrechterhaltung des Kontaktes zwischen Effektor- und Zielzelle beitragen und zudem in Folge der Interaktion mit ihren Liganden Signale an die NK-Zelle vermitteln, die ihre Effektor-Funktionen regulieren. Die Beobachtung, daß die IL-2-vermittelte Aktivierung der NK-Zellen von einer verstärkten RT6-Expression begleitet wird, deutet darauf hin, daß RT6, über seine enzymatische Aktivität oder als Rezeptor fungierend, an der Ausübung ihrer Effektor-Funktionen beteiligt ist.

Die vorliegenden Ergebnisse implizieren, daß die RT6.1 in hoher Dichte exprimierenden NK-Linien 3651 und 3075 ein aktiviertes NK-Zell-Stadium repräsentieren. Die Beobachtung, daß der prozentuale Anteil der den hoch affinen IL-2R exprimierenden Zellen bei den Linien 3651 und 3075 je nach Kultivierungsdauer bis zu 90% betrug und damit deutlich höher als bei frisch isolierten Milz-NK-Zellen (ca. 20%) war, stützt diese Annahme (Abb. 4.1.1 und Tab. 4.1.2).

Ein weiterer Punkt, der für den aktivierten Status dieser NK-Linien spricht, ist ihr an Plastik adhärentes Wachstum, das ein Charakteristikum einer als A-LAK-Zellen bezeichneten Subpopulation der IL-2-aktivierten NK (LAK)-Zellen darstellt (Vujanovic et al., 1988). Der Prozeß der IL-2 induzierten Adhäsion geht auf die verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen zurück (Vujanovic et al., 1993). *In vitro* generierte, IL-2-aktivierte NK-Zellen sind eine ausgesprochen heterogene Population von Effektor-Zellen in verschiedenen Aktivierungsstadien (Ortaldo et al., 1986). Die hier charakterisierten NK-Linien 3651 und 3075 bieten jedoch die Möglichkeit, eine homogene Subpopulation der A-LAK-Zellen im Hinblick auf ihre Effektor-Funktionen *in vitro* vergleichend zu untersuchen.

Die durchflußzytometrische Analyse der aus homozygoten Ratten des F344-Stammes (*RT6<sup>b</sup>*) etablierten NK-Linie RNK-16 (Axberg et al., 1988) zeigte die erwartete Expression von RT6.2. In Analogie zu den Linien 3651 und 3075 exprimieren nahezu alle Zellen der Linie RNK-16 RT6 in hoher Dichte auf ihrer Oberfläche (Tab. 4.1.3, Abb. 4.1.4).

Die RT6-Immunpräzipitation lieferte für RT6.1 insgesamt vier Banden: zwei Banden mit einem apparenten Molekulargewicht von ~24-26 kDa und zwei Banden mit einem Molekulargewicht von ~30-35 kDa. Nach Immunpräzipitation von RT6.2 aus Lysaten der Linie RNK-16 traten hingegen nur 2 Banden (~24-26 kDa) auf (Abb. 4.1.3). Diese Befunde korrelieren mit der in Ratten-Lymphknotenzellen gefundenen RT6-Expression (Koch et al., 1988): RT6.2 wurde in Lymphozyten-Lysaten von DA-Ratten (*RT6<sup>b</sup>*) als nicht glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von 24-26 kDa präzipitiert, während RT6.1 in LEW (*RT6<sup>a</sup>*) Lymphozyten als 24-26 kDa-Protein und zusätzlich in ~27-34 kDa großen, glykosylierten Varianten nachgewiesen wurde. Vor diesem Hintergrund kann aus den Befunden abgeleitet werden, daß RT6.1 in der NK-Linie 3651 in unglykosylierten und verschiedenen glykosylierten Varianten exprimiert wird, während RT6.2 in der Linie RNK-16 nur in unglykosylierter Form existiert. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte nur in *RT6<sup>a</sup>*-, nicht aber in der *RT6<sup>b</sup>*-cDNA-Sequenzen eine einzelne, potentielle

Glykosylierungsstelle identifiziert werden (Koch et al., 1990a; Haag et al., 1990b). Eine derartige Stelle kann in verschiedenen Zelltypen und von klonierten Linien sehr unterschiedlich glykosyliert werden (Parekh et al., 1987). Das bei RT6.1 beobachtete komplexe Bandenmuster ist vor diesem Hintergrund plausibel. Die in zwei Banden auftretenden, unglykosylierten Formen von RT6.1 bzw. RT6.2 (~24 bzw. 26 kDa, Abb. 4.1.3 und Koch et al., 1988; Crisa et al., 1990) könnten unter anderem auf eine posttranslationale Modifikation der Moleküle, wie z.B. eine ADP-Ribosylierung, hindeuten.

Die NK-Tumor-Linie RNK-16 proliferiert unabhängig von IL-2 (Axberg et al., 1988). Die starke RT6-Oberflächenexpression dieser Linie deutet somit darauf hin, daß die Induktion der RT6-Expression nicht an die IL-2-vermittelte Aktivierung von NK-Zellen gebunden ist, sondern daß auch andere Signale, oder die maligne Entartung zu der Expression von RT6 führen können. Alle Zellen der Linie RNK-16 tragen den intermediär affinen IL-2R auf ihrer Oberfläche (Abb. 4.1.1, Tab 4.1.2); die Expression der IL-2-R $\alpha$ -Kette konnte weder auf mRNA- (Abb. 4.1.2), noch Proteinebene (Abb. 4.1.1) nachgewiesen werden. Die Inkubation der Zellen mit IL-2 konnte die Expression des hoch affinen IL-2Rs nicht induzieren (Abb. 4.2.2) und hatte zudem keinen Einfluß auf die proliferative Aktivität dieser Linie (Daten nicht gezeigt). Die Linie RNK-16 wurde aus LGLs („large granular lymphocytes“) von F344-Ratten etabliert, für die eine Entwicklung spontaner Leukämien typisch ist (Axberg et al., 1988). Somit reflektieren die charakteristischen, von IL-2 und der Expression seines hoch affinen Rezeptors unabhängigen Wachstumseigenschaften der Linie vermutlich ihre Tumoreigenschaften. Die Beobachtung, daß die Expression von RT6 bei den Zellen dieser Linie nicht mit der Expression des hoch affinen IL-2R einher geht, könnte auch darauf hindeuten, daß die Induktion der RT6-Expression im Rahmen der NK-Zell-Aktivierung bzw. Differenzierung ein früheres Ereignis als die Expression des hoch affinen IL-2R-Komplexes darstellt.

Für beide NK-Linien konnte die Expression von IFN- $\gamma$  auf Ebene der Gentranskription nachgewiesen werden (Abb. 4.1.8, I). Die vergleichende Untersuchung der IFN- $\gamma$ -Expressionslevel anhand kompetitiver RT-PCR zeigte jedoch signifikante Unterschiede zwischen den NK-Linien auf; so transkribiert die Linie 3651 das IFN- $\gamma$ -Gen in stärkerem Ausmaß (Faktor 5) als die Linie RNK-16 (Abb. 4.1.8, II). Mit diesem Ergebnis korrelieren die auf Proteinebene erhobenen Daten: im Gegensatz zu der Linie RNK-16 setzen die Linien 3651 und 3075 meßbare IFN- $\gamma$ -Mengen in das sie umgebende Medium frei (Tab. 4.1.4). Die sensitivere durchflußzytometrische Analyse zeigte jedoch, daß ein Teil der Zellen IFN- $\gamma$  in

geringem Ausmaß produziert (Daten nicht gezeigt). NK-Zellen steigern die IFN- $\gamma$ -Transkription und die Gleichgewichts-mRNA-Level unter anderem als Antwort auf IL-2 (Farrar et al., 1986). Die im Vergleich zu der Linie RNK-16 stärkere IFN- $\gamma$ -Expression der Linien 3651 und 3075 könnte somit unter anderem eine Konsequenz ihrer Kultivierung mit IL-2 sein. Die aufgrund der charakteristischen IL-2R- und RT6-Expression sowie den Wachstumseigenschaften der Linien aufgestellte Hypothese, daß die Linien 3651 und 3075 einen aktivierten Zustand von NK-Zellen repräsentieren, wird durch diese Ergebnisse und Überlegungen unterstützt. Die Freisetzung von IFN- $\gamma$  kann bei der Linie RNK-16 durch Kultivierung mit IL-2 nur in geringem Ausmaß stimuliert werden (Tab. 4.5.1, Tab. 4.2.4, Abb. 4.2.10). Diese Beobachtung unterstützt die Annahme, daß diese NK-Linie nicht im gleichen Ausmaß wie die Linien 3651 und 3075 aktiviert ist und daher für die effektive Induktion der IFN- $\gamma$ -Synthese eventuell zusätzliche aktivierende Signale benötigt. Die Translation der IFN- $\gamma$ -mRNA scheint bei der Linie RNK-16 trotz der eindeutig nachgewiesenen Expression auf mRNA-Ebene nur in geringem Ausmaß bzw. gar nicht abzulaufen. Die Regulation der IFN- $\gamma$ -Expression scheint somit bei dieser Linie auf der Ebene der Proteinsynthese oder später stattzufinden.

Die Analyse der TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression der Linien 3651 und 3075 lieferte nur in einigen Experimenten Signale; in Gesamt-RNA-Extrakten der Linie RNK-16 konnte in keinem Experiment TNF- $\alpha$ -mRNA nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Keine der untersuchten NK-Linien sezernierte meßbare TNF- $\alpha$ -Mengen, die Produktion dieses Zytokins konnte bei der Linie RNK-16 zudem nicht durch IL-2 induziert werden (Tab. 4.2.4). Diese Daten deuten darauf hin, daß für die Induktion einer meßbaren TNF- $\alpha$ -Synthese neben IL-2 ein weiteres, kostimulierendes Signal benötigt wird. IL-2 induziert bei humanen NK-Zellen die Transkription der TNF- $\alpha$ - und IFN- $\gamma$ -Gene sowie die Akkumulation der entsprechenden mRNAs, die Sekretion der Proteine wird jedoch nur in minimalen Ausmaß stimuliert (Anegon et al., 1988). Somit scheint die Expression dieser Zytokine zusätzlich auf posttranslationaler Ebene reguliert zu werden und für die Induktion einer effizienten Proteinsynthese kostimulatorische Signale zu benötigen. Zusammenfassend zeigen die Befunde zur Zytokin-Expression der NK-Linien 3651 und 3075 auch, daß bei diesen Zellen die Synthese von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  unterschiedlich reguliert werden.

Erst aktuelle Untersuchungen haben gezeigt, daß NK-Zellen, nach Stimulation mit IL-2 und IL-12, auch IL-10 exprimieren können (Mehrotra et al., 1998); IL-10-mRNA konnte jedoch, ebenso wie IL-1 $\beta$ -mRNA, bei keiner der drei Linien nachgewiesen werden (Daten nicht



gezeigt). Eine Expression von IL-4 konnte nur bei der Linie RNK-16 gezeigt werden (Abb. 4.1.8, III). Basierend auf diesen Befunden wurden weitere Untersuchungen zur Zytokin-Expression der NK-Linien auf die Analyse ihrer IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ -Expression beschränkt.

Von der Arbeitsgruppe durchgeführte Experimente ( $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungstests) hatten ergeben, daß die Linien 3651 und 3075 direkt nach ihrer Etablierung das für NK-Zellen typische zytotoxische Potential besaßen. Die Langzeit-Kultivierung der NK-Zellen hatte jedoch den Verlust ihrer zytotoxischen Aktivität zur Folge (Daten nicht gezeigt). Auch die Linie RNK-16 hatte ihre initial vorhandene Zytotoxizität verloren. Die Untersuchung dieser wichtigen NK-Effektor-Funktion unter dem Aspekt der Bedeutung der RT6-Expression für die Funktion von NK-Zellen war somit an diesen Zell-Linien nicht möglich.

Die Beobachtung, daß die Langzeit-Kultivierung der Linie RNK-16 in einigen Subkulturen mit einem Verlust ihres zytotoxischen Potentials einhergeht, wurde auch von der Arbeitsgruppe gemacht, in der diese Linie etabliert wurde (Axberg et al., 1988). Dem Verlust Zelltyp-spezifischer Funktionen, der bei vielen Zell-Linien zu beobachten ist, scheint eine Gen-Inaktivierung durch Methylierung normalerweise freier CpG-Inseln zugrunde zu liegen (Antequera et al., 1990). Da die Linie RNK-16 im Gegensatz zu den Linien 3651 und 3075 ohne IL-2 kultiviert wird, scheint dieser Effekt nicht allein durch dieses Zytokin vermittelt zu werden.

Eine weitere Erklärung wäre, daß die NK-Linien 3651 und 3075 durch die anhaltende Aktivierung mit IL-2 im Hinblick auf die zytolytische Aktivität anerg geworden sind. Ein interessanter Aspekt in diesem Zusammenhang ist, daß bei den Linien 3651 und 3075 zwei NK-Funktionen von zentraler Bedeutung, die zytotoxische Aktivität und die IFN- $\gamma$ -Sekretion, nicht koordiniert reguliert bzw. induziert werden. Die unabhängige und unterschiedliche Regulation der natürlichen Zytotoxizität und der IFN- $\gamma$ -Freisetzung läßt die Vermutung zu, daß unterschiedliche NK-Effektor-Funktionen von differenten Signalen gesteuert werden. Variationen in der Expression von NK-Oberflächenmolekülen, die an der Regulation von NK-Zellen beteiligt sind, oder unterschiedliche Aktivierungszustände könnten somit zur Folge haben, daß NK-Zellen individuell z.B. auf die Erkennung ein und derselben Zielzelle reagieren. Diese Hypothese steht in Einklang mit der Beobachtung, daß verschiedene humane NK-Zell-Linien im Hinblick auf Zytotoxizität und IFN- $\gamma$ -Freisetzung unterschiedlich stark auf identische Zielzellen reagieren; hierbei waren die Unterschiede um so markanter, je länger die *in vitro*-Kultur der NK-Zell-Klone andauerte (Kurago et al., 1998).

Wie bereits erwähnt, bildet das von NK-Zellen exprimierte Muster an Adhäsionsmolekülen und aktivierenden Rezeptoren die Basis für die Erkennung und Lyse von Zielzellen. Für NKR-P1 (Chambers et al., 1989), CD2 (Siliciano et al., 1985), CD44 (Galandrini et al., 1994), LFA-1 (Melero et al., 1993) und CD28 (Azuma et al., 1992) konnte gezeigt werden, daß sie die NK-Zell-Aktivierung auslösen bzw. verstärken können. Unter diesem Aspekt wurde der Oberflächenphänotyp der NK-Linien eingehend untersucht und mit dem frisch isolierter Milz-NK-Zellen verglichen. Die vergleichende Analyse des Oberflächenphänotyps der NK-Linien konnte jedoch keine signifikanten Unterschiede zu frisch isolierten Milz-NK-Zellen aufzeigen (Tab. 4.1.1). Die Linien 3651, 3075 und RNK-16 zeigten die für NK-Zellen typische Expression des NKR-P1-Moleküls bei fehlender Expression von CD3 und des TCRs. CD2, LFA-1, ICAM-1, CD44, CD28, CD45 und CD43 konnten auf der Oberfläche von Milz-NK-Zellen und jeder der drei NK-Linien nachgewiesen werden. Der bei den NK-Linien beobachtete Verlust der zytotoxischen Aktivität kann somit nicht auf die fehlende Expression eines dieser Oberflächenmoleküle zurückgehen. Zudem liegt dem nicht adhärenen Wachstum der Linie RNK-16 demzufolge nicht die fehlende Expression eines der betrachteten Adhäsionsmoleküle zugrunde.

## 5.2 Freisetzung von RT6 durch NK-Zellen

Die Untersuchung der Kulturüberstände der NK-Linien mittels Protein-Dot-Blot zeigte, daß RT6.1 bzw. RT6.2 in löslicher Form von den Zellen freigesetzt werden (Abb. 4.1.6). Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der Tatsache, daß verschiedene andere GPI-verankerte Proteine nicht nur membrangebunden, sondern auch im Serum oder Kulturüberständen nachgewiesen werden konnten. Zu diesen Molekülen zählen, neben RT6, CD16 (FcγRIII, Selvaraj et al., 1988) und Qa2 (Huizinga et al., 1988; Soloski et al., 1986). RT6.1 bzw. RT6.2 wurden im Serum verschiedener Rattenstämme (BB, LEW, F344, WF, WAG-nu/+, BUF) in vergleichbaren Mengen detektiert (Waite et al., 1993).

Die Stimulation von Zellen mit verschiedenen endokrinen und parakrinen Molekülen, wie Hormonen (z.B. Prolactin, Insulin), Wachstumsfaktoren und Zytokinen (z.B. IL-2), führt in vielen Fällen zu einer transienten Freisetzung GPI-verankerter Moleküle von der Zellmembran (für eine Übersicht siehe Nosjean et al., 1997). Die Freisetzung von RT6 von NK-Zellen scheint in dem in dieser Arbeit betrachteten *in vitro* System jedoch nicht allein von IL-2 abhängig zu sein, da auch im Überstand der ohne IL-2 kultivierten Linie RNK-16 RT6.2

nachgewiesen werden konnte. Zudem induzierte die Kultivierung dieser Linie mit IL-2 keine meßbare Steigerung der RT6-Freisetzung (Abb. 4.1.6).

Aus Untersuchungen mit thymektomierten und eviszerierten Ratten wurde abgeleitet, daß die Hauptquelle für das im Serum nachgewiesene RT6.1 nicht periphere T-Zellen, sondern vielmehr intraepitheliale Lymphozyten (IEL) darstellen (Lesma et al., 1998). In diesen Untersuchungen wurde jedoch nicht berücksichtigt, daß auch NK-Zellen als Quelle für freies RT6 in Betracht kommen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen, daß aktivierte, proliferierende NK-Zellen *in vitro* RT6 in das sie umgebende Medium abgeben und somit *in vivo* an der Freisetzung dieses Moleküls beteiligt sein könnten.

Für DP-BB/Wor-Ratten, die spontan autoimmune IDDM und Thyroiditis entwickeln, ist ein schwerer Mangel an RT6-positiven T-Zellen charakteristisch (Greiner et al., 1986). Die Anzahl der zirkulierenden RT6<sup>+</sup>-T-Zellen ist bei den Tieren dieses Stammes auf etwa ein Zehntel der bei Diabetes-resistenten DR-BB/Wor-Ratten vorhandenen Population reduziert. Zudem ist die RT6-Oberflächenexpression der IELs dieser Ratten drastisch verringert und beträgt nur etwa 10% der bei DR-BB/Wor-Ratten beobachteten Expressionsdichte. Dennoch konnte im Serum von DP-BB/Wor-Ratten ein Drittel der bei DR-BB/Wor-Ratten detektierten RT6-Menge nachgewiesen werden (Waite et al., 1993). Für diese fehlende Proportionalität konnte bislang keine Erklärung gefunden werden. Somit stellen auch in diesem Zusammenhang aktivierte NK-Zellen als zusätzliche Quelle für freies RT6 eine attraktive Erklärungsmöglichkeit für das beobachtete Phänomen dar.

Die Mechanismen, die zu der Freisetzung GPI-verankerter Proteine führen, sind weitgehend unbekannt. Denkbar ist unter anderem eine Enzym-vermittelte Abgabe durch hydrolytische Spaltung des GPI-Ankers oder des Proteins über PI- bzw. GPI-spezifische Phospholipasen (PI- bzw. GPI-PL) bzw. Proteasen. Einige GPI-verankerte Moleküle, darunter N-CAM (He et al., 1987) und CD14 (Bazil und Strominger, 1991), scheinen proteolytisch freigesetzt zu werden. Die durch Insulin oder IL-2 induzierte Abspaltung anderer GPI-verankerter Proteine scheint hingegen die Aktivierung einer endogenen PI-PLC nach Anstieg des Glucose-Transportes mit einzubeziehen (Müller et al., 1996, Eardly et al., 1991). GPI-verankertes DAF („decay-accelerating factor“) wird durch eine zellassoziierte GPI-PLD von der Oberfläche von HeLa-Zellen freigesetzt (Metz et al., 1994). PI-PLC und GPI-PLD konnten aus verschiedenen Säugetiergeweben isoliert werden. Im Gegensatz zu der intrazellulären PI-PLC kommt die GPI-PLD auch extrazellulär im Serum von Säugetieren vor (Katan, 1998), dieses Enzym scheint jedoch nur solubilisierte GPI-Proteine, nicht aber membranassoziierte GPI-Anker spalten zu können (Low 1992).

Alternative Freisetzungs-Mechanismen für RT6 sind die Abschnürung von Membran-Vesikeln und die exozytotische Sezernierung. Die spontane Abschnürung von Vesikeln aus der Plasmamembran wurde für normale Zellen und Tumorzellen beschrieben (Black et al., 1980). Diese an GPI-verankerten Molekülen, Sphingomyelin, Cholesterol und Gangliosiden besonders reichen Vesikel können mit Membranen anderer Zellen verschmelzen (Scott et al., 1979; Butikofer et al., 1989).

Wie bereits erwähnt, konnte RT6 auch im Zytoplasma der Zellen der Linie 3651 nachgewiesen werden (Abb. 4.1.6). Neben für die Inkorporation in die Zellmembran oder die zytoplasmatische Lokalisation bestimmte Moleküle (siehe Abschnitt 5.1) könnte es sich zudem um sekretorische Isoformen von RT6 handeln. Exon 8 des RT6-Gens kodiert die für die GPI-Verankerung verantwortliche C-terminale Signalsequenz und die 3'untranslatierte Region. Bislang wurde ein alternatives Spleißen im 3'Ende des RT6-Gens nicht beobachtet (Haag et al., 1993); es konnte jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, daß Varianten existieren, welche die GPI-Verankerung kodierenden Sequenzen nicht besitzen und daher sezerniert werden. Auch eine intrazelluläre Abspaltung des GPI-Ankers durch Phospholipasen und die nachfolgende Sezernierung der Moleküle, ein Mechanismus der bei der Freisetzung von PLAP beobachtet wurde (Tsujioka et al., 1999), wäre möglich. Zudem wäre eine Exozytose nach Internalisierung der membranverankerten RT6-Moleküle und Abtrennung der Ankerkomponenten denkbar, wie sie für CD14, exprimiert auf Monozyten, nachgewiesen wurde (Durieux et al., 1994).

Gegen eine Freisetzung von RT6.1 durch Exozytose oder Abschnürung von Vesikeln spricht jedoch der Befund, daß der Zusatz von Brefeldin A, einem Inhibitor des intrazellulären vesikulären Transportes und der Exozytose, zu Kulturen der Linie 3651 keine anhand Protein-Dot-Blot detektierbaren Effekte auf die in den Kulturüberständen enthaltenen RT6.1-Mengen hatte und somit die Freisetzung dieses Moleküls nicht signifikant inhibieren konnte (Abb. 4.1.7). Daraus kann abgeleitet werden, daß das in den Kulturüberständen der NK-Linie 3651 nachgewiesene RT6.1 hauptsächlich durch die enzymatische Aktivität von Phospholipase(n) und/oder Proteasen aus der membrangebundenen Form entsteht.

Diese Hypothese wird durch durchflußzytometrische Untersuchungen gestützt, die zeigten, daß Brefeldin A eine konzentrationsabhängige Verringerung der RT6.1-Dichte auf Zellen der Linie 3651 zur Folge hat (Abb. 4.3.5). Dieser Effekt kann durch die Brefeldin A-vermittelte Blockade des anterograden vesikulären Transportes vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi-Apparat erklärt werden, durch die sekretorische und Membranproteine im ER der Zellen zurückgehalten werden. Die Tatsache, daß der Effekt innerhalb einer relativ kurzen

Zeitspanne (3 h) zu einer auf die Hälfte reduzierten RT6.1-Dichte führte, impliziert, daß neu synthetisiertes RT6.1 kontinuierlich an die Zelloberfläche transportiert und in die Zellmembran integriert wird. Die bei der Linie 3651 beobachtete konstante RT6-Expressionsdichte (Tab. 4.1.3) läßt zudem vermuten, daß RT6.1-Moleküle kontinuierlich durch enzymatische Hydrolyse von der Zellmembran freigesetzt werden.

Eine durch zelluläre Aktivierung induzierte Freisetzung von RT6 könnte *in vivo* verschiedene funktionelle Bedeutungen haben. Einerseits bietet sie die Möglichkeit zu einer schnellen Herabregulation der RT6-Expression. Da für GPI-verankerte Moleküle lange Halbwertszeiten charakteristisch sind (Censullo und Davitz, 1994), könnte über einen solchen Mechanismus die RT6-Dichte auf der Zelloberfläche dennoch schnell an veränderte Funktionszustände der NK-Zelle angepaßt werden. Aufgrund der bereits diskutierten Daten wurde die Hypothese aufgestellt, daß die Oberflächen-Expression von RT6 mit der Aktivierung von NK-Zellen einhergeht und zu der Ausübung von NK-Effektor-Funktionen beiträgt. In diesem Zusammenhang könnte eine schnelle Reduktion der RT6-Dichte ein Überschießen der RT6-vermittelten NK-Aktivität verhindern.

Andererseits könnte freigesetztes RT6 *in vivo* parakrine Funktionen besitzen. Lösliches, im Serum vorhandenes RT6 besitzt die für das membranassoziierte Molekül charakteristische NADase-Aktivität (Lesma et al., 1998); die Auto-Ribosyltransferase Aktivität von freiem RT6 wurde bislang nicht untersucht. Da jedoch nach aktuellem Wissenstand weder RT6.1 noch RT6.2 ADP-Ribosegruppen auf andere Proteine übertragen können (Hara et al., 1996; Haag et al., 1995; Maehama et al., 1995 und 1996), wäre eine mögliche parakrine enzymatische Aktivität von RT6 auf die Hydrolyse von extrazellulärem NAD<sup>+</sup> beschränkt und könnte nicht in der Modifizierung der Oberflächenmoleküle anderer Zellen bestehen. Diese NADase-Aktivität könnte dazu dienen, die aus der Lyse von Zielzellen und entzündlichen Immunreaktionen resultierende Erhöhung der extrazellulären NAD<sup>+</sup>-Konzentrationen zu dämpfen. Auf diesem Weg könnten durch extrazelluläres NAD<sup>+</sup> vermittelte Effekte auf NK-Zellen und andere Zellen des Immunsystems (CTL: Wang et al., 1996) moduliert werden (siehe auch 5.7). Vor dem Hintergrund der vermuteten Rezeptor-Funktion von RT6 könnte das freie Molekül zudem mit membranassoziiertem RT6 um die Bindung des hypothetischen Liganden konkurrieren.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist, daß RT6 im Serum in der HDL („high density lipoprotein“)-Fraktion lokalisiert ist (Lesma et al., 1998). Das Molekül könnte auf diesem Weg zu anderen Zellen transportiert und in einem funktionellen Zustand in deren Membran integriert werden (Vakeva et al., 1994).

### 5.3 RT6-vermittelte Modulation von NK-Zell-Funktionen

Zur Bearbeitung der Frage, ob die Interaktion von RT6 mit einem spezifischen Antikörper zu einer Reaktivitätsänderung von NK-Zellen führt, wurde ihr Effekt auf die Expression der unterschiedlich affinen Formen des IL-2-Rezeptors untersucht.

Die RT6-Kreuzvernetzung hatte bei der NK-Linie 3651 und aus Milz isolierten NK- und T-Zellen eine Expansion der CD25 (IL-2R $\alpha$ )-positiven NK- und T-Zell-Populationen zur Folge. Begleitend erhöhte sich die CD25-Dichte auf den untersuchten Zellen (Abb. und Tab. 4.2.1, Abb. 4.2.3 und Tab. 4.2.2). Diese Befunde deuten darauf hin, daß die Expression des hoch affinen IL-2-Rezeptors (IL-2R $\alpha\beta\gamma$ ) auf der Oberfläche von NK-Zellen durch ein über RT6 vermitteltes Signal weiter gesteigert bzw. auf zuvor negativen Zellen induziert werden kann. Die von RT6 übertragenen Signale versetzen auf diesem Weg NK-Zellen in die Lage, bereits auf geringe IL-2-Konzentrationen mit Proliferation und Aktivierung zu antworten. Weiterführende Untersuchungen mit der Linie 3651 zeigten, daß die RT6-Kreuzvernetzung zu der Akkumulation von CD25-mRNA führt und die Regulation somit auf Ebene der Gentranskription ansetzt (Abb. 4.2.4, Tab. 4.2.3). Die gesteigerte Transkription des CD25-Gens und die verstärkte CD25-Oberflächenexpression waren bereits nach 4-stündiger RT6-Kreuzvernetzung zu beobachten. Das CD25-Gen gehört, wie auch das IFN- $\gamma$ -Gen, zu den Frühgenen, die nach zellulärer Aktivierung vor der Mitose relativ schnell transkribiert werden. Bei T-Zellen konnte in diesem Zusammenhang bereits 2 h nach Aktivierung CD25-mRNA nachgewiesen werden (Abbas et al., 1996). Wie bereits erwähnt, kann die Induktion der IL-2R $\alpha$ -Kette als Marker für zelluläre Aktivierung gewertet werden (Siegel et al., 1987). Daraus kann abgeleitet werden, daß die Interaktion zwischen RT6 und den Antikörpern die Aktivierung der NK- bzw. T-Zellen auszulösen vermochte.

Der Effekt auf die CD25-Expression war bei der Linie 3651 in wesentlich stärkerem Ausmaß zu beobachten als bei Milz-NK-Zellen; dieser Befund reflektiert vermutlich die unterschiedlichen Aktivierungszustände der Zellen. Wie in Abschnitt 5.1 dargelegt, repräsentiert die Linie 3651 den aktivierten Zustand von A-LAK-Zellen, der sich unter anderem in der vergleichsweise höheren Expression des hoch affinen IL-2Rs widerspiegelt.

Rigby et al. (1996b) konnten zeigen, daß die Kreuzvernetzung von RT6.2 auf T-Zellen aus WF-Ratten die Oberflächen-Expression der IL-2R $\alpha$ -Kette in signifikantem Ausmaß induzierte. Voraussetzung für den beobachteten Effekt war jedoch die gleichzeitige Stimulation der Zellen mit PMA und damit die gleichzeitige Aktivierung der Proteinkinase C

(PKC). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten zeigen, daß die Stimulation von T-Zellen über RT6.1 und IL-2 die CD25-Expression, wenn auch nur in geringem Ausmaß, ohne Stimulation der Zellen über PMA *de novo* induzieren kann (Abb. 4.2.3 und Tab 4.2.2). Ob eine antigenabhängige Voraktivierung der T-Zellen, die noch *in vivo* stattgefunden haben könnte, Voraussetzung für den Effekt ist, kann in diesem Zusammenhang nicht geklärt werden.

Die RT6-Kreuzvernetzung auf Ratten-T-Zellen induziert eine verstärkte proliferative Aktivität der Zellen (Wonigeit und Schwinzer, 1987; Rigby et al., 1996b). Die Proliferation der NK-Linien wurde jedoch durch die immobilisierten RT6-Antikörper nicht eindeutig beeinflußt (Daten nicht gezeigt). Es ist denkbar, daß diese NK-Zellen aufgrund der Kultivierung mit hohen IL-2-Konzentrationen bzw. ihrer Tumorzell-Eigenschaften bereits ihre maximale proliferative Aktivität besaßen und eine weitere Steigerung daher nicht beobachtet werden konnte.

Die Analyse der Effekte der RT6-Kreuzvernetzung auf die Zytokin-Expression der Zellen ergab, daß die Stimulation bei der NK-Linie 3651 und Milz-NK- bzw. T-Zellen eine verstärkte Freisetzung von IFN- $\gamma$  hervorruft (Abb. 4.2.8 und 4.2.9, Tab. 4.2.4). Die Analyse der Linie 3651 zeigte zudem, daß die verstärkte IFN- $\gamma$ -Ausschüttung mit einer Akkumulation von IFN- $\gamma$ -mRNA einhergeht und somit anscheinend durch eine gesteigerte Gentranskription und Proteinsynthese erreicht wird (Abb. 4.2.7). Der Effekt war bereits nach 4-stündiger RT6-Kreuzvernetzung zu beobachten und reflektiert, daß die Transkription des IFN- $\gamma$ -Gens nach Zellaktivierung vor der Mitose stattfindet. Wie bereits in Abschnitt 5.1 erwähnt, konnte in den Kulturüberständen der unbehandelten Linie 3651 IFN- $\gamma$  detektiert werden. Dieser Befund steht in Einklang mit der Beobachtung, daß NK-Zellen als Antwort auf IL-2 allein bereits geringe Mengen an IFN- $\gamma$  produzieren (Trinchieri et al., 1989). Die Kostimulation von NK-Zellen, z.B. über IL-12, führt zu einem vehementen Anstieg der IFN- $\gamma$ -Freisetzung (Carson et al., 1994). Es kann somit rückgeschlossen werden, daß die Kreuzvernetzung von RT6.1 auf der NK-Linie 3651 in dieser experimentellen Anordnung das für eine signifikante Induktion der IFN- $\gamma$ -Produktion benötigte kostimulatorische Signal vermittelte.

Die untersuchten Milzzellen setzten sich aus durchschnittlich 55% NK-Zellen, 25% B-Zellen und 20% T-Zellen zusammen. Die B-Zell-Population kommt als direkter IFN- $\gamma$ -Produzent nicht in Frage. Die Transkription des IFN- $\gamma$ -Gens wird jedoch bei T-Zellen als Konsequenz der Antigenaktivierung induziert und z.B. durch IL-2 gesteigert. Voraussetzung für eine komplette Aktivierung von T-Zellen und die damit verbundene Ausschüttung von Zytokinen

ist somit das gemeinsame Auftreten TCR-vermittelter und kostimulatorischer Signale (Müller et al., 1989). Im Rahmen der RT6-Kreuzvernetzungs-Experimente wurden die T-Zellen nicht gleichzeitig durch PMA oder Kreuzvernetzung anderer Oberflächenmoleküle als RT6 stimuliert. Die Quelle für das in den Negativ-Kontrollansätzen detektierte IFN- $\gamma$  könnten daher, neben den NK-Zellen, nur durch Antigenkontakt *in vivo* voraktivierte T-Zellen sein. Bei T-Zellen sind für die Induktion der Zytokin-Produktion wesentlich stringendere Aktivierungsereignisse nötig, als für die Induktion der IL-2R-Expression (Weiss und Imboden, 1987). Diese Beobachtung spiegelt sich in den von Rigby et al. (1996b) veröffentlichten Befunden wider, nach denen die Kreuzvernetzung von RT6.2 auf T-Zellen, die aus Lymphknoten von WF-Ratten isoliert worden waren, bei gleichzeitiger Stimulation der Zellen über PMA die CD25-Expression, nicht aber die Synthese von IL-2 induzieren konnte. Dies deutet darauf hin, daß die Induktion der Zytokin-Produktion bei T-Zellen neben der Stimulation über RT6 und der Aktivierung der PKC über PMA zusätzliche aktivierende, über den TCR vermittelte Signale benötigt. Im Zusammenhang mit den oben ausgeführten Befunden zur Produktion von IFN- $\gamma$  nach RT6-Kreuzvernetzung bedeutet dies, daß die T-Zell-Population nicht für die gesteigerte IFN- $\gamma$ -Konzentration verantwortlich sein kann. Zudem exprimierten nur durchschnittlich 75% der T-Zellen RT6.1 und konnten theoretisch auf die Kreuzvernetzung dieses Moleküls mit der Ausschüttung von IFN- $\gamma$  reagieren. Der Anteil der RT6.1-positiven T-Zell-Population innerhalb der gesamten, im Experiment eingesetzten Zellen betrug somit nur 15%. Von dieser Subpopulation wären hauptsächlich nur die voraktivierten CD4<sup>+</sup>-T-Helfer-Zellen zur Produktion von IFN- $\gamma$  fähig und damit in der Lage, nach RT6-Kreuzvernetzung verstärkt IFN- $\gamma$  freizusetzen. Auch vor diesem Hintergrund ist eine signifikante Beteiligung von T-Zellen an der beobachteten Erhöhung der IFN- $\gamma$ -Konzentration nach RT6-Kreuzvernetzung unwahrscheinlich. Diese Überlegungen lassen den Rückschluß zu, daß die verstärkte Freisetzung von IFN- $\gamma$  nach RT6-Kreuzvernetzung auf die Aktivierung der NK-Population zurückzuführen ist.

Die RT6-Kreuzvernetzung induzierte bei der Linie 3651 zudem die Produktion von TNF- $\alpha$  (Abb. 4.2.8, Tab. 4.2.4). Auf Ebene der TNF- $\alpha$ -Gentranskription konnte bei der Linie 3651 jedoch keine durch RT6-Kreuzvernetzung induzierte Akkumulation der mRNA beobachtet werden. Dies könnte darauf hindeuten, daß die TNF- $\alpha$ -Freisetzung in diesem Kontext auf der Ebene der Proteinsynthese oder -Freisetzung reguliert wird. Die RT6-Kreuzvernetzung auf Milz-NK- bzw. T-Zellen hatte keinen signifikanten Effekt auf die TNF- $\alpha$ -Synthese dieser Zellen (Abb. 4.2.9, Tab. 4.2.4). Dies impliziert, daß für die RT6-



vermittelte Induktion der TNF- $\alpha$ -Synthese bei NK-Zellen zusätzliche stimulierende Signale benötigt werden.

In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, daß TNF- $\alpha$  synergistisch mit IL-2 die Expression von CD25 auf NK- und T-Zellen induzieren kann. Es kann daher nicht ganz ausgeschlossen werden, daß die nach RT6-Kreuzvernetzung gesteigerte CD25 Expression bei der Linie 3651 auch indirekt durch die verstärkte TNF- $\alpha$ -Produktion induziert bzw. beeinflusst wurde. Bei Milz-NK-Zellen wurde jedoch eine verstärkte CD25-Expression beobachtet, die nicht mit einem Anstieg der TNF- $\alpha$ -Konzentration in den Kulturüberständen einher ging. Demnach scheint die direkte Interaktion zwischen RT6 und den Antikörpern die Hauptursache für die verstärkte CD25-Expression zu sein.

Der Anteil toter Zellen erhöhte sich durch die RT6-Kreuzvernetzung nicht signifikant. Somit kann ausgeschlossen werden, daß der Erhöhung der Zytokin-Konzentrationen in den Kulturüberständen eine durch Zelltod ausgelöste Freisetzung präformierter Zytokine zugrunde liegt. Die Tatsache, daß die in Folge der RT6.1-Kreuzvernetzung verstärkte Freisetzung von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  bereits nach 4 bzw. 8 h beobachtet werden konnte, schließt eine gesteigerte Proliferation und daraus resultierende Erhöhung der Gesamtzellzahl als Ursache des beobachteten Effektes aus.

Zusammenfassend kann auf der Basis dieser Befunde die Hypothese aufgestellt werden, daß RT6.1 die Fähigkeit zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege besitzt und die Bindung seines natürlichen Liganden *in vivo* die Transkription von Genen (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , CD25) induziert, die für die Ausübung der Effektor-Funktionen von NK-Zellen von Bedeutung sind. Das auf Ratten-NK-Zellen exprimierte Ektoenzym RT6.1 scheint somit wie auch andere, auf der Oberfläche von Lymphozyten exprimierte Enzyme (z.B. CD38: Lund al., 1998, CD26: Morimoto et al., 1998; CD73: Resta et al., 1998), ein multifunktionales Protein zu sein.

Die Kreuzvernetzung von RT6.2 auf der NK-Linie RNK-16 konnte bei gleichzeitigem Zusatz von IL-2 weder die CD25-mRNA- bzw. Proteinexpression (Abb. 4.2.2 und 4.2.5), noch die Freisetzung von TNF- $\alpha$  (Tab. 4.2.4) induzieren. Eine verstärkte Freisetzung von IFN- $\gamma$  bei gleichzeitigem Zusatz von IL-2 konnte nur in einem von drei Experimenten beobachtet werden und ist daher nicht signifikant (Tab. 4.2.4). Auch die sensitive durchflußzytometrische intrazelluläre Analyse der IFN- $\gamma$ -Produktion konnte keinen Effekt der RT6-Kreuzvernetzung aufzeigen (Abb. 4.2.10). RT6.2 war somit in diesem experimentellen System nicht in der Lage, kostimulatorische Signale zu vermitteln, die zu einer Modulation der betrachteten NK-Effektor-Funktionen der Linie RNK-16 geführt hätten.

Die beiden allelischen RT6-Formen unterscheiden sich auf der Ebene der Proteinsequenz um 5% (Haag et al., 1990b). Es wäre daher denkbar, daß RT6.2 aufgrund seiner Aminosäuresequenz im Gegensatz zu RT6.1 keine Signalkapazitäten besitzt. Gegen diese Hypothese spricht jedoch, daß auf Ratten-T-Zellen exprimiertes RT6.2 die Fähigkeit zur Signaltransduktion besitzt (Rigby et al., 1996b). Die Expression unterschiedlicher RT6.2-Transkripte in NK- und T-Zellen erscheint unwahrscheinlich, da alternatives Spleißen bislang nicht im Bereich des Exons beobachtet werden konnte, welches das native RT6-Protein kodiert (Exon 7, Haag et al., 1997).

Der Funktionszustand der Linie RNK-16 unterscheidet sich, wie in Abschnitt 5.1 diskutiert, deutlich von dem der NK-Linie 3651 und IL-2 aktivierter Milz-NK-Zellen; so reagiert die Linie auf IL-2 weder mit verstärkter Proliferation, noch mit dem für LAK-Zellen typischen adhärenthem Wachstum. Die fehlende Adhärenz könnte zur Folge haben, daß neben der RT6-Kreuzvernetzung für die volle Aktivierung der Zellen eventuell nötige, durch Adhäsionsmoleküle vermittelte Signale nicht auftreten (siehe Abschnitt 5.5). Zudem wäre es möglich, daß die Linie durch die Langzeit-Kultivierung oder aufgrund ihrer Tumorzell-Eigenschaften in Bezug auf bestimmte Effektor-Funktionen anerg ist. Die Annahme wird dadurch gestützt, daß auch die Stimulation der Zellen mit PMA und Ionomycin und die damit einher gehende Aktivierung der PKC bzw. Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration die CD25-Expression nicht induzieren konnte (Abb. 4.2.6). Eine mögliche Ursache wären aus der Langzeit-Kultivierung resultierende DNA-Methylierungen, welche die Transkription bestimmter Gene verhindern (Antequera et al., 1990).

Bislang ist nicht bekannt, in welchen Domänen des RT6-Proteins die durch die Antikörper erkannten Epitope liegen. Es wäre somit möglich, daß der gegen RT6.2 gerichtete Antikörper an einen anderen Proteinbereich als der anti-RT6.1-Antikörper bindet. Die Bindung könnte z.B. in einer Domäne stattfinden, die nicht an der Interaktion mit dem hypothetischen Liganden, sondern an der Assoziation von RT6 mit Adaptermolekülen (siehe Abschnitt 5.5) oder an der enzymatischen Aktivität beteiligt ist. Auf diesem Wege könnten eventuell vorhandene Signalkapazitäten durch den Antikörper blockiert werden. In den mit T-Zellen durchgeführten Untersuchungen wurde, wie in dieser Arbeit, der anti-RT6.2-Antikörper GY1/12 eingesetzt (Rigby et al., 1996b). Da in diesen Experimenten die Induktion der IL-2R $\alpha$ -Kette beobachtet wurde, erscheint diese Erklärung jedoch unwahrscheinlich.

Es kann somit in diesem Zusammenhang nicht geklärt werden, welche Ursache die beobachteten, fehlenden Signalkapazitäten von RT6.2 haben.

## 5.4 RT6-vermittelte Reduktion der RT6-Oberflächenexpression

Durchflußzytometrische Analysen zeigten, daß die RT6-Kreuzvernetzung auf den NK-Linien 3651 und RNK-16 in Abhängigkeit von der Dauer der Stimulation eine signifikante Reduktion der RT6-Dichte und die Entstehung einer RT6-negativen Population zur Folge hatte (Abb. 4.3.1 und Abb. 4.3.3, Tab. 4.3.1). Bei Milz-NK- und T-Zellen konnte ebenfalls eine zeitabhängige, deutliche Verringerung der Anzahl der RT6-Moleküle auf der Oberfläche der RT6.1 positiven Populationen beobachtet werden (Abb. 4.3.2, Tab. 4.3.1). Bei den Milz-NK-Zellen nahm die Größe dieser Population um mehr als die Hälfte ab; dieser Effekt war auch bei den T-Zellen, wenn auch in schwächerem Ausmaß, zu beobachten. Dies deutet darauf hin, daß NK- und T-Zellen zum Teil gemeinsame Mechanismen für die Regulation ihrer RT6-Expression benutzen.

Die bei der Linie RNK-16 fehlende Korrelation zwischen der Induktion der CD25- bzw. IFN- $\gamma$ -Expression und der Induktion der RT6.2-Freisetzung zeigt, daß nach RT6-Kreuzvernetzung unterschiedliche Signalwege in Gang gesetzt werden.

Die Beobachtung, daß IL-2 bei Milz-NK-Zellen, wie bereits dargelegt, zu einer verstärkten RT6-Expression führt, während die Stimulation der NK-Zellen über RT6 in der Reduktion der Oberflächendichte dieses Moleküls resultiert, zeigt, daß differente aktivierende Signale sich unterschiedlich auf die RT6-Expression auswirken. Von antigenaktivierten T-Zellen produziertes IL-2 scheint NK-Zellen durch Induktion der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle, darunter RT6, in die Lage zu versetzen, Zielzellen noch effektiver zu erkennen und zu lysieren. Die erst nach etwa 24 h zu beobachtende IL-2-vermittelte Induktion der RT6-Expression deutet darauf hin, daß ihr die verstärkte Transkription der RT6-Gens zugrunde liegt. Die Abspaltung von RT6 trat bereits nach 30-minütiger RT6-Kreuzvernetzung auf und scheint somit nicht die Aktivierung der Transkription bestimmter Gene einzubeziehen. Die im vorangegangenen Abschnitt aufgestellte Modellvorstellung zugrunde legend, hätte die Bindung einer Zielzelle und die Erkennung des hypothetischen Liganden durch RT6 die Übermittlung aktivierender Signale zur Folge, die in der verstärkten Expression des hoch affinen IL-2Rs und der gesteigerten Freisetzung von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  resultieren. Die parallele Reduktion der RT6-Expression könnte zum einen durch Unterbindung der RT6-vermittelten Signaltransduktion dazu beitragen, nach erfolgreicher Aktivierung der NK-Zelle ein Überschießen der resultierenden Effektor-Funktion zu vermeiden, zum anderen die Zielzelle aus dem Kontakt mit der NK-Zelle zu entlassen.

Die in Folge der RT6-Kreuzvernetzung reduzierte RT6-Expression warf die Frage nach dem Mechanismus auf, der dem Effekt zugrunde liegt. Da bereits aus einer 60-minütigen RT6-

Kreuzvernetzung eine meßbare Reduktion der RT6-Dichte resultiert (Daten nicht gezeigt), kann ein auf der Ebene der Gentranskription, der Proteinsynthese oder des anterograden Proteintransportes agierender Mechanismus ausgeschlossen werden. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Endozytose von RT6-Antikörper-Komplexen, an die sich, wie für die Freisetzung einer der beiden Formen von CD14 von Monozyten gezeigt (Durieux et al., 1994), nach Abspaltung von Membran-Komponenten die Sekretion des betrachteten Moleküls anschließt. Da zur Kreuzvernetzung von RT6 jedoch an Plastik immobilisierte Antikörper verwendet wurden, ist eine Internalisierung von RT6-Antikörper-Komplexen als Ursache für den beobachteten Effekt sehr unwahrscheinlich. Da zudem der Zusatz von Brefeldin A die durch RT6-Kreuzvernetzung bedingte Verringerung der RT6.1-Expressionsdichte nicht inhibieren konnte (Abb. 4.3.5), kann eine endozytotische Internalisierung des Moleküls mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Aus diesen Befunden kann abgeleitet werden, daß die Reduktion der RT6-Oberflächenexpression auf die Freisetzung der Moleküle durch enzymatische Aktivität von Proteasen oder PI- bzw. GPI-spezifischen Phospholipasen zurückgeht. Durch einen solchen Regulations-Mechanismus könnte RT6, das, wie bereits erwähnt, als GPI-verankertes Molekül vermutlich eine eher lange Halbwertszeit auf der Zelloberfläche besitzt (Censullo und Davitz, 1994), schnell und effizient entfernt werden. Eine durch Zellaktivierung ausgelöste Freisetzung konnte bei verschiedenen GPI-verankerten Molekülen, wie z.B. CD16 (Bazil und Strominger, 1994) und einer auf Maus-CTL exprimierten mADPRT (Nemoto et al., 1996b), beobachtet werden und scheint somit ein allgemeines Regulationsprinzip darzustellen. Wie bereits in Abschnitt 5.2 diskutiert, könnte auf diesem Weg gebildetes, lösliches RT6 über seine enzymatische Aktivität oder seine hypothetische Rezeptor-Funktion parakrine Funktionen vermitteln.

Durch den Zusatz verschiedener Enzyminhibitoren während der RT6-Kreuzvernetzung konnte gezeigt werden, daß Serin-Proteasen maßgeblich an der Freisetzung von RT6.1 beteiligt sind (Abb. 4.3.6, 4.3.7, 4.3.8 und Tab. 4.3.2). Die Tatsache, daß Aprotinin als Inhibitor von Serin-Proteasen im Gegensatz zu AEBSF und PMSF die RT6.1-Abspaltung nicht blockieren konnte, ist vermutlich auf seine kompetitive und reversible Wirkungsweise zurückzuführen.

Darüber hinaus zeigten die Analysen, daß der RT6.1-Freisetzungsmechanismus anscheinend nicht die Aktivierung von Cystein- und Metallo-Proteasen beinhaltet (Tab. 4.3.2).

1,10-Phenanthrolin und sein membrangängiges Derivat Bathophenanthrolin, welche die von divalenten Kationen abhängige GPI-spezifische Phospholipase D hemmen (Low, 1992)

konnten die durch RT6-Kreuzvernetzung induzierte Freisetzung des Moleküls nicht inhibieren; die Beteiligung eines Enzyms vom Typ der Phospholipase D (PLD) kann somit ausgeschlossen werden. Die eingesetzten Inhibitoren haben keinen Einfluß auf PI- oder GPI-spezifische Enzyme vom Typ der Phospholipase C (Low, 1990). Diese Enzyme können, wie in Abschnitt 5.2 diskutiert, ebenfalls GPI-Anker spalten und wurden aus verschiedenen Säugetiergeweben isoliert. Eine Beteiligung endogener Phospholipasen vom Typ C kann daher in diesem Kontext nicht ausgeschlossen werden. In diesem Zusammenhang ist jedoch von Bedeutung, daß auf den NK-Linien 3651, 3075 und RNK-16 exprimiertes RT6.1 und RT6.2 resistent gegen Behandlung mit bakterieller PI-PLC (aus *Bacillus thuringiensis*) sind. Diese Resistenz scheint charakteristisch für auf Ratten-NK-Zellen exprimiertes RT6 zu sein, da die Inkubation frisch isolierter LEW-Milz-Zellen bei der RT6.1-positiven T-Zell-Population zu einer effizienten Abspaltung des Moleküls führt, während die RT6.1-Expression der NK-Population unbeeinflusst bleibt (Wonigeit et al., unveröffentlichte Befunde). Im Rahmen der Charakterisierung der NK-Linien zu Beginn dieser Arbeit wurden diese Ergebnisse erneut bestätigt.

Die Resistenz oder Suszeptibilität von GPI-Ankern variiert in Abhängigkeit von der Expression des verankerten Moleküls auf verschiedenen Zelltypen oder in verschiedenen Spezies. So kann z.B. Acetylcholinesterase (AChE) durch PI-PLC von Erythrozyten der Ratte, nicht aber des Menschen oder der Maus abgespalten werden (Low und Finean, 1977; Futermann et al., 1985). Zudem wurde eine partielle Resistenz von GPI-Ankern bei Thy-1 und Qa-2 nach mitogener Stimulation der Zellen beobachtet. Auf IL-2-aktivierten NK-Zellen exprimiertes, GPI-verankertes gp42 ist gegen die Abspaltung über PI-PLC vollständig resistent, während es von der Linie RNK-16 über dieses Enzym entfernt werden kann (Seaman et al., 1991). Die Ursache für diese Resistenz scheinen durch die Aktivierung induzierte Modifikationen des GPI-Ankers zu sein (Presky et al., 1990; Soloski et al., 1988). Bei AChE konnte gezeigt werden, daß der Austausch der 2-OH-Gruppe des Inositolringes durch einen als Ester gebundenen Palmitinsäurerest die PI-PLC-Resistenz des Ankers bedingt (Roberts et al., 1988). In diesem Zusammenhang könnte die auf NK-Zellen beobachtete PI-PLC-Resistenz des GPI-Ankers von RT6 als weitere Bestätigung dafür gewertet werden, daß die Expression dieses Moleküls mit der Aktivierung der Zellen einhergeht. Eine transmembranöse Verankerung von RT6 als Ursache für die beobachtete PI-PLC-Resistenz ist aufgrund der aus cDNA-Analysen abgeleiteten Aminosäuresequenz unwahrscheinlich (Koch et al., 1990a, 1990b; Haag et al., 1990a), kann aber aufgrund der vorliegenden Befunde nicht vollkommen ausgeschlossen werden.

Die Bindung des hypothetischen Liganden an RT6 könnte auf zwei Wegen in der beobachteten Freisetzung des RT6-Moleküls resultieren. Zum einen wäre es möglich, daß durch die Interaktion eine Konformationsänderung innerhalb des GPI-Ankers oder des Proteins ausgelöst wird, welche die Komponenten suszeptibel für die Spaltung durch bereits vorhandene Serin-Proteasen oder Phospholipasen vom Typ C macht. Zum anderen könnte die Bindung des Liganden Signale auslösen, die zu der Aktivierung einer endogenen Phospholipase C oder Serin-Protease führen. In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, daß die Aktivität einer von NK-Zellen exprimierten, endogenen Metalloprotease, die in Folge der Stimulation der Zellen mit Phorbol ester die transmembranöse Form von CD16 (CD16-II) durch Proteolyse von der Zelloberfläche freisetzt, durch die Protein Kinase C reguliert wird (Harrison et al. 1991). Eine *de novo*-Synthese der beteiligten Enzyme kann aufgrund der Schnelligkeit des Effekts der RT6-Kreuzvernetzung ausgeschlossen werden. Eine differenzierte enzymatische Freisetzung bestimmter Oberflächenmoleküle nach Aktivierung von endogenen Enzymen könnte wiederum durch konformationelle, aus der Ligandenbindung resultierende Änderungen erreicht werden. Bei den beteiligten Enzymen könnte es sich sowohl um membrangebundene, als auch lösliche sekretorische Proteine handeln. Es kann jedoch aufgrund der mit Brefeldin A erhaltenen Befunde (Abb. 4.3.5) ausgeschlossen werden, daß die RT6-Kreuzvernetzung die exozytotische Freisetzung der beteiligten Enzyme induziert.

Zuvor wurde auf der Basis der mit Brefeldin A durchgeführten Experimente die Hypothese aufgestellt, daß in der Linie 3651 neu synthetisiertes RT6.1 kontinuierlich an die Zelloberfläche transportiert, in die Zellmembran integriert und durch enzymatische Hydrolyse von der Zelloberfläche freigesetzt wird. Diese Modellvorstellung zugrunde legend, sollte der Zusatz bestimmter Enzyminhibitoren in einer verstärkten RT6.1-Dichte resultieren. Die RT6.1-Oberflächen-Expression der unstimulierten, ohne Antikörper kultivierten Zellen wurde jedoch durch den Zusatz der verschiedenen Inhibitoren in dem beobachteten Zeitrahmen nicht signifikant beeinflusst (Abb. 4.3.6 bis 4.3.9). Eine mögliche Ursache für diesen widersprüchlich erscheinenden Befund könnte der aufgrund der zytotoxischen Wirkung der Inhibitoren kurz gewählte Zeitrahmen (3 h) sein. Eine weitere mögliche Erklärung wäre, daß für die kontinuierliche, spontane Abspaltung von RT6.1 eine oder mehrere Klassen von Enzymen verantwortlich sind, die an der Reduktion der RT6.1-Dichte nach Kreuzvernetzung nicht beteiligt sind und durch die zugesetzten Inhibitoren nicht in ihrer enzymatischen Aktivität gehemmt werden.

Die Untersuchung von Zytopräparaten der NK-Linie 3651 zeigte, daß nach 48-stündiger RT6-Kreuzvernetzung neben der Dichte der membranständigen RT6.1-Moleküle auch die Menge an zytoplasmatischen RT6 deutlich reduziert war. (Abb. 4.3.4). Dieser Befund deutet darauf hin, daß die vor der Stimulation vorhandenen, intrazellulären RT6-Moleküle in Folge der RT6-Kreuzvernetzung entweder freigesetzt oder intrazellulär degradiert wurden. Alternativ könnte die RT6-Kreuzvernetzung auch auf Ebene der Gentranskription oder Proteinsynthese eine reduzierte RT6-Expression zur Folge haben. Die Bedeutung dieses Befundes kann jedoch anhand der vorliegenden Daten nicht geklärt werden.

## **5.5. Frühe Signaltransduktionseignisse nach Kreuzvernetzung von RT6 und mögliche Mechanismen der Signalübermittlung**

Aus den vorliegenden Befunden konnte zusammenfassend der Rückschluß gezogen werden, daß auf NK-Zellen exprimiertes RT6.1 in dem betrachteten experimentellen *in vitro*-System in der Lage war, Signale zu vermitteln, die unter anderem in der verstärkten Expression des hoch affinen IL-2R-Komplexes und einer gesteigerten Freisetzung von IFN- $\gamma$ - und TNF- $\alpha$  resultierten. Daraus kann abgeleitet werden, daß die Interaktion von RT6 mit den Antikörpern eher aktivierende als inhibierende Signale zur Folge hatte. Wie bereits dargelegt, könnte RT6 somit *in vivo* Rezeptorfunktionen besitzen und nach Bindung seines hypothetischen natürlichen Liganden die Transkription von Genen induzieren, die für die Funktion von NK-Zellen von Bedeutung sind.

Die Inkubation der NK-Linie 3075 mit exogenem NAD<sup>+</sup>, dem Substrat von RT6, führte im Gegensatz zu der RT6-Kreuzvernetzung zu einer Dämpfung der IFN- $\gamma$ -Freisetzung und hatte zudem keinen Effekt auf die CD25-Expression der NK-Zellen (siehe Abschnitt 5.7). Vor diesem Hintergrund kann davon ausgegangen werden, daß die Wechselwirkung von RT6 mit den kreuzvernetzenden Antikörpern nicht die Bindung des Substrates NAD<sup>+</sup> imitiert.

Es stellte sich nun die Frage, über welche Mechanismen RT6 nach Bindung seines hypothetischen Liganden aktivierende Signale übermitteln könnte. Die Untersuchung der frühen intrazellulären Signaltransduktionseignisse zeigte, daß die RT6-Kreuzvernetzung bei der NK-Linie 3651 und Milz-NK-Zellen die Mobilisierung intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Ionen induzierte (Abb. 4.4.1 und 4.4.2). Weiterführende Untersuchungen mit der Linie 3651 ergaben zudem, daß die RT6-vermittelte Signaltransduktion mit der verstärkten

Tyrosinphosphorylierung eines Proteins einher ging, dessen apparentes Molekulargewicht unter reduzierenden Bedingungen etwa 33 kDa betrug (Abb. 4.4.3). Die vorliegenden Befunde lassen den Rückschluß zu, daß die durch RT6 vermittelten Signale die Aktivierung von Proteintyrosinkinase und der Phospholipase C einbeziehen.

Die Mobilisierung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen konnte nur beobachtet werden, wenn die anti-RT6-Antikörper durch Sekundärantikörper kreuzvernetzt wurden. Die Aggregation von RT6 auf der Zelloberfläche scheint somit eine Voraussetzung für dessen Signalkapazität zu sein. Für mehrere GPI-verankerte Moleküle, darunter CD14 (Lund-Johansen et al., 1990), DAF (Morgan et al., 1993), CD16 (Hundt et al., 1992), Thy-1 (Millrain et al., 1992), CD67 (Lund-Johansen et al., 1993) und auf T-Zellen exprimiertes RT6 (Rigby et al., 1996b), konnte gezeigt werden, daß ihre Kreuzvernetzung auf Lymphozyten bzw. anderen hämatopoetischen Zellen zu der Protein-Tyrosin- und Serin/Threonin-Phosphorylierung intrazellulärer Proteine, der Mobilisierung von Kalziumionen, der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und der zellulären Aktivierung führt. Die molekularen Interaktionen, über die GPI-verankerte Moleküle, die weder transmembranöse, noch zytoplasmatische Domänen besitzen, derartige Signalkaskaden auslösen können, sind weitgehend unbekannt. Im Folgenden werden denkbare Mechanismen der RT6-vermittelten Signaltransduktion diskutiert.

Ein möglicher Mechanismus besteht in der direkten Interaktion von RT6 mit einem oder mehreren transmembranösen Proteinen, die, als Adaptermoleküle fungierend, Signale an das Zellinnere weiterleiten (Abb. 5.1, II). RT6 wäre in diesem Fall eine Komponente eines multimeren, aktivierenden Signaltransduktionskomplexes, der an der Regulation von NK-Zell-Funktionen beteiligt ist. Neben der Assoziation mit nur als Adaptermolekülen dienenden Proteinen wäre in einem solchen Proteinkomplex auch die Wechselwirkung zwischen RT6 und transmembranösen Rezeptoren denkbar (Abb. 5.1, III). In diesem Zusammenhang könnte RT6 kostimulatorische Signale für aktivierende NK-Rezeptoren wie MHC-Rezeptoren, NKR-P1 oder CD16 liefern. NKR-P1 und CD16 benutzen als Adaptermoleküle für ihre Signaltransduktion CD3- $\zeta$  bzw. Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ -Ketten, die ITAM-Sequenzen enthalten und nach Phosphorylierung Tyrosinkinase rekrutieren und aktivieren (Arase et al., 1997; Lanier et al., 1989; Chan et al., 1994). KARs erhalten ihre Signalkapazität durch Assoziation mit DAP-12, das ebenfalls eine ITAM-Sequenz beinhaltet (Lanier et al., 1998). Auch eine Wechselwirkung zwischen RT6 und Adhäsionsmolekülen wäre in diesem Zusammenhang denkbar. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, daß die RT6-Kreuzvernetzung auf der NK-Linie 3651 die durch NKR-P1 oder CD11a induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung signifikant steigerte (Abb. 4.4.1). Dieser Effekt konnte bei gleichzeitiger Kreuzvernetzung von RT6 und ICAM-1



nicht beobachtet werden und ist somit nicht auf die Interaktion der Antikörper mit Fc-Rezeptoren oder unspezifische Effekte zurückzuführen. Dies läßt den Rückschluß zu, daß die Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ein zentraler Bestandteil der RT6-vermittelten Signalkette ist, die zu den beobachteten Modulationen von NK-Funktionen führt.

Die Stimulation der Linie über RT6 allein hatte keinen meßbaren Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zur Folge. Im Gegensatz dazu benötigte die RT6-Kreuzvernetzung auf Milz-NK-Zellen für eine meßbare Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen keine Kostimulation durch Kreuzvernetzung von Adhäsionsmolekülen (Abb. 4.4.2). Dies könnte bedeuten, daß das hier verwendete System zur Bestimmung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nicht sensitiv genug gewesen sein könnte, um relativ geringe Änderungen zu detektieren. Es stellt sich jedoch die Frage, ob derartig geringfügige Änderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in einer vollen zellulären Aktivierung resultieren können.

Die Modulationen der zellulären Funktionen wurden ohne begleitende Kreuzvernetzung anderer Oberflächenstrukturen nach Stimulation über RT6 beobachtet. Die durch Adhäsionsmoleküle vermittelte, IL-2 induzierte Adhärenz der NK-Zellen (Vujanovic et al., 1993), könnte jedoch die für die verstärkte Gentranskription eventuell benötigten, zusätzlichen aktivierenden Signale geliefert haben. Der Einsatz an Plastik immobilisierter anti-RT6-Antikörper hätte somit zu einer gemeinsamen Aggregation von RT6 und Adhäsionsmolekülen geführt. Vor diesem Hintergrund wäre auch die eingeschränkte Signalkapazität der nicht adhären wachsenden Linie RNK-16 plausibel.

Die bei dieser Linie beobachtete Reduktion der RT6-Oberflächenexpression nach Kreuzvernetzung dieses Moleküls (Abb. 4.3.3) deutet darauf hin, daß bei der Induktion der Abspaltung von RT6 ein anderer Signalweg benutzt wird, als bei der Induktion der CD25- bzw. Zytokin-Expression.

Für die Signalkapazität verschiedener GPI-verankerter, auf T-Zellen exprimierter Proteine ist die Koexpression des TCR Voraussetzung (Schmitt-Verhulst, 1987). Daraus kann abgeleitet werden, daß in diesem Fall GPI-Proteine durch Interaktion mit dem transmembranösen TCR die Fähigkeit zur Signaltransduktion erhalten. In Abwesenheit des TCR kann nach Kreuzvernetzung dieser GPI-Proteine zwar nicht die volle Aktivierung der Zellen, aber ein Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beobachtet werden (Gunter et al., 1987). Dies impliziert, daß auf T-Zellen neben dem TCR auch andere transmembranöse Komponenten mit GPI-verankerten Molekülen interagieren können. Die bei Milz-T-Zellen nach RT6-Kreuzvernetzung ohne begleitende Stimulation über den TCR beobachtete Induktion der CD25-Expression (Tab. 4.2.2) scheint diese Annahme zu stützen.

Neben der Signalweiterleitung durch direkte Assoziation mit Adaptermolekülen oder transmembranösen Rezeptoren könnte auch eine indirekte Wechselwirkung von RT6 mit Proteintyrosinkinasen die Grundlage für seine Signalkapazitäten sein (Abb. 5.1, IV). Als Hinweis auf eine indirekte Interaktion und eine funktionelle und physikalische Assoziation *in vivo* wird von vielen Autoren die Beobachtung gewertet, daß viele GPI-verankerte Moleküle zusammen mit verschiedenen Proteintyrosinkinasen der src-Familie kopräzipitieren (Lund-Johansen, 1990, Millrain, 1992) und ihre Kreuzvernetzung in einer schnellen Phosphorylierung verschiedener intrazellulärer Substrate resultiert (Hsi et al., 1989). Die Hypothese einer funktionellen Assoziation zwischen Proteintyrosinkinasen und RT6 wird durch die Beobachtung gestützt, daß von T-Lymphozyten exprimiertes RT6.1 und RT6.2 mit fünf tyrosinphosphorylierten Proteinen kopräzipitieren, darunter  $p60^{\text{fyn}}$  und  $p56^{\text{lck}}$ , die Mitglieder der src-PTK-Familie sind (Rigby et al., 1996b).

Wie bereits erwähnt, legte die nach RT6-Kreuzvernetzung auf der NK-Linie 3651 beobachtete transiente Tyrosinphosphorylierung eines etwa 33 kDa großen Proteins (Abb. 4.4.3) die Vermutung nahe, daß auch auf NK-Zellen exprimiertes RT6 seine Signalkapazitäten über die Rekrutierung und Aktivierung von Proteintyrosinkinasen vermittelt.

Auf die Intensität einer bei etwa 55 kDa auftretenden tyrosinphosphorylierten Bande hatte die RT6-Kreuzvernetzung keinen Einfluß (Abb. 4.4.3). Es könnte sich hierbei unter anderem um die  $p56^{\text{lck}}$  oder  $p60^{\text{fyn}}$  handeln, die zusammen mit anderen Mitgliedern der src-PTK-Familie von NK-Zellen exprimiert werden (Eiseman et al., 1990). Zeitlich versetzt zu der beobachteten maximalen Bandenintensität des ~33-kDa-Proteins kam es jedoch zu einer leichten Verschiebung des apparenten Molekulargewichtes der ~55 kDa-Bande zu einer schwereren Form von etwa 60 kDa, welche die  $p60$ -Ispform der  $p56^{\text{lck}}$  repräsentieren könnte (Abb. 4.4.3). Stimulationseignisse, die in einer Aktivierung der  $p56^{\text{lck}}$  resultieren, führen zu einer Modifikation dieser PTK, die mit einer zeitlich verzögerten Verschiebung des apparenten Molekulargewichtes zu 60 kDa einher geht (Veillette et al., 1988). Um in diesem Zusammenhang eindeutige Aussagen über die Natur des beteiligten Proteins treffen zu können, bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.

Die Induktion von *de novo* tyrosinphosphorylierten Proteinen konnte nach RT6-Kreuzvernetzung nicht beobachtet werden (Abb. 4.4.3). In Anbetracht der Tatsache, daß für NK-Zellen, im Vergleich zu T-Zellen, eine hohe basale Tyrosinphosphorylierung charakteristisch ist, die vermutlich die Grundlage für die Reaktivität dieser Zellen bildet (Vicar et al., 1996), ist dieser Befund jedoch plausibel. Ein komplexes Bandenmuster

tyrosinphosphorylierter Proteine konnte auch bei den Extrakten der Linie 3651 nach geringfügiger Verlängerung der Autoradiographie (ca. 3 min) beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

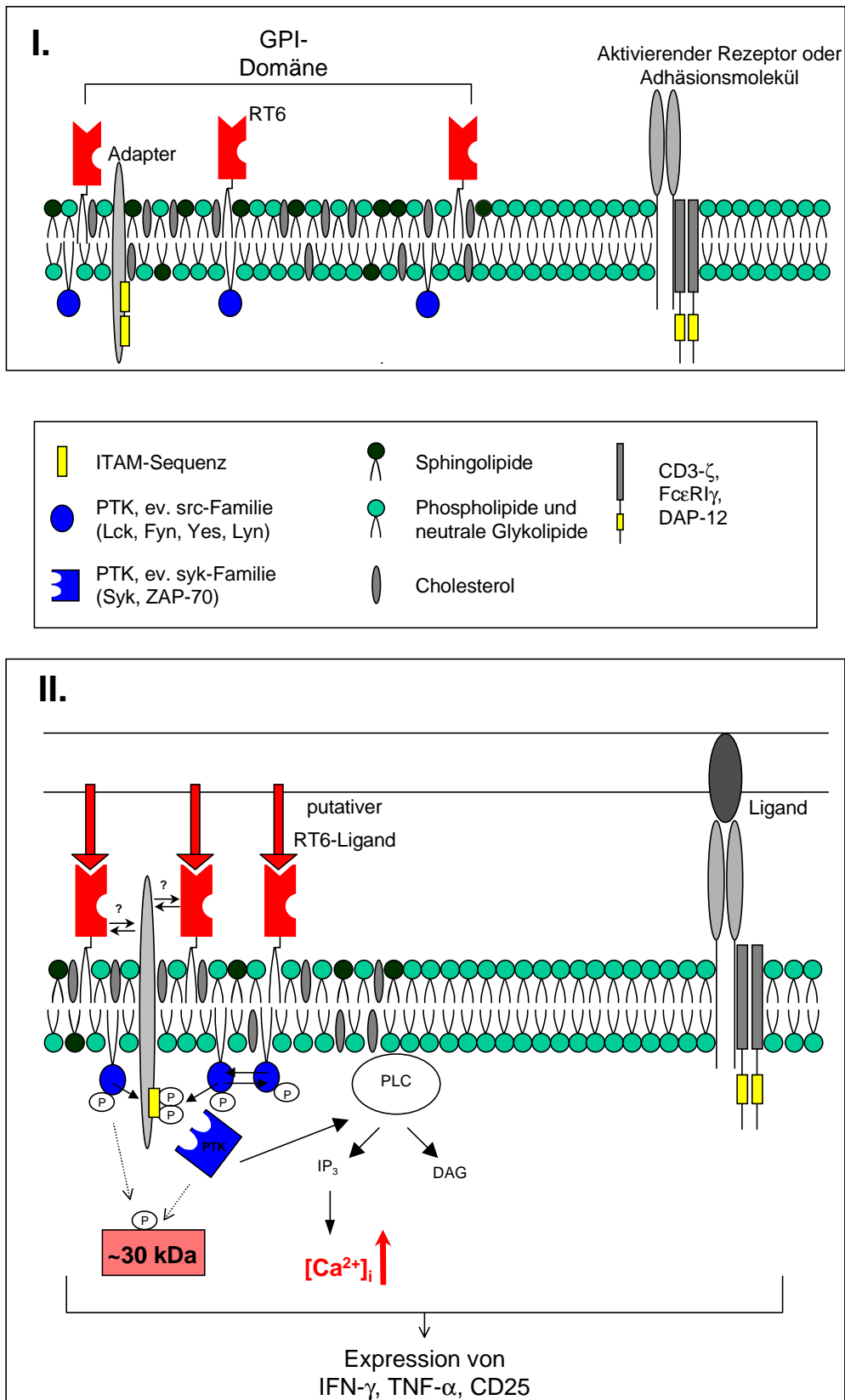
Die Simulation der Zellen mit PMA (Aktivator der PKC) und Ionomycin (Kalziumionophor) für 15 min hatte eine Verstärkung der Intensität der ~60 kDa-Bande zur Folge, ob gleichzeitig eine Verschiebung des Molekulargewichtes stattfand, konnte in diesem Zusammenhang nicht eindeutig geklärt werden (Abb. 4.4.3, B). Auf die Intensität der bei etwa 33 kDa gelegenen Bande hatte die Inkubation der Zellen mit PMA und Ionomycin keinen signifikanten Einfluß. Dies deutet darauf hin, daß die PKC nicht an dem RT6-vermittelten Signalweg beteiligt ist.

Die Voraussetzung für die indirekte Wechselwirkung GPI-verankerter Moleküle mit intrazellulären Proteinen scheint deren präferentielle Lokalisation in bestimmten, als Lipidflöße („rafts“, oder: DRMs, DIGs, GEMs, DIMs) bezeichneten Membran-Mikrodomänen zu sein (Abb. 5.1, I). An diese Domänen, die besonders reich an Sphingolipiden und Cholesterol sind (Horejsi, et al., 1999), assoziieren über ungesättigte Fettsäuren, die kovalent an ihre N-Termini gebunden sind, zytoplasmatische Proteine, darunter G-Proteine und Proteintyrosinkinasen der src-Familie (Zlatkine, et al., 1997). Diese Assoziation könnte die Signalkapazitäten GPI-verankerter Moleküle erklären. Die Fettsäureketten von GPI-Ankern sind lang genug, um die zytoplasmatische Seite der Lipid-Doppelschicht zu erreichen und dort direkt mit aliphatischen Ketten zytoplasmatischer Moleküle zu interagieren. Wahrscheinlicher ist jedoch, daß die Interaktion eher indirekter Natur ist. Eine aktuelle Hypothese geht davon aus, daß der erste Schritt im Prozeß der Signalübermittlung die aus der Bindung des Liganden resultierende Aggregation des GPI-verankerten Proteins auf der Zellmembran ist (Abb. 5.1, IV). Diese Situation führt zu der Neuverteilung und Aggregation der assoziierten Proteintyrosinkinasen, was deren gegenseitige Phosphorylierung und Aktivierung und damit eine Signalkaskade zur Folge hat (Horejsi et al., 1999). Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte antikörpervermittelte RT6-Kreuzvernetzung hatte die Aggregation von RT6 zur Folge und stellte somit ein geeignetes *in vitro* Modellsystem für die Untersuchung der aus der Bindung des putativen Liganden resultierenden, zellulären Ereignisse dar.

Die Kreuzvernetzung von GPI-Proteinen auf der Zelloberfläche bzw. die Bindung ihres natürlichen Liganden könnte auch zu der Verschmelzung mehrerer GPI-Domänen führen und wiederum über die resultierende Klusterbildung assoziierter Proteintyrosinkinasen der src-

Familie die Zellaktivierung induzieren (Simons et al., 1997). Auch diese Situation wäre durch die RT6-Kreuzvernetzung imitiert worden.

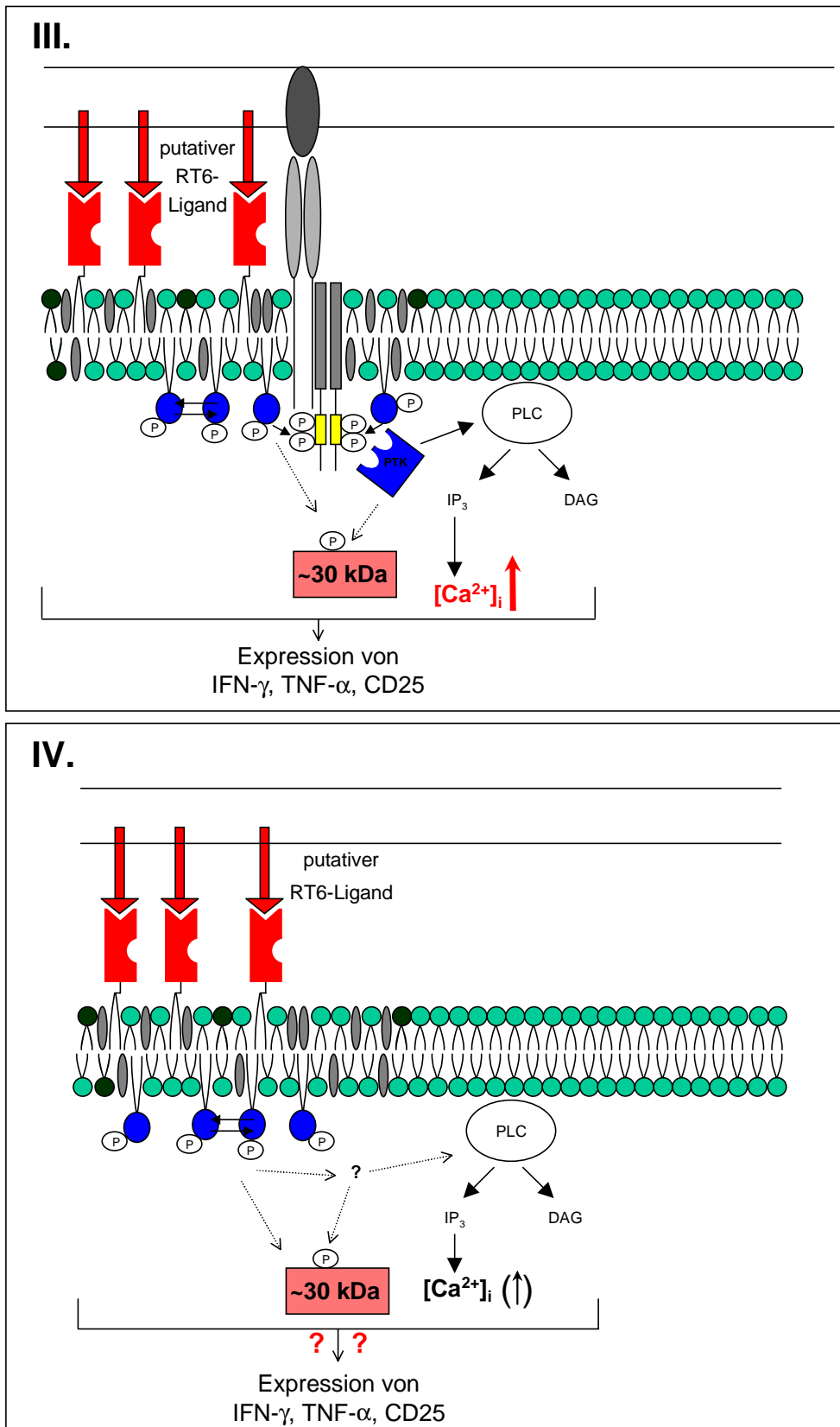
Nach Kreuzvernetzung bestimmter GPI-verankerter Moleküle (z.B. CD73, Qa-2) über immobilisierte Antikörper konnten keine aktivierenden Effekte beobachtet werden, während bei der Verwendung der Antikörper in löslicher Form eine Aktivierung der Zellen resultierte (Bamezai et al., 1989; Massaia et al., 1990). Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, daß der Signaltransduktion die Endozytose der GPI-verankerten Rezeptoren vorangeht, der ein intrazellulärer Abbau des GPI-Ankers unter Freisetzung von sekundären Botenstoffen, wie z.B. Diacylglycerin (DAG), folgt. Gegen diese Annahme spricht jedoch, daß die nach Kreuzvernetzung die nach Kreuzvernetzung von RT6 beobachtete  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung innerhalb von Sekunden abläuft und somit nicht durch die relativ langsame Endozytose ausgelöst worden sein kann. Wie bereits diskutiert (siehe Abschnitt 5.4), kann zudem, basierend auf den erhobenen Befunden, eine die Signaltransduktion auslösende Endozytose von RT6-Antikörper-Komplexen ausgeschlossen werden.



**Abb. 5.1 Hypothetische Signalübertragung durch RT6 nach Ligandenbindung**

**I.** Ruhezustand der NK-Zelle

**II.** Bindung des hypothetischen Liganden an RT6; Signaltransduktion durch Interaktion zwischen RT6 und einem ITAM-Sequenzen beinhaltenden Adaptermolekül



**Abb. 5.1 Hypothetische Signalübertragung durch RT6 nach Ligandenbindung**

- III.** Bindung des hypothetischen Liganden an RT6; Signaltransduktion durch Interaktion zwischen RT6 und einem aktivierenden Rezeptor, der mit ITAM-Sequenzen enthaltenden Ketten assoziiert ist
- IV.** Bindung des hypothetischen Liganden an RT6; Rekrutierung von indirekt assoziierten PTKs

## 5.6. Beteiligung Fc-Rezeptor-vermittelter Effekte

NK-Zellen exprimieren den schwach affinen Fc-Rezeptor Fc $\gamma$ RIII (CD16), über den mit Antikörper beladene Zielzellen erkannt werden. Für Subpopulationen humaner NK-Zellen konnte zudem die Expression von Fc $\gamma$ RII (CD32) gezeigt werden (Metes et al., 1998). Die Erkennung der Zielzelle führt in diesem Kontext zu der Aktivierung der NK-Zelle und setzt den Prozeß der Antikörper-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC) in Gang, an dessen Ende die Lyse der Zielzelle steht. Die Wechselwirkung der von NK-Zellen exprimierten Fc $\gamma$ RIII-Rezeptoren (CD16) mit Antikörper-beladenen Zielzellen, Immunkomplexen oder anti-CD16-Antikörpern induziert in humanen NK-Zellen die Transkription des CD25-Gens und die Expression der IL-2R $\alpha$ -Kette und führt zu einer verstärkten Freisetzung von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  (Anegon et al., 1988).

Eine Möglichkeit, die unerwünschte Bindung der Antikörper an Fc-Rezeptoren zu verhindern, ist der Einsatz den Rezeptor blockierender Antikörper. Für die Ratte sind bislang jedoch keine derartigen Antikörper gegen CD16 kommerziell erhältlich. Um im Rahmen der antikörpervermittelten Kreuzvernetzung von RT6 Fc-Rezeptor-vermittelte Effekte auf die untersuchten NK-Funktionen so weit wie möglich einschätzen zu können, wurden in allen Experimenten Isotyp-Kontrollansätze mitgeführt. In diesen Ansätzen wurden die NK-Zellen in Gegenwart von monoklonalen Ratten-Antikörpern (IgG1 bzw. IgG2c) kultiviert, deren zugehörige Epitope nicht auf den betrachteten NK-Zellen exprimiert wurden.

Die gegen RT6 gerichteten Antikörper und die Kontrollantikörper wurden an Plastik immobilisiert eingesetzt. Auf diesem Weg konnten eventuelle, durch gelöste Antikörper vermittelte Effekte auf die NK-Zellen eingegrenzt werden. Die unspezifische Adhäsion der Antikörper an Plastikoberflächen erfolgt bevorzugt über ihren Fc-Teil und macht diesen dadurch für Fc-Rezeptoren unzugänglich. Die dennoch denkbaren Interaktionen zwischen den eingesetzten Antikörpern und den Fc-Rezeptoren der NK-Zellen werden im Folgenden diskutiert.

### 1. Interaktion zwischen an NK-Zellen gebundenem anti-RT6-Antikörper und CD16

Es muß berücksichtigt werden, daß sich im Verlauf der Stimulation immobilisierte Antikörper von der Plastikoberfläche lösen und dann über ihren Fab-Teil spezifisch an auf NK-Zellen exprimiertes RT6 binden konnten. Die Aktivierung einer NK-Zelle durch Fc-Rezeptor-vermittelte Bindung eines RT6.1-Antikörpers, der über seinen Fab-Teil an eine andere NK-

Zelle gebunden ist (ADCC), kann durch die Isotyp-Kontrollantikörper nicht imitiert werden, da deren zugehöriges Epitop nicht auf den NK-Zellen exprimiert wird.

Die Reaktion von NK-Zellen gegen normale autologe Zellen wird jedoch durch die Erkennung von Klasse-I-MHC-Antigenen des Individuums über inhibierende MHC-Rezeptoren verhindert („missing-self“-Hypothese, Ljunggren und Kärre, 1990). Demzufolge führt die Erkennung eigener MHC-Moleküle auf einer NK-Zelle derselben Linie bzw. desselben Ratten-Inzuchtstammes bei der potentiellen Effektor-Zelle dazu, daß über den Fc-Rezeptor-vermittelte aktivierende Signale gestoppt werden bzw. nicht zustande kommen.

## 2. „simulierte ADCC“:

Es ist nicht auszuschließen, daß einige RT6-Antikörper über ihren Fab-Teil an die Plastikoberflächen gebunden hatten. Aus dieser Situation könnte eine Interaktion mit Fc-Rezeptoren der NK-Zellen resultieren, die der Erkennung mit Antikörper beladener Zielzellen ähnelt („simulierte ADCC“) und daher Funktionsänderungen induzieren könnte, die *in vivo* im Rahmen der ADCC ablaufen. Eventuelle, aus dieser Situation resultierende Fc-Rezeptor-vermittelte Effekte konnten jedoch durch den Einsatz immobilisierter Isotyp-Kontrollantikörper eingeschätzt werden.

## 3. Interaktion zwischen CD16 und monomeren Antikörpern oder Immunkomplexen

Freie, monomere Immunglobuline binden mit äußerst geringer Affinität an Fc-Rezeptoren. Vermutlich werden erst durch Bindung der Antikörper an ihr Epitop Konformationsänderungen im Fc-Teil ausgelöst, die dann eine feste Bindung an Fc-Rezeptoren und die Übermittlung aktivierender Signale ermöglichen. Freie Antikörper konnten somit in dem verwendeten experimentellen System nicht zu der Aktivierung von NK-Zellen führen. Zudem konnte die Bindung freier Antikörper durch die Isotyp-Kontrollantikörper imitiert und anhand der in jeder FACS-Färbung mitgeführten G $\alpha$ R-FITC-Kontrolle (Zellen der Isotyp- bzw. Negativ-Kontrollansätze + G $\alpha$ R-FITC) überprüft werden. Die G $\alpha$ R-FITC-Kontrollen der Kontrollansätze waren jedoch, ebenso wie die bei der Färbung von Zytopräparaten mitgeführten Kontrollen (Zellen der Isotyp- bzw. Negativ-Kontrollansätze + G $\alpha$ R-POX, Abb. 4.3.4) in jedem Experiment negativ. Es wäre möglich, daß der gegen Ratten-Immunglobulin gerichtete Sekundärantikörper (G $\alpha$ R) einen an den Rezeptor gebundenen Fc-Teil aufgrund sterischer Behinderung oder Veränderung der Konformation des Proteins nicht mehr erkennen kann. In Anbetracht der Tatsache, daß es sich bei G $\alpha$ R nicht um einen monoklonalen Antikörper, sondern um ein Serum handelt, das eine Vielzahl



verschiedener Epitope auf Fc-Teilen von Ratten-Antikörpern erkennt, ist diese Situation jedoch unwahrscheinlich.

Immunkomplexe resultieren aus der Interaktion zwischen einem multivalenten Antigen mit spezifischen, divalenten Antikörpern. Da monoklonale Antikörper verwendet wurden, die somit nur ein Epitop auf löslichem RT6 erkennen, konnte die Bildung von großen, vernetzten RT6-Antikörper-Komplexen im Kulturüberstand der Zellen und damit eine Aktivierung der NK-Zellen über Immunkomplexe ausgeschlossen werden.

Im Rahmen der Untersuchungen zu den Effekten der RT6-Kreuzvernetzung auf die Expression von CD25 waren bei den untersuchten Zellen die Größe der CD25-positiven Population und die CD25-Dichte der Gesamtpopulation der Isotyp- und Negativ-Kontrollansätze zu jedem Zeitpunkt der Stimulation vergleichbar (Tab. 4.2.1 und 4.2.2). Daraus kann abgeleitet werden, daß die Situation der „simulierten ADCC“ sowie die Interaktion von freien Antikörpern mit dem Fc $\gamma$ RIII keinen signifikanten Einfluß auf die CD25-Expression der NK-Zellen hatten. Der Großteil der T-Zellen exprimiert keine Fc-Rezeptoren. Nur eine kleine Subpopulation trägt Fc $\gamma$ RIII auf der Oberfläche, der wie Fc $\gamma$ RIII IgG mit niedriger Affinität bindet (Fc $\gamma$ RIII; Fc $\gamma$ RII: Kd >10<sup>-7</sup>M, Abbas, 1996). Da jedoch Isotyp- und Negativ-Kontrollansätze vergleichbar waren, ging auch die nach RT6-Kreuzvernetzung beobachtete Expansion der CD25-positiven T-Zell-Population auf die spezifische Interaktion zwischen Antikörper und RT6.1 zurück. Im Rahmen der RT-PCR-Analyse der CD25-Expression der Linie 3651 waren die CD25-Banden der Isotyp-Kontrollen etwas stärker als die der Negativ-Kontrollen (Abb. 4.2.4 und Tab. 4.2.3). Da jedoch die Intensitäten der Kompetitor-Banden aller Kontrollansätze vergleichbar waren und somit keine signifikante Verdrängung der Kompetitormoleküle durch CD25-cDNA aus der PCR-Reaktion stattgefunden hatte, handelte es sich vermutlich um eine Schwankung innerhalb der Fehlergrenzen der Analyse.

Die Inkubation der NK- bzw. T-Zellen mit den Isotyp-Kontrollantikörpern hatte keinen signifikanten Einfluß auf die Freisetzung von IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$ ; die Differenzen der Zytokin-Konzentrationen in den Überständen von Isotyp- und Negativ-Kontrollansätzen bewegten sich innerhalb der Fehlergrenzen (Tab. 4.2.4). Eine Beteiligung Fc-Rezeptor-vermittelter Effekte an der nach RT6-Kreuzvernetzung verstärkten Freisetzung dieser Zytokine ist daher unwahrscheinlich. Auf mRNA-Ebene führte in einem Experiment die Inkubation der Linie 3651 mit dem Isotyp-Kontrollantikörper zu einer im Vergleich zu der Negativ-Kontrolle leicht verstärkten IFN- $\gamma$ -mRNA-Synthese. Da dieser Effekt nur einmal

beobachtet wurde, erscheint auch in diesem Zusammenhang die Beteiligung Fc-Rezeptor-vermittelter Effekte unwahrscheinlich.

Die Isotyp-Kontrollantikörper konnten die Freisetzung von RT6 nicht induzieren (Tab. 4.3.1); somit geht auch die auf NK- und T-Zellen beobachtete Herabregulation von RT6.1 auf die RT6-Kreuzvernetzung zurück und ist nicht Fc-Rezeptor-vermittelt.

## **5.7. Bedeutung der enzymatischen Aktivität von RT6 für die Funktion von NK-Zellen**

In einer weiteren Gruppe von Experimenten wurde der Frage nachgegangen, ob durch die enzymatische Aktivität von RT6 NK-Zell-Funktionen moduliert werden. Einen indirekten Zugang zu dieser Frage bildete die Untersuchung der Effekte, die das Substrat von RT6, NAD<sup>+</sup>, *in vitro* auf die Effektor-Funktionen der Linie 3075 und RNK-16 hat.

Wie bereits erwähnt, ist die NK-Linie 3075 im Hinblick auf NK-Funktionen, Oberflächenphänotyp und RT6-Expression mit der NK-Linie 3651 gleichzusetzen.

Die Analysen zeigten, daß die Inkubation der NK-Linie 3075 mit NAD<sup>+</sup> eine drastisch verringerte Freisetzung von IFN- $\gamma$  zur Folge hatte (Abb. 4.5.1). Die bei der Linie RNK-16 durch IL-2 induzierte IFN- $\gamma$ -Freisetzung führte nur zu relativ geringen Konzentrationen des Zytokins im Überstand dieser Linie (Abb. 4.5.1). Die Beurteilung der Signifikanz des beobachteten dämpfenden Effektes von NAD<sup>+</sup> ist daher bei dieser NK-Linie schwierig.

Das proliferative Verhalten beider Linien und die Oberflächen-Expression von RT6, des IL-2-Rezeptors, sowie anderer Moleküle (NKR-P1, CD11a, CD18, ICAM-1, CD28, CD44, CD2, CD43) wurden durch NAD<sup>+</sup> nicht beeinflußt (Daten nicht gezeigt).

Da eine zytotoxische Wirkung von NAD<sup>+</sup> durch mikroskopische und durchflußzytometrische Analysen ausgeschlossen und ein Effekt auf die Proliferation nicht beobachtet werden konnte, kann die durch NAD<sup>+</sup> induzierte verminderte Freisetzung von IFN- $\gamma$  nicht auf eine Reduktion der Zelldichte zurückgehen.

In diesem Zusammenhang ist interessant, daß in der Arbeitsgruppe durchgeführte Untersuchungen bereits gezeigt hatten, daß exogenes NAD<sup>+</sup> die lytische Aktivität von Ratten-NK-Zellen reduziert (Wonigeit et al., unveröffentlichte Ergebnisse).

Im Gegensatz zu den NK-Funktionen dämpfenden Effekten von NAD<sup>+</sup> vermittelt die RT6-Kreuzvernetzung aktivierende Signale. Da demnach in diesen beiden experimentellen *in vitro*

Systemen unterschiedliche Signalwege beschriftet werden, kann der Rückschluß gezogen werden, daß die bei der RT6-Kreuzvernetzung eingesetzten anti-RT6-Antikörper nicht die Bindung von  $\text{NAD}^+$  imitieren.

Auf den NK-Linien 3651, 3075 und RNK-16 sowie auf LEW-Milz-NK-Zellen exprimiertes RT6 ist gegen PI-PLC-vermittelte Abspaltung resistent (siehe Abschnitt 5.3). Es war daher nicht möglich, durch Behandlung der NK-Zellen mit dem Enzym RT6-negative Populationen zu generieren, anhand derer ein direkter Bezug zwischen den beobachteten Effekten von  $\text{NAD}^+$  und RT6 hätte hergestellt werden können. Mittels Komplement-vermittelter Lyse der RT6-positiven Population wurde versucht, die bei den Linien in minimaler Anzahl vorhandenen RT6-negativen Zellen *in vitro* zu expandieren. Der Versuch scheiterte jedoch daran, daß entweder alle Zellen in Folge dieser Behandlung abstarben oder die Expansion der überlebenden RT6-negativen Zellen mit der Expression von RT6 einher ging. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß die beobachtete Wirkung von  $\text{NAD}^+$  zum Teil auf die Aktivität anderer  $\text{NAD}^+$  umsetzender Enzyme als RT6 zurückgeht. Da alle Zellen der betrachteten NK-Linien RT6 in sehr hoher Dichte auf der Zellmembran exprimieren, ist eine fehlende Beteiligung von RT6 an dem beobachteten Effekt jedoch unwahrscheinlich.

Im Folgenden wird diskutiert, wie RT6 an der beobachteten Dämpfung der  $\text{IFN-}\gamma$ -Freisetzung beteiligt sein könnte.

Aufgrund der enzymatischen Eigenschaften von RT6 kann der beobachtete Effekt nicht auf die Ribosylierung anderer Oberflächenmoleküle zurückgehen; die Übertragung von ADPR-Gruppen auf exogene Akzeptor-Proteine konnte bislang weder bei RT6.1, noch RT6.2 nachgewiesen werden (Hara et al., 1996; Haag et al., 1995; Maehama et al., 1995 und 1996, Rigby, 1996a, Moss, 1997). Die Fähigkeit zur ADP-Ribosylierung anderer Proteine scheint an die an Position 207 der RT6-Aminosäuresequenz lokalisierte Aminosäure Glutamat gebunden zu sein. Ratten-RT6.1 und RT6.2 besitzen an dieser Stelle Glutamin, die Maus-Rt6-Enzyme, die typische mADPRT sind, hingegen Glutamat (Rigby et al., 1996a, Moss et al., 1997; Koch-Nolte et al., 1996). Der gegenseitige Austausch der Aminosäuren führt zum Verlust bzw. Erwerb der mADPRT-Aktivität der resultierenden Enzyme (Maehama et al., 1996; Hara et al., 1996).

RT6.2 besitzt jedoch, neben einer NADase-Aktivität ( $K_m \sim 25 \mu\text{M}$ , Moss et al., 1997), die Fähigkeit zur Auto-Ribosylierung (Haag et al., 1995; Rigby et al., 1996a). Eine derartige Aktivität wird für RT6.1 von verschiedenen Arbeitsgruppen kontrovers diskutiert (Haag et al., 1995; Maehama, et al., 1995). Die funktionelle Bedeutung dieser Automodifikation ist unbekannt. Die beobachtete Dämpfung der  $\text{IFN-}\gamma$ -Freisetzung nach Zusatz von  $\text{NAD}^+$

zugrunde legend, müßte die Automodifikation von RT6 negative Signale übermitteln. Derartige inhibierende Signale könnten z.B. aus der Aktivierung von Phosphatasen und der nachfolgenden Dephosphorylierung von Tyrosinkinase und ihrer Substrate resultieren (Abb. 5.3, I). In diesem Zusammenhang ist interessant, daß die untersuchten NK-Zellen CD45 exprimieren (Tab. 4.1), das Signaltransduktionsprozesse negativ durch Dephosphorylierung z.B. der Phospholipase C $\gamma$ 1 und der MAP-2K Kinase beeinflussen kann (Pollack et al., 1991). Eine direkte Interaktion mit zytoplasmatischen Proteinen ist aufgrund der GPI-Verankerung von RT6 nicht möglich. Die Auto-Ribosylierung von RT6 könnte jedoch zu Konformationsänderungen führen, die seine Assoziation mit hypothetischen Adaptermolekülen (siehe Abschnitt 5. 5) beeinflussen und auf diesem Weg die negative Signalkette auslösen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, daß die Bindung eines bislang unidentifizierten, natürlichen Liganden an RT6 *in vivo* zu der Aktivierung von NK-Zellen beiträgt und unter anderem in einer verstärkten IFN- $\gamma$ -Freisetzung resultiert (Abschnitt 5.5). *In vivo* führt die Aktivierung von NK-Zellen neben einer gesteigerten Zytokin-Freisetzung und Expression bestimmter Oberflächenmoleküle auch zu der effizienten Lyse von Zielzellen. Eine Folge ist die lokale Erhöhung der NAD<sup>+</sup>-Konzentration im extrazellulären Raum bzw. im Bereich der zwischen Effektor- und Zielzelle gebildeten immunologischen Synapse, durch Freisetzung von intrazellulärem NAD<sup>+</sup> aus den lysierten Zellen. Während im Inneren von Zellen NAD<sup>+</sup>-Konzentrationen im Bereich von 100  $\mu$ M vorkommen (Apsimon et al., 1995) sind die extrazellulären NAD<sup>+</sup>-Konzentrationen unter normalen Bedingungen niedrig (in Mensch, Maus und Ratte: ~0,15–0,29  $\mu$ M, Kim et al., 1993). Somit könnte eine lokale Erhöhung der extrazellulären NAD<sup>+</sup>-Konzentration der NK-Zelle signalisieren, daß die Zielzelle erfolgreich lysiert wurde. Im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus´ wäre es denkbar, daß dieses Signal zu der Dämpfung von NK-Funktionen führt und so ein Überschießen der zytotoxischen Aktivität bzw. der Zytokin-Produktion verhindert. NK-Zellen sind über die Produktion von Zytokinen, darunter IFN- $\gamma$ , an der Aktivierung entzündlicher Immunreaktionen und an der Regulation der spezifischen T- und B-Zell-Antworten beteiligt. Es ist daher von entscheidender Bedeutung, daß diese von NK-Zellen vermittelten Funktionen reguliert werden. Neben den aktivierenden Signalen müssen somit auch die NK-Aktivität dämpfende Mechanismen existieren. RT6 könnte über seine enzymatische Aktivität an einem solchen negativen Feedback-Mechanismus beteiligt sein. Möglich ist zudem, daß über die Auto-Ribosylierung von RT6 seine Signalkapazitäten beeinflußt und auf diesem Weg die RT6-vermittelte Übertragung von aktivierenden Signalen unterbunden oder gedämpft wird. In

diesem Kontext wäre es, wie bereits erwähnt, denkbar, daß die Modifikation zu Änderungen der Proteinkonformation führt, welche die Affinität der Ligandenbindung verringern oder die Assoziation von RT6 mit anderen Komponenten eines multimeren Signaltransduktionskomplexes (siehe Abschnitt 5.5) unterbinden (Abb. 5.3, II). Vor diesem Hintergrund wäre es interessant, ob der Zusatz von  $\text{NAD}^+$  die beobachteten Signalkapazitäten von RT6 auf NK-Zellen und CTL moduliert.

Die Hypothese eines durch die enzymatische Aktivität von RT6 vermittelten negativen Feedback-Mechanismus im Anschluß an die Interaktion zwischen RT6 und seinem putativen Liganden wird zudem durch die Beobachtung gestützt, daß die Inkubation von T-Zellen mit freiem anti-RT6-Antikörper in einer verstärkten Auto-Ribosylierung von RT6 resultierte (Rigby et al., 1996a).

Die Automodifikation von RT6 ist durch die enzymatische Wirkung von ADP-Ribosyl-Hydrolasen reversibel, die bereits aus verschiedenen Rattengeweben, darunter der Milz, aufgereinigt werden konnten (Moss et al., 1992). Durch ein sich einstellendes Gleichgewicht zwischen Ribosylierung und Hydrolyse könnte eine Feinabstimmung der Signale erreicht werden (Abb. 5.3, III).

In diesem Zusammenhang ist auch interessant, daß die enzymatische Aktivität von mADPRT in Abhängigkeit von der  $\text{NAD}^+$ -Konzentration durch Auto-Ribosylierung reguliert wird. So konnte für ART5 der Maus gezeigt werden, daß bei relativ hohen  $\text{NAD}^+$ -Konzentrationen (1 mM) seine Glykohydrolase-Aktivität infolge Auto-Ribosylierung abnimmt, während begleitend die Transferase-Aktivität steigt (Weng et al., 1999). Bei niedrigeren  $\text{NAD}^+$ -Konzentrationen (10  $\mu\text{M}$ ) überwiegt die NADase-Aktivität. Angewandt auf das Modell eines durch RT6-vermittelten Feedback-Mechanismus' würden aus der Lyse von Zielzellen resultierende hohe lokale extrazelluläre  $\text{NAD}^+$ -Konzentrationen die Auto-Ribosyltransferase-Aktivität von RT6 stimulieren und damit die hypothetische Weiterleitung inhibierender Signale verstärken. Niedrige extrazelluläre  $\text{NAD}^+$ -Konzentrationen würden das Gleichgewicht in Richtung der NADase-Aktivität verschieben, die dazu beitragen könnte, die  $\text{NAD}^+$ -Konzentrationen niedrig zu halten. Die Stärke der dämpfenden Signale könnte auf diesem Weg in Abhängigkeit von der Effizienz der zytolytischen Aktivität der NK-Zellen bzw. der lokalen entzündlichen Immunantwort moduliert werden (Abb. 5.3, IV).

Die Voraussetzung für einen derartigen Feedback-Mechanismus ist eine strikte Regulation der extrazellulären  $\text{NAD}^+$ -Konzentration, die z.B. durch die enzymatische Aktivität extrazellulärer  $\text{NAD}^+$ -Glykohydrolasen erreicht werden könnte. Tatsächlich werden, neben

RT6, auf vielen Zelltypen Enzyme mit NADase-Aktivität exprimiert (Kim et al., 1988; Muller-Steffner et al., 1993).

Die Umsetzung von  $\text{NAD}^+$  durch RT6 führt zu der Freisetzung von Nicotinamid, das ein effizienter Inhibitor von ART ist. Demnach könnte die Automodifikation von RT6 zudem über das Endprodukt Nicotinamid in Abhängigkeit von der extrazellulären  $\text{NAD}^+$ -Konzentration reguliert werden.

Der Vorteil einer solchen an der Zelloberfläche stattfindenden, posttranslationalen Regulation liegt neben der Möglichkeit einer Feinabstimmung über Substratverfügbarkeit und korrespondierende, die gegenläufige Reaktion katalysierende Enzyme auch in der Schnelligkeit, mit der auf physiologische Änderungen in der extrazellulären Umgebung reagiert werden kann.

Die Tatsache, daß der dämpfende Effekt von  $\text{NAD}^+$  bei der RT6.1-exprimierenden NK-Linie 3075 beobachtet werden konnte, scheint die Ergebnisse von Arbeitsgruppen, die RT6.1 eine Auto-Ribosyltransferase-Aktivität zuschreiben, zu unterstützen.

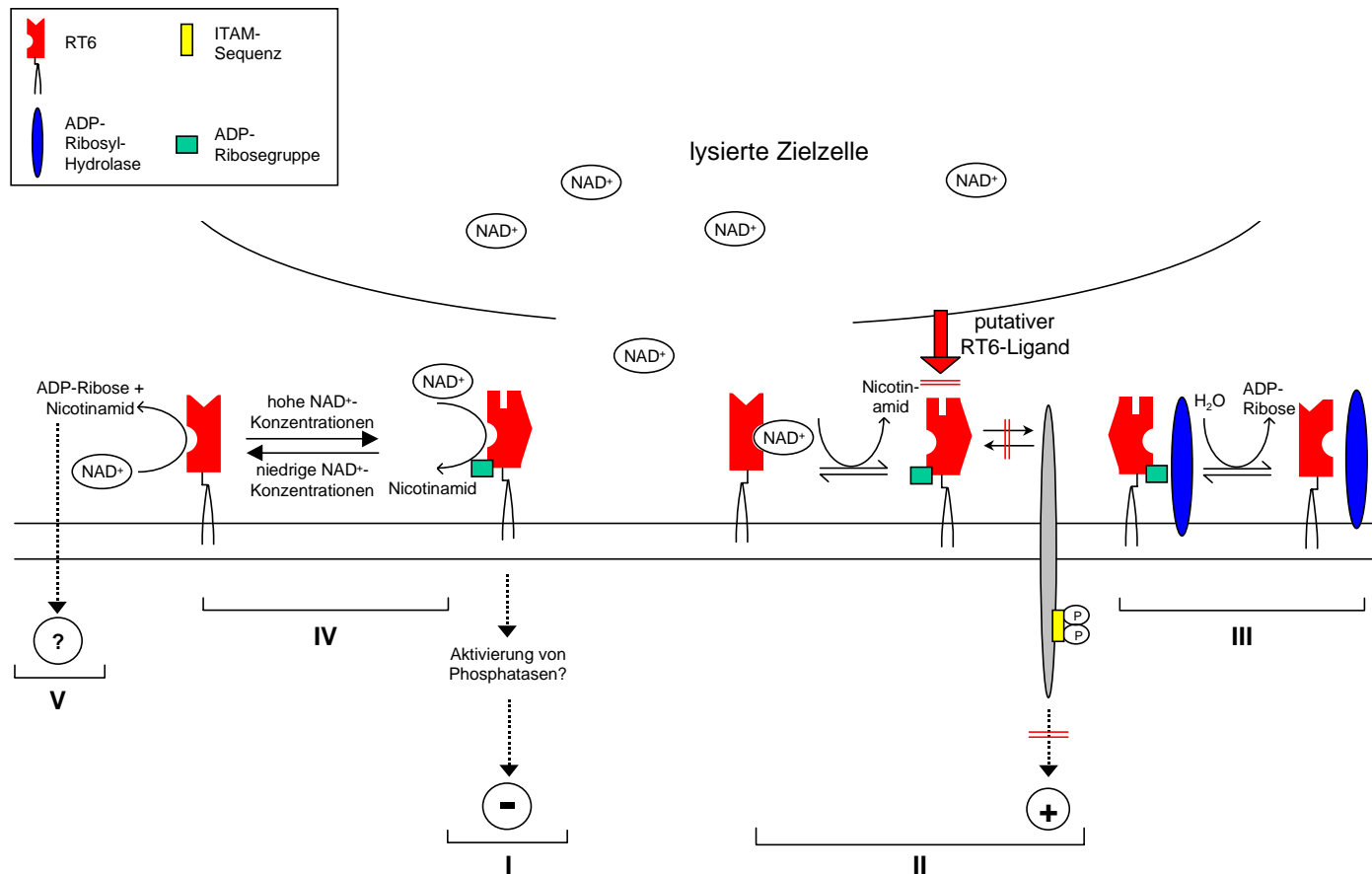
Weiterführende Untersuchungen zu einer eventuellen Automodifikation von RT6 nach Zusatz von  $\text{NAD}^+$ , z.B. unter Einsatz von radioaktiv markiertem  $[\text{}^{32}\text{P}]\text{NAD}^+$  und der sich anschließenden Analyse von Proteinextrakten mittels Gelelektrophorese und Autoradiographie, wären in diesem Zusammenhang von Interesse.

An dem beobachteten, die Freisetzung von  $\text{IFN-}\gamma$  dämpfenden Effekt von  $\text{NAD}^+$  können intrazelluläre  $\text{NAD}^+$ -umsetzende Enzyme, wie z.B. die Poly-ADP-Ribosyl-Transferase (PARP), nicht beteiligt sein, da extrazelluläres  $\text{NAD}^+$  die Zellmembran nicht passieren kann. Es wäre jedoch denkbar, daß aus dem Abbau von  $\text{NAD}^+$  entstehende membrangängige Metabolite, wie z.B. Nicotinamid und ADP-Ribose, NK-Funktionen beeinflussen (Cervantes-Laurean et al., 1993; Olsson et al., 1993) (Abb. 5.3, V).

Ein Zellfunktionen dämpfender Effekt von  $\text{NAD}^+$  konnte bereits bei CTL der Maus beobachtet werden und wird in diesem Fall durch die enzymatische Aktivität der auf der Zelloberfläche exprimierten mADPRT ART1 vermittelt (Wang et al., 1994; Okamoto et al., 1998). Über ADP-Ribosylierung verschiedener Korezeptoren des TCR und eines die Aktivität der Tyrosinkinase  $\text{p56}^{\text{lck}}$  regulierenden Proteins (p40) werden durch dieses Ektoenzym zentrale Zellfunktionen wie Zytotoxizität, Proliferation und die Adhäsion von Zielzellen reguliert (Wang et al., 1996; Nemoto et al., 1996a, Liu und Dennert, 1999). Voraussetzung für die beobachtete Suppression der  $\text{p56}^{\text{lck}}$ -Aktivität sind relativ hohe  $\text{NAD}^+$ -Konzentrationen ( $\geq 100 \mu\text{M}$ ). Der Literatur war jedoch nicht zu entnehmen, ob Ratten-NK-Zellen neben RT6

auch andere Mitglieder der Familie der mADPRT exprimieren, die an den im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Effekten von  $\text{NAD}^+$  beteiligt sein könnten.

Auf der Oberfläche von NK-Zellen sowie B- und T-Lymphozyten der Maus wurde das  $\text{NAD}^+$  metabolisierende Ektoenzym CD38 nachgewiesen (Lund et al., 1998). CD38 ist eine ADP-Ribosylzyklase und setzt  $\text{NAD}^+$  unter Freisetzung von zyklischer ADP-Ribose um; zusätzlich besitzt das Molekül mADPRT-Aktivität und kann neben verschiedenen anderen Proteinen auch sich selbst modifizieren (Grimaldi, 1995). Die funktionelle Bedeutung der enzymatischen Aktivität von CD38 konnte noch nicht geklärt werden. Eine Expression von CD38 oder verwandten Enzymen auf Ratten-NK-Zellen und damit eine Beteiligung an den beobachteten Effekten kann auf der Basis der vorliegenden Befunde nicht ausgeschlossen werden.



**Abb. 5.2: Modell der hypothetischen Effekte der enzymatischen Aktivitäten von RT6 auf die Funktion von NK-Zellen**

**I.** Übermittlung negativer Signale nach Auto-Ribosylierung von RT6 **II.** Beeinflussung der Signalkapazitäten von RT6 durch Auto-Ribosylierung

**III.** Durch ADP-Ribosyl-Hydrolasen vermittelte Reversibilität der Automodifikation von RT6 **IV.** Effekt der extrazellulären  $NAD^+$ -Konzentration auf die enzymatischen Aktivitäten von RT6 **V.** Freisetzung membrangängiger Metabolite



## 6 Zusammenfassung

Dieses Promotionsvorhaben basiert auf der Entdeckung, daß Ratten-NK-Zellen das GPI-verankerte Ektoenzym RT6 exprimieren, das zuvor nur als T-Zell-Differenzierungsmarker bekannt war (Wonigeit et al., 1997). Die Funktion dieses zu der Enzymfamilie der mADP-Ribosyltransferasen gehörenden Moleküles ist bislang unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob auf NK-Zellen exprimiertes RT6 Signalkapazitäten besitzt, die NK-Effektor-Funktionen modulieren können. Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurde ein *in vitro* Modellsystem benutzt, in dem RT6, exprimiert auf NK-Zell-Linien und Milz-NK-Zellen der Ratte, anhand immobilisierter Antikörper kreuzvernetzt wurde. Einen weiteren Teil der Arbeit bildeten Untersuchungen zu der Bedeutung der enzymatischen Aktivität von RT6 für die Funktion von NK-Zellen. In diesem Zusammenhang wurden die Wirkungen von exogenem NAD<sup>+</sup>, dem Substrat von RT6, auf Effektor-Funktionen der betrachteten NK-Linien analysiert.

Auf der Ebene der frühen Signaltransduktion löste die Kreuzvernetzung von RT6.1 einen Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration aus. Begleitend waren die verstärkte Tyrosinphosphorylierung eines etwa 33 kDa großen Proteins und die Verschiebung des apparenten Molekulargewichtes einer ~55 kDa-Bande zu einer schwereren Form von etwa 60 kDa zu beobachten, welche die p60-Isoform der p56<sup>lck</sup> repräsentieren könnte. Auf der Ebene der Zellfunktionen induzierte die Kreuzvernetzung von RT6.1 bei gleichzeitigem Zusatz von IL-2 die verstärkte Expression des hoch affinen IL-2-Rezeptor-Komplexes und eine gesteigerte Freisetzung von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . Die Stimulation der NK-Zellen über RT6 führte zudem zu der Reduktion der RT6-Oberflächenexpression und der Expansion bzw. Entstehung einer RT6-negativen NK-Population. Eine durch RT6-Kreuzvernetzung verringerte RT6-Dichte konnte auch auf der Oberfläche von Milz-T-Zellen beobachtet werden. Diesem Effekt scheint die enzymatische Abspaltung des RT6-Moleküls von der Zelloberfläche zugrunde zu liegen, an der Serin-Proteasen maßgeblich beteiligt sind.

Weiterhin wurde gezeigt, daß die IL-2-vermittelte Induktion der IL-2R $\alpha$ -Kette auf NK-Zellen von einer gesteigerten RT6-Oberflächenexpression begleitet wird. Die Expression von RT6 scheint somit ein Stadium aktivierter NK-Zellen zu charakterisieren.

Basierend auf diesen Befunden wurde die Hypothese aufgestellt, daß RT6 Teil eines multimeren, aktivierenden Signaltransduktionskomplexes ist und *in vivo* nach Bindung eines bislang unidentifizierten Liganden über Rekrutierung von Proteintyrosinkinase und der Phospholipase C die Transkription von Genen (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , CD25) induziert, die für die

Ausübung der Effektor-Funktionen von NK-Zellen von Bedeutung sind. Die durch die hypothetische Ligandenbindung ausgelöste enzymatische Abspaltung von RT6 könnte, nach erfolgter Aktivierung der NK-Effektor-Funktionen, der schnellen Reduktion der Expression dieses Moleküles dienen.

Die Inkubation der betrachteten NK-Linien mit  $\text{NAD}^+$  hatte eine deutliche Reduktion ihrer  $\text{IFN-}\gamma$ -Freisetzung zur Folge. Vor diesem Hintergrund wurde postuliert, daß die Lyse einer Zielzelle *in vivo* zu dem Austreten von intrazellulärem  $\text{NAD}^+$  führt und dadurch bei der NK-Zelle ein auf der Auto-Ribosyltransferase-Aktivität von RT6 basierender, negativer Feedback-Mechanismus ausgelöst wird. Auf diesem Weg könnten *in vivo* die Effektor-Funktionen von NK-Zellen moduliert und ein Überschießen der NK-Reaktivität verhindert werden.

## 7 Literatur

**Abbas, A. K., Lichtman, A.H., Pober, J.S. (1996).** Immunologie. Verlag Huber, Bern

**Anegon, I., Cuturi, M. C., Trinchieri, G., Perussia, B. (1988).** Interaction of Fc receptor (CD16) ligands induces transcription of interleukin 2 receptor (CD25) and lymphokine genes and expression of their products in human natural killer cells. *J. Exp. Med.* **167**, 452

**Angelillo, M., Greiner, D. L., Mordes, J. P., Handler, E. S., Nakamura, N., McKeever, U., Rossini, A. (1988).** Absence of RT6<sup>+</sup> T cells in diabetes-prone biobreeding/Worcester rats is due to genetic and cell developmental defects. *J. Immunol.* **141**, 4146

**Antequera, F., Boyes, J., Bird, A. (1990).** High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell* **62**, 503

**Apsimon, M.M., Rawling, J.M., Kirkland, J.B. (1995).** Nicotinamide megadosing increases hepatic poly(ADP-ribose) levels in choline-deficient rats. *J. Nutr.* **125**, 1826.

**Arase, H., Arase, N., Saito, T. (1995).** Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells. *J. Exp. Med.* **181**, 1235

**Arase, N., Arase, H., Park, S. Y., Ohno, H., Ra, C., Saito, T. (1997).** Association with FcRgamma is essential for activation signal through NKR-P1 (CD161) in natural killer (NK) cells and NK1.1<sup>+</sup> T cells. *J. Exp. Med.* **186**, 1957

**Axberg, I., Nose, M., Reynolds, C. W., Wigzell, H. (1988).** Features of the in vitro established rat large granular lymphocyte leukaemia RNK-16. *Scand. J. Immunol.* **27**, 271

**Azuma, M., Cayabyab, M., Buck, D., Phillips, J. H., Lanier, L. L. (1992).** Involvement of CD28 in MHC-unrestricted cytotoxicity mediated by a human natural killer leukemia cell line. *J. Immunol.* **149**, 1115

- Baker, B. R., Cory, M. (1971).** Irreversible enzyme inhibitors. 180. Irreversible inhibitors of the C'la component of complement derived from m-(phenoxypropoxy)benzamidine and phenoxyacetamide. *J. Med. Chem.* **14**, 119
- Bamezai, A., Goldmacher, V., Reiser, H., Rock, K. L. (1989).** Internalization of phosphatidylinositol-anchored lymphocyte proteins. I. Documentation and potential significance for T cell stimulation. *J. Immunol.* **143**, 3107
- Bancroft, G. J. (1993).** The role of natural killer cells in innate resistance to infection. *Curr. Opin. Immunol.* **5**, 503
- Barrett, A. J., Kembhavi, A. A., Brown, M. A., Kirschke, H., Knight, C. G., Tamai, M., Hanada, K. (1982).** L-trans-Epoxy succinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochem. J.* **201**, 189
- Bazil, V., Strominger, J. L. (1991).** Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes. *J. Immunol.* **147**, 1567
- Berg, S.F., Dissen, E., Westgaard, I.H., Fossum, S. (1998).** Two genes in the rat homologous to human NKG2. *Eur. J. Immunol.* **28**, 444
- Black, P.N. (1980).** Shedding from normal and cancer-cell surfaces. *N. Engl. J. Med.* **303**, 1415
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., Howard, J. C. (1997).** Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 749
- Bouaboula, M., Legoux, P., Pessegue, B., Delpech, B., Dumont, X., Piechaczyk, M., Casela, P., Shire, D. (1992).** Standardization of messenger RNA by the polymerase chain reaction. *J. Biol. Chem.* **267**, 21830

- Bradford, M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248
- Brisette-Storkus, C.S., Appasamy, P.M., Hayes, L.A., Kaufman, C.L., Ildstad, S.T., Chambers, W.H. (1995).** Characterization and comparison of the lytic function of NKR-P1<sup>+</sup> and NKR-P1<sup>-</sup> rat NK cell clones. *Nat. Immun.* **14**, 98
- Butikofer, P., Kuypers, F. A., Xu, C. M., Chiu, D. T., Lubin, B. (1989).** Enrichment of two glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins, acetylcholinesterase and decay accelerating factor, in vesicles released from human red blood cells. *Blood* **74**, 1481
- Cain, T. J., Liu, Y., Kobayashi, T., Robinson, J. M. (1993).** Rapid purification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored alkaline phosphatase from human neutrophils after up-regulation to the cell surface. *J. Histochem. Cytochem.* **41**, 1367
- Cain, T. J., Liu, Y., Takizawa, T., Robinson, J. M. (1995).** Solubilization of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins in quiescent and stimulated neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta* **1235**, 69
- Caliguri, M.A., Zmuidzinas, A., manley, T., Levine, H., Smith, K.A., Ritz, J. (1990).** Functional consequences of IL-2 receptor expression of resting human lymphocytes: identification of a novel NK cell subset. *J. Exp. Med.* **171**, 1509
- Carlyle, J. R., Martin, A., Mehra, A., Attisano, L., Tsui, F. W., Zuniga-Pflucker, J. C. (1999).** Mouse NKR-P1B, a novel NK1.1 antigen with inhibitory function. *J. Immunol.* **162**, 5917
- Carson, W. E., Giri, J. G., Lindemann, M. J., Linett, M. L., Ahdieh, M., Paxton, R., Anderson, D., Eisenmann, J., Grabstein, K., Caligiuri, M. A. (1994).** Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J. Exp. Med.* **180**, 1395

- Censullo, P., Davitz, M. A. (1994).** How GPI-anchored proteins turnover: or where do they go after arrival at the plasma membrane. *Semin. Immunol* **6**, 81
- Cervantes-Laurean, D., Minter, D. E., Jacobson, E. L., Jacobson, M. K. (1993).** Protein glycation by ADP-ribose: studies of model conjugates. *Biochemistry* **32**, 1528.
- Chambers, W., Vujanovic, N., DeLeo, A., Olszowy, M., Herberman, R.B., Hiserodt, J. (1989).** Monoclonal antibody to a triggering structure expressed on rat natural killer cells and adherent lymphokine-activated killer cells. *J. Exp. Med.* **169**, 373
- Chan, A.C., Desai, D.M., Weiss, A. (1994).** The role of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases in T cell antigen receptor signal transduction. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 555
- Collins, J.T., Dunnick, W.A. (1993).** Germline transcripts of the murine immunoglobulin gamma2a gene- structure and induction by IFN-gamma. *Int. Immunol.* **5**, 885
- Crisa, L., Greiner, D. L., Mordes, J. P., MacDonald, R. G., Handler, E. S., Czech, M. P., Rossini, A. A. (1990).** Biochemical studies of RT6 alloantigens in BB/Wor and normal rats. Evidence for intact unexpressed RT6a structural gene in diabetes-prone BB rats. *Diabetes* **39**, 1279
- Crisa, L., Mordes, J.P., Rossini, A.A. (1992).** Autoimmune diabetes mellitus in the BB-rat. *Diabetes Metab. Rev.* **8**, 9
- Crisa, L., Sarkar, P., Waite, D. J., Friedrich, F. H., Koch, N., Rajan, T. V., Mordes, J. P., Handler, E. S., Thiele, H. G., Rossini, A. A., et al. (1993).** An RT6a gene is transcribed and translated in lymphopenic diabetes-prone BB rats. *Diabetes* **42**, 688
- Dissen, E. Berg, S.F., Westgaard, I.H., Fossum, S. (1997).** Molecular characterization of a gene in the rat homologous to human CD94. *Eur. J. Immunol.* **27**, 2080

- Donnelly, L. E., Rendell, N. B., Murray, S., Allport, J. R., Lo, G., Kefalas, P., Taylor, G. W., MacDermot, J. (1996).** Arginine-specific mono(ADP-ribosyl)transferase activity on the surface of human polymorphonuclear neutrophil leucocytes. *Biochem. J.* **315**, 635
- Durieux, J.J., Vita, N., Popescu, O., Guette, F., Wack, J.C., Munker, R., Schmidt, R.E., Lupker, J., Ferrara, P., Heitbrock, H.W.L.Z., Labeta, M.O. (1994).** The two soluble forms of the lipopolysaccharide receptor CD14: characterization and release by normal human monocytes. *Eur. J. Immunol.* **24**, 2006
- Eardley, D. D., Koshland, M. E. (1991).** Glycosylphosphatidylinositol: a candidate system for interleukin-2 signal transduction. *Science* **251**, 78
- Eiseman, E., Bolen, J. B. (1990).** src-related tyrosine protein kinases as signaling components in hematopoietic cells [published erratum appears in *Cancer Cells* 1990 Dec;2(12):405]. *Cancer Cells* **2**, 303
- Ernst, D.N. und Lubaroff, D.M.. (1984).** Membrane antigen phenotype of sensitized T lymphocytes mediating tuberculin-delayed hypersensitivity in rats. *Cell. Immunol.* **88**, 436
- Fangmann, J., Schwinzer, R., Hedrich, H. J., Kloting, I., Wonigeit, K. (1991).** Diabetes-prone BB rats express the RT6 alloantigen on intestinal intraepithelial lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **21**, 2011
- Fangmann, J., Schwinzer, R., Winkler, M., Wonigeit, K. (1990).** Expression of RT6 alloantigens and the T-cell receptor on intestinal intraepithelial lymphocytes of the rat. *Transplant. Proc.* **22**, 2543
- Fangmann, J., Schwinzer, R., Hedrich, H. J., Wonigeit, K. (1993).** Demonstration of RT6 expression on , a CD3- population of intestinal intraepithelial lymphocytes of athymic nude rats. *Transplant Proc* **25**, 2789
- Farrar, W.L., Birchenall-Sparks, M.C., Young, H.B. (1986).** Interleukin-2 induction of Interferon- $\gamma$ -mRNA synthesis. *J. Immunol.* **137**, 3836

- Futermann, A.H., Low, M.G., Michaelson, D.M., Silman, I. (1985).** Solubilization of membrane-bound acetylcholinesterase by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *C. J. Neurochem.* **45**, 1487
- Galandrini, R., De Maria, R., Piccoli, M., Frati, L., Santoni, A. (1994).** CD44 triggering enhances human NK cell cytotoxic functions. *J. Immunol.* **153**, 4399
- Gaston, R. S. (1994).** Cytokines and transplantation: a clinical perspective. *Transplant. Sci.* **4 Suppl 1**, S9
- Giezeman-Smits, K., Jonges, L., Chambers, W.H., Brisette-Storkus, C.S., van Vlierberghe, R.L.P., van Eendenburg, J., Eggermont, A.M.M., Fleuren, G.J., Kuppen, P. (1998).** Novel monoclonal antibodies against membrane structures that are preferentially expressed on IL-2-activated rat NK cells. *J. Leucoc. Biol.* **63**, 209
- Gilliand, G., Perrin, S., Blachard, K., Brunn, H.F. (1990).** Analysis of cytokine mRNA and DNA detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2725
- Goodan, D.J. (1997).** The role of NK cells in xenograft rejection. *Nat. Immun.* **15**, 168
- Greiner, D.L., Barton, R.W., Goldschneider, I., Lubaroff, D.M. (1982).** Genetic linkage and cell distribution analysis of T cell alloantigens in the rat. *J. Immunogenet.* **9**, 43
- Greiner, D. L., Handler, E. S., Nakano, K., Mordes, J. P., Rossini, A. A. (1986).** Absence of the RT-6 T cell subset in diabetes-prone BB/W rats. *J. Immunol.* **136**, 148
- Grimaldi, J. C., Balasubramanian, S., Kabra, N.H., Shanafelt, A., Bazan, J.F., Zurawski, G., Howard, C. (1995).** CD38-mediated ribosylation of proteins. *J. Immunol.* **155**, 811
- Gumperz, J. E., Parham, P. (1995).** The enigma of natural killer cells. *Nature* **378**, 245



- Gunter, K. C., Germain, R. N., Kroczeck, R. A., Saito, T., Yokoyama, W. M., Chan, C., Weiss, A., Shevach, E. M. (1987).** Thy-1-mediated T-cell activation requires co-expression of CD3/Ti complex. *Nature* **326**, 505
- Haag, F., Koch, F., Thiele, H. G. (1990b).** Polymorphism between rat T-cell alloantigens RT6.1 and RT6.2 is based on multiple amino acid substitutions. *Transplant. Proc.* **22**, 2541
- Haag, F., Koch, F., Thiele, H. G. (1990a).** Nucleotide and deduced amino acid sequence of the rat T-cell alloantigen RT6.1. *Nucleic Acids Res.* **18**, 1047.
- Haag, F., Nolte, F., Hollmann, C., Thiele, H. G. (1993).** Analysis of the gene for the rat T-cell alloantigen RT6: evidence for alternative splicing in the 5' region. *Transplant Proc* **25**, 2784
- Haag, F., Koch-Nolte, F., Kuhl, M., Lorenzen, S., Thiele, H. G. (1994).** Premature stop codons inactivate the RT6 genes of the human and chimpanzee species. *J. Mol. Biol.* **243**, 537
- Haag, F., Andresen, V., Karsten, S., Koch-Nolte, F., Thiele, H. (1995).** Both allelic forms of the rat T cell differentiation marker RT6 display nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)-glycohydrolase activity, yet only RT6.2 is capable of automodification upon incubation with NAD. *Eur. J. Immunol.* **25**, 2355
- Haag, F. A., Kuhlenbaumer, G., Koch-Nolte, F., Wingender, E., Thiele, H. G. (1996).** Structure of the gene encoding the rat T cell ecto-ADP- ribosyltransferase RT6. *J. Immunol.* **157**, 2022
- Haag, F., Rothenburg, S., Koch-Nolte, F., Thiele, H. G. (1997).** Polymorphic microsatellite within the main promoter of the rat T cell differentiation antigen RT6 on chromosome 1. *Transplant. Proc.* **29**, 1703

- Hanna, N. (1980).** Expression of metastatic potential of tumor cells in young nude mice is correlated with low levels of natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Int J Cancer* **26**, 675
- Hara, N., Tsuchiya, M., Shimoyama, M. (1996).** Glutamic acid 207 in rodent T-cell RT6 antigens is essential for arginine-specific ADP-ribosylation. *J. Biol. Chem.* **271**, 29552
- Harrison, D., Phillips, J. H., Lanier, L. L. (1991).** Involvement of a metalloprotease in spontaneous and phorbol ester-induced release of natural killer cell-associated Fc gamma RIII (CD16-II). *J. Immunol.* **147**, 3459
- He, H. T., Finne, J., Goridis, C. (1987).** Biosynthesis, membrane association, and release of N-CAM-120, a phosphatidylinositol-linked form of the neural cell adhesion molecule. *J. Cell. Biol.* **105**, 2489
- Henkart, P. A. (1985).** Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* **3**, 31
- Herberman, R.B., Nunn, M.E., Holden, H.T., Lavrin, D.H. (1975).** Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int.J.cancer* **75**, 230
- Horejsi, V., Drebal, K. Cecebauer, M., Cerny, J., Brdicka, T., Angelisova, P., Stockinger, H. (1999).** GPI-Microdomains: a role in signalling via immunoreceptors. *Immunol. Today* **20**, 356
- Honjo, T., Nishizuka, Y., Kato, I.. (1968).** Diphtheria toxin dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* **243**, 3553.
- Hsi, E. D., Siegel, J. N., Minami, Y., Luong, E. T., Klausner, R. D., Samelson, L. E. (1989).** T cell activation induces rapid tyrosine phosphorylation of a limited number of cellular substrates. *J. Biol. Chem.* **264**, 10836

- Huang, H. Y., Graves, D. J., Robson, R. M., Huiatt, T. W. (1993).** ADP-ribosylation of the intermediate filament protein desmin and inhibition of desmin assembly in vitro by muscle ADP-ribosyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**, 570
- Huizinga, T. W., van der Schoot, C. E., Jost, C., Klaassen, R., Kleijer, M., von dem Borne, A. E., Roos, D., Tetteroo, P. A. (1988).** The PI-linked receptor FcRIII is released on stimulation of neutrophils. *Nature* **333**, 667
- Hundt, M., Schmidt, R. E. (1992).** The glycosylphosphatidylinositol-linked Fc gamma receptor III represents the dominant receptor structure for immune complex activation of neutrophils. *Eur. J. Immunol.* **22**, 811
- Hunt, H. D., Lubaroff, D. M. (1992).** Identification of functional T cell subsets and surface antigen changes during activation as they relate to RT6. *Cell Immunol* **143**, 194
- Hunter, C. A., Subauste, C. S., Van Cleave, V. H., Remington, J. S. (1994).** Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. *Infect. Immun.* **62**, 2818
- Ilangumaran, S., Arni, S., Chicheportiche, Y., Briol, A., Hoessli, D. C. (1996).** Evaluation by dot-immunoassay of the differential distribution of cell surface and intracellular proteins in glycosylphosphatidylinositol-rich plasma membrane domains. *Anal. Biochem.* **235**, 49
- Ljunggren, H.G., Karre, K. (1990).** In search of the "missing self": MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today* **11**, 237
- Katan, M. (1998).** Families of phosphoinositide-specific phospholipase C: structure and function. *Biochim. Biophys. Acta* **1436**, 5
- Kharadia, S. V., Huiatt, T. W., Huang, H. Y., Peterson, J. E., Graves, D. J. (1992).** Effect of an arginine-specific ADP-ribosyltransferase inhibitor on differentiation of embryonic chick skeletal muscle cells in culture. *Exp. Cell. Res.* **201**, 33

- Kiessling, R., Klein, E., Wigzell, H., (1975).** „Natural“ Killer cells in the mouse. I. cytotoxic cells with specificity for mouse moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.* **5**, 112
- Kim, U. H., Rockwood, S. F., Kim, H. R., Daynes, R. A. (1988).** Membrane-associated NAD<sup>+</sup> glycohydrolase from rabbit erythrocytes is solubilized by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochim. Biophys. Acta* **965**, 76
- Kim, U. H., Kim, M. K., Kim, J. S., Han, M. K., Park, B. H., Kim, H. R. (1993).** Purification and characterization of NAD glycohydrolase from rabbit erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **305**, 147
- Koch, F., Thiele, H. G., Low, M. G. (1986).** Release of the rat T cell alloantigen RT-6.2 from cell membranes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J. Exp. Med.* **164**, 1338
- Koch, F., Kashan, A., Thiele, H. G. (1988).** The rat T-cell differentiation marker RT6.1 is more polymorphic than its alloantigenic counterpart RT6.2. *Immunology* **65**, 259
- Koch, F., Haag, F., Kashan, A., Thiele, H. G. (1990a).** Primary structure of rat RT6.2, a nonglycosylated phosphatidylinositol-linked surface marker of postthymic T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **87**, 964
- Koch, F., Haag, F., Thiele, H. G. (1990b).** Nucleotide and deduced amino acid sequence for the mouse homologue of the rat T-cell differentiation marker RT6. *Nucleic. Acids. Res.* **18**, 3636.
- Koch-Nolte, F., Petersen, D., Balasubramanian, S., Haag, F., Kahlke, D., Willer, T., Kastelein, R., Bazan, F., Thiele, H. G. (1996).** Mouse T cell membrane proteins Rt6-1 and Rt6-2 are arginine/protein mono(ADP-ribose)transferases and share secondary structure motifs with ADP-ribosylating bacterial toxins. *J. Biol. Chem.* **271**, 7686
- Koch-Nolte, F., Haag, F. (1997).** Mono(ADP-ribose)transferases and related enzymes in animal tissues. Emerging gene families. *Adv. Exp. Med. Biol.* **419**, 1

- Koch-Nolte, F., Haag, F., Braren, R., Kuhl, M., Hoovers, J., Balasubramanian, S., Bazan, F., Thiele, H. G. (1997).** Two novel human members of an emerging mammalian gene family related to mono-ADP-ribosylating bacterial toxins. *Genomics* **39**, 370
- Koch-Nolte, F., Duffy, T., Nissen, M., Kahl, S., Killeen, N., Ablamunits, V., Haag, F., Leiter, E. (1999).** A new monoclonal antibody detects a developmentally regulated mouse ecto-ADP-ribosyltransferase on T cells: subset distribution, inbred strain variation and modulation upon T cell activation. *J. Immunol.* **163**, 6014
- Kosuda, L. L., Wayne, A., Nahounou, M., Greiner, D. L., Bigazzi, P. E. (1991).** Reduction of the RT6.2+ subset of T lymphocytes in brown Norway rats with mercury-induced renal autoimmunity. *Cell. Immunol.* **135**, 154
- Krensky, A.M. (2000).** Granulysin. A novel antimicrobial peptide of cytolytic lymphocytes and natural killer cells. *Biochem. Pharmacol.* **59**, 317
- Kung, S. K., Su, R. C., Shannon, J., Miller, R. G. (1999).** The NKR-P1B gene product is an inhibitory receptor on SJL/J NK cells. *J. Immunol.* **162**, 5876
- Kurago, Z. B., Lutz, C. T., Smith, K. D., Colonna, M. (1998).** NK cell natural cytotoxicity and IFN-gamma production are not always coordinately regulated: engagement of DX9 KIR+ NK cells by HLA-B7 variants and target cells. *J Immunol* **160**, 1573
- Kuribayashi, K., Gillis, S., Kern, D.E., Henney, C.S. (1981).** Murine NK cell cultures: effects of interleukin-2 and interferon on cell growth and cytotoxic reactivity. *J. Immunol.* **23**, 2237
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680
- Lanier, L. L., Buck, D. W., Rhodes, L., Ding, A., Evans, E., Barney, C., Phillips, J. H. (1988).** Interleukin 2 activation of natural killer cells rapidly induces the expression and phosphorylation of the Leu-23 activation antigen. *J. Exp. Med.* **167**, 1572

- Lanier, L.L., Yu, G., Phillips, J.H. (1989).** Co-association of CD3 $\zeta$  with a receptor (CD16) for IgG Fc on human natural killer cells. *Nature* **342**, 803
- Lanier, L.L., Corliss, B., Phillips, J.H. (1997).** Arousal and inhibition of human NK cells. *Immunol. Rev.* **155**, 145
- Lanier, L.L., Corliss, B.C., Wu, C., Leong, C., Phillips, J.H. (1998).** Immunoreceptor DAP-12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* **391**, 703
- Lanier, L.L. (1998).** NK cell receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 359
- Lanier, L.L. (2000).** Turning on natural killer cells. *J. Exp. Med.* **191**, 1259
- Lesma, E., Moss, J., Brewer, H. B., Bortell, R., Greiner, D., Mordes, J., Rossini, A. A. (1998).** Characterization of high density lipoprotein-bound and soluble RT6 released following administration of anti-RT6.1 monoclonal antibody. *J. Immunol.* **161**, 1212
- Levy, I., Wu, Y. Q., Roeckel, N., Bulle, F., Pawlak, A., Siegrist, S., Mattei, M. G., Guellaen, G. (1996).** Human testis specifically expresses a homologue of the rodent T lymphocytes RT6 mRNA. *FEBS Lett.* **382**, 276
- Liu, Z.-X., Dennert, G. (1999).** A cell surface ADP-ribosyltransferase modulates T cell receptor association and signaling. *J. Biol. Chem.* **274**, 17399
- Lubaroff, D.M., Butcher, G., DeWitt, C., Gill III, T., Günther, E., Howard, J., Wonigeit, K. (1983).** Standardized nomenclature for the rat T-cell alloantigens: report of the committee. *Transpl. Proc.*, **15** (2), 1683
- Lund, F. E., Cockayne, D. A., Randall, T. D., Solvason, N., Schuber, F., Howard, M. C. (1998).** CD38: a new paradigm in lymphocyte activation and signal transduction. *Immunol. Rev.* **161**, 79

- Lund-Johansen, F., Olweus, J., Aarli, A., Bjercknes, R. (1990).** Signal transduction in human monocytes and granulocytes through the PI-linked antigen CD14. *FEBS Lett.* **273**, 55.
- Lund-Johansen, F., Olweus, J., Symington, F. W., Arli, A., Thompson, J. S., Vilella, R., Skubitz, K., Horejsi, V. (1993).** Activation of human monocytes and granulocytes by monoclonal antibodies to glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens. *Eur. J. Immunol.* **23**, 2782
- Lotzova, E. (1993).** Definition and functions of natural killer cells. *Nat. Immun.* **12**, 169
- Low, M.G. and Finean, J.B. (1977).** Non-lytic release of acetylcholinesterase by phosphatidylinositol-specific phospholipase. *FEBS Lett.* **82**, 143
- Low, M.G. (1990).** In *Molecular and Cell Biology of Membrane Proteins: Glycolipid Anchors of Cell Surface Proteins*. A.J. Turner, ed., Ellis Horwood Ltd., Chichester, UK, pp35
- Low, M.G. (1992).** Phospholipases that degrade the glycosyl-phosphatidylinositol anchor of membrane proteins. In *Lipid Modification of Proteins: A Practical Approach*. N.M. Hooper and A.J. Turner, eds. Oxford University press, New York, p117.
- Maehama, T., Hoshino, S., Katada, T. (1996).** Increase in ADP-ribosyltransferase activity of rat T lymphocyte alloantigen RT6.1 by a single amino acid mutation. *FEBS Lett.* **388**, 189
- Maehama, T., Takahashi, K., Ohoka, Y., Ohtsuka, T., Ui, M., Katada, T. (1991).** Identification of a botulinum C3-like enzyme in bovine brain that catalyzes ADP-ribosylation of GTP-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **266**, 10062
- Maehama, T., Nishina, H., Hoshino, S., Kanaho, Y., Katada, T. (1995).** NAD(+)-dependent ADP-ribosylation of T lymphocyte alloantigen RT6.1 reversibly proceeding in intact rat lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **270**, 22747

- Massaia, M., Perrin, L., Bianchi, A., Ruedi, J., Attisano, C., Altieri, D., Rijkers, G. T., Thompson, L. F. (1990).** Human T cell activation. Synergy between CD73 (ecto-5'-nucleotidase) and signals delivered through CD3 and CD2 molecules. *J. Immunol.* **145**, 1664.
- Mehrotra, P.T., Donnelly, R.P., Wong, S., Kanegane, H., Geremew, A., Mostowski, H.S., Furuke, K., Siegel, J.P., Bloom, E.T. (1998).** Production of IL-10 by human natural killer cells stimulated with IL-2 and/or IL-12. *J. Immunol.* **160**, 2637
- Melero, I., Balboa, M. A., Alonso, J. L., Yague, E., Pivel, J. P., Sanchez-Madrid, F., Lopez-Botet, M. (1993).** Signaling through the LFA-1 leucocyte integrin actively regulates intercellular adhesion and tumor necrosis factor-alpha production in natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* **23**, 1859
- Metes, D., Ernst, L. K., Chambers, W. H., Sulica, A., Herberman, R. B., Morel, P. A. (1998).** Expression of functional CD32 molecules on human NK cells is determined by an allelic polymorphism of the FcgammaRIIC gene. *Blood* **91**, 2369
- Metz, C.N., Brunner, G., Choi-Muira, N.H., Nguyen, H., Gabrilove, J., Caras, I.W., Altszuler, N., Rifkin, D.B., Wilson, E.L., Davitz, M.A. (1994).** Release of GPI-anchored membrane proteins by a cell-associated GPI-specific phospholipase D. *EMBO J.* **13**, 1741
- Miller, J.L., Giattina, M., Mackie, E.J.B., Dwyer, N.K. (1998).** Variated transfer of recombinant glycosylphosphatidylinositol-anchored CD4 among cultured cells: correlation of flow cytometric and microscopic observations. *J. Lab. Clin. Med.* **131**, 215
- Millrain, M. M., Hederer, R., Griffiths, S., Fryer, P., Tomonari, K., Robinson, P. J. (1992).** Novel cell junctions induced by activating Thy-1-specific antibodies. *Int. Immunol.* **4**, 1137
- Minta, A., Kao, J.P.Y., Tsien, R.Y. (1989).** Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J. Biol. Chem.* **264**, 8171



- Mond, J.J., Lees, A., Snapper, C.M. (1995).** T cell-independent antigens type 2. *Annu. Rev. Immunol.* **13**, 655
- Mojcik, C. F., Greiner, D. L., Medlock, E. S., Komschlies, K. L., Goldschneider, I. (1988).** Characterization of RT6 bearing rat lymphocytes. I. Ontogeny of the RT6+ subset. *Cell. Immunol.* **114**, 336
- Mordes, J. P., Bortell, R., Doukas, J., Rigby, M., Whalen, B., Zipris, D., Greiner, D. L., Rossini, A. A. (1996).** The BB/Wor rat and the balance hypothesis of autoimmunity. *Diabetes. Metab. Rev.* **12**, 103
- Morgan, B. P., van den Berg, C. W., Davies, E. V., Hallett, M. B., Horejsi, V. (1993).** Cross-linking of CD59 and of other glycosyl phosphatidylinositol-anchored molecules on neutrophils triggers cell activation via tyrosine kinase. *Eur. J. Immunol.* **23**, 2841
- Morimoto, C., Schlossman, S. F. (1998).** The structure and function of CD26 in the T-cell immune response. *Immunol Rev.* **161**, 55
- Moretta, A., Poggi, A., Pende, D., Tripodi, G., Orengo, A.M., Pella, N., Augugliario, R., Bottino, C., Ciccone, E., Moretta, L. (1991).** CD69-mediated pathway for lymphocyte activation. *J.Exp.Med.* **174**, 1393
- Moss, D. E., Fahrney, D. (1978).** Kinetic analysis of differences in brain acetylcholinesterase from fish or mammalian sources. *Biochem. Pharmacol.* **27**, 2693
- Moss, M. L., Palmer, R. E., Kuzmic, P., Dunlap, B. E., Henzel, W., Kofron, J. L., Mellon, W. S., Royer, C. A., Rich, D. H. (1992).** Identification of actin and HSP 70 as cyclosporin A binding proteins by photoaffinity labeling and fluorescence displacement assays. *J. Biol. Chem.* **267**, 22054
- Moss, J., Stevens, L. A., Cavanaugh, E., Okazaki, I. J., Bortell, R., Kanaitsuka, T., Mordes, J. P., Greiner, D. L., Rossini, A. A. (1997).** Characterization of mouse Rt6.1 NAD:arginine ADP-ribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **272**, 4342

- Müller, D.L., Jenkins, M.J., Scheartz, R.H. (1989).** Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu. Rev. Immunol.* **7**, 445
- Mueller, J. P., Smerdon, M. J. (1996).** Rad23 is required for transcription-coupled repair and efficient overall repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 2361
- Muller-Steffner, H., Schenherr-Gusse, I., Tarnus, C., Schuber, F. (1993).** Calf spleen NAD<sup>+</sup> glycohydrolase: solubilization, purification, and properties of the intact form of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* **304**, 154
- Naper, C., Rolstad, B., Wonigeit, K., Butcher, G.W., Vaage, J.T. (1996).** Genes in two MHC class I regions control recognition of a single rat natural killer cell allodeterminant. *Int.Immunol.* **8**, 1779
- Natuk, R.J., Welsh, R.M. (1987).** Chemotactic effect of human recombinant interleukin-2 on mouse activated large granular lymphocytes. *J.Immunol.* **139**, 2737
- Nemoto, E., Yu, Y.,Dennert, G. (1996a).** Cell surface ADP-ribosyltransferase regulates lymphocyte function- associated molecule-1 (LFA-1) function in T cells. *J. Immunol.* **157**, 3341
- Nemoto, E., Stohlman, S., Dennert, G. (1996b).** Release of a glycosylphosphatidylinositol- anchored ADP- ribosyltransferase from cytotoxic T cells upon activation. *J. Immunol.* **156**, 85
- Nosjean, O., Briolay, A., Roux, B. (1997).** Mammalian GPI proteins: sorting, membrane residence and functions. *BBA* **1331**, 153
- Okamoto, S., Azhipa, O., Yu, Y, Russo, E., Dennert, G.. (1998).** Expression of ADP- ribosyltransferase on normal T lymphocytes and effects of nicotinamide adenine dinucleotide on their function. *J.Imunol.* **160**, 4190

- Olsson, A., Olofsson, T., Pero, R. W. (1993).** Specific binding and uptake of extracellular nicotinamide in human leukemic K-562 cells. *Biochem. Pharmacol.* **45**, 1191
- Orange, J.S., Wang, B., Terhorst, C., Biron, C.A. (1995).** Requirement for natural killer cell-produced interferon-gamma in defense against murine cytomegalovirus infection and enhancement of this defense pathway by interleukin 12 administration. *J. Exp. Med.* **182**, 1045
- Ortaldo, J. R., Mason, A., Overton, R. (1986).** Lymphokine-activated killer cells. Analysis of progenitors and effectors. *J. Exp. Med.* **164**, 1193
- O'Shea, J., Ortaldo, J.R. (1992).** The biology of natural killer cells: insights into the molecular basis of function. In: *The natural killer cell*. Lewis, C.E., McGee, J.O., eds., IRL, Oxford, 2
- Parekh, R. B., Tse, A. G., Dwek, R. A., Williams, A. F., Rademacher, T. W. (1987).** Tissue-specific N-glycosylation, site-specific oligosaccharide patterns and lentil lectin recognition of rat Thy-1. *Embo. J.* **6**, 1233
- Pessino, A., Sivori, S., Bottino, C., Malaspina, A., Morelli, L., Moretta, L., Biassoni, R., Moretta, A. (1998).** Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J Exp Med* **188**, 953
- Phillips, J.H., Takeshita, T., Sugamura, K., Lanier, L.L. (1989).** Activation of natural killer cells via the p75 interleukin 2 receptor. *J.Exp.Med.* **170**, 291
- Pollack, S., Ledbetter, J. A., Katz, R., Williams, K., Akerley, B., Franklin, K., Schieven, G., Nel, A. E. (1991).** Evidence for involvement of glycoprotein-CD45 phosphatase in reversing glycoprotein-CD3-induced microtubule-associated protein-2 kinase activity in Jurkat T-cells. *Biochem. J.* **276**, 481
- Powers, J.P. and J.W. Harper (1986).** Inhibitors of metalloproteases. In: *Proteinase Inhibitors*. A.J. Barrett and G. Salvesen, eds. Elsevier, New York, p. 219

- Presky, D.H., Low, M.G., Shevach, E.M. (1988).** The role of phosphatidyl-inositol (PI)-anchored proteins in T cell activation. *FASEB J.* **2**, 1654
- Prochazka, M., Gaskins, H. R., Leiter, E. H., Koch-Nolte, F., Haag, F., Thiele, H. G. (1991).** Chromosomal localization, DNA polymorphism, and expression of Rt-6, the mouse homologue of rat T-lymphocyte differentiation marker RT6. *Immunogenetics* **33**, 152
- Quist, E. E., Coyle, D. L., Vasan, R., Satumtira, N., Jacobson, E. L., Jacobson, M. K. (1994).** Modification of cardiac membrane adenylate cyclase activity and Gs alpha by NAD and endogenous ADP-ribosyltransferase. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **26**, 251
- Raulet, D.H. (1996).** Recognition events that inhibit and activate natural killer cells. *Curr. Opin. Immunol.* **8**, 372
- Reddy, P., Caras, I., Krieger, M. (1989).** Effects of O-linked glycosylation on the cell surface expression and stability of decay-accelerating factor, a glycosphospholipid-anchored membrane protein. *J Biol Chem* **264**, 17329
- Resta, R., Yamashita, Y., Thompson, L. F. (1998).** Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunol. Rev.* **161**, 95
- Rigby, M. R., Bortell, R., Greiner, D. L., Czech, M. P., Klarlund, J. K., Mordes, J. P., Rossini, A. A. (1996b).** The rat T-cell surface protein RT6 is associated with src family tyrosine kinases and generates an activation signal. *Diabetes* **45**, 1419
- Rigby, M. R., Bortell, R., Stevens, L. A., Moss, J., Kanaitsuka, T., Shigeta, H., Mordes, J. P., Greiner, D. L., Rossini, A. A. (1996a).** Rat RT6.2 and mouse Rt6 locus 1 are NAD<sup>+</sup>: arginine ADP ribosyltransferases with auto-ADP ribosylation activity. *J. Immunol.* **156**, 4259

- Roberts, W. L., Santikarn, S., Reinhold, V. N., Rosenberry, T. L. (1988).** Structural characterization of the glycoinositol phospholipid membrane anchor of human erythrocyte acetylcholinesterase by fast atom bombardment mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* **263**, 18776
- Rolstad, B., Herberman, R.B., Reynolds, C.W. (1986).** Natural killer cell activity in the rat. V. The circulation patterns and tissue localization of peripheral blood large granular lymphocytes (LGL). *J. Immunol.* **136**, 2800
- Rolstad, B., Wonigeit, K., Vaage, J.T. (1994).** Alloreactive rat natural killer (NK) cells *in vivo* and *in vitro*: the role of the major histocompatibility complex (MHC). In: *Natural Immunity to Normal Hemopoietic Cells*. Rolstad, B., ed., Boca Raton: CRC Press, Inc., 99
- Rolstad, B., Vaage, J.T., Naper, C., Lambracht, D., Wonigeit, K., Joly, E., Butcher, G.W. (1997).** Positive and negative MHC class I recognition by rat NK cells. *Immunol. Rev.* **155**, 91
- Ryan, J. C., Niemi, E. C., Goldfien, R. D., Hiserodt, J. C., Seaman, W. E. (1991).** NKR-P1, an activating molecule on rat natural killer cells, stimulates phosphoinositide turnover and a rise in intracellular calcium. *J. Immunol.* **147**, 3244
- Salzman, G.C., Mullaney, B.J., Price, B.J. (1979).** Lightscattering approaches to cell characterization. In: *Flow cytometry and sorting*. Melamed, M.R., Mullaney, P.F., Mendelsohn, M.L. (eds.). John Wiley and sons. New York.
- Smith, K. A. (1988).** Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* **240**, 1169
- Schmitt-Verhulst, A. M., Guimezanes, A., Boyer, C., Poenie, M., Tsien, R., Buferne, M., Hua, C., Leserman, L. (1987).** Pleiotropic loss of activation pathways in a T-cell receptor alpha-chain deletion variant of a cytolytic T-cell clone. *Nature* **325**, 628
- Schraven, B., Roux, M., Hutmacher, B., Meuer, S.C. (1989).** Triggering of the alternative pathway of the human T cell activation involves members of T 200 family of glycoproteins. *Eur. J. Immunol.* **19**, 397

- Schuman, E. M., Meffert, M. K., Schulman, H., Madison, D. V. (1994).** An ADP-ribosyltransferase as a potential target for nitric oxide action in hippocampal long-term potentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **91**, 11958
- Schwitzer, R., Hedrich, H. J., Wonigeit, K. (1989).** T cell differentiation in athymic nude rats (rnu/rnu): demonstration of a distorted T cell subset structure by flow cytometry analysis. *Eur. J. Immunol.* **19**, 1841
- Scott, R. E., Perkins, R. G., Zschunke, M. A., Hoerl, B. J., Maercklein, P. B. (1979).** Plasma membrane vesiculation in 3T3 and SV3T3 cells. I. Morphological and biochemical characterization. *J. Cell. Sci.* **35**, 229
- Seaman, W. E., Niemi, E. C., Stark, M. R., Goldfien, R. D., Pollock, A. S., Imboden, J. B. (1991).** Molecular cloning of gp42, a cell-surface molecule that is selectively induced on rat natural killer cells by interleukin 2: glycolipid membrane anchoring and capacity for transmembrane signaling. *J. Exp. Med.* **173**, 251
- Selvaraj, P., Rosse, W. F., Silber, R., Springer, T. A. (1988).** The major Fc receptor in blood has a phosphatidylinositol anchor and is deficient in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Nature* **333**, 565
- Siebert, P.D. und Carrick, (1992).** Competitive PCR. *Nature* **359**, 557
- Siegel, J. P., Sharon, M., Smith, P. L., Leonard, W. J. (1987).** The IL-2 receptor beta chain (p70): role in mediating signals for LAK, NK, and proliferative activities. *Science* **238**, 75
- Siegling, A., Lehmann, M., Platzer, C., Emmrich, F., Volk, H.-D. (1994).** A novel multispecific fragment for quantitative PCR analysis of cytokine gene expression in rats. *J. Immunol. Methods.* **177**, 23
- Siliciano, R. F., Pratt, J. C., Schmidt, R. E., Ritz, J., Reinherz, E. L. (1985).** Activation of cytolytic T lymphocyte and natural killer cell function through the T11 sheep erythrocyte binding protein. *Nature* **317**, 428

- Simons, K., Ikonen, E. (1997).** Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569
- Soloski, M. J., Vernachio, J., Einhorn, G., Lattimore, A. (1986).** Qa gene expression: biosynthesis and secretion of Qa-2 molecules in activated T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **83**, 2949
- Soloski, M. J., Lattimore, A., Hereld, D., Krakow, J. L., Low, M. G., Einhorn, G. (1988).** Further characterization of the membrane anchor found on the tissue-specific class I molecule Qa2. *J. Immunol.* **140**, 3858
- Takada, T., Iida, K., Moss, J. (1994).** Expression of NAD glycohydrolase activity by rat mammary adenocarcinoma cells transformed with rat T cell alloantigen RT6.2. *J. Biol. Chem.* **269**, 9420
- Taniguchi, M., Tsuchiya, M., Shimoyama, M. (1993).** Comparison of acceptor protein specificities on the formation of ADP-ribose.acceptor adducts by arginine-specific ADP-ribosyltransferase from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum with those of the enzyme from chicken peripheral polymorphonuclear cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1161**, 265.
- Tangye, S.G., Lazetic, E., Woolatt, E., Sutherland, G.R., Lanier, L.L., Phillips, J.H. (1999).** Human 2B4, an activating NK cell receptor, recruits the protein tyrosine phosphatase SHP-2 and the adaptor signaling protein SAP. *J.Immunol.* **162**, 6981
- Tay, C.H.Szomolanyi-Tsuda, E., Welsh, R.M. (1998).** Control of infections by NK Cells. In: *Specificity, Function, and Development of NK Cells*. Kärre, K. and Colonna, M., (eds). Berlin, Springer, 193
- Thiele, H.-G., Koch, F., Kasha, A. (1987).** Postnatal distribution profiles of Thy-1<sup>+</sup> and RT6<sup>+</sup> cells in peripheral lymph nodes of DA rats. *Transplant. Proc.* **19**, 3157
- Thiele, H. G., Haag, F., Nolte, F. (1993).** Asymmetric expression of RT6.1 and RT6.2 alloantigens in (RT6a x RT6b)F1 rats is due to a pretranslational mechanism. *Transplant. Proc.* **25**, 2786

- Timonen, T., Ortaldo, J.R., Hernberman, R.B. (1981).** Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer cells. *J. Exp. Med.* **153**, 569
- Tite, J.P. (1990).** Evidence for a role for TNF- $\alpha$  in cytolysis by CD4+ class II MHC-restricted cytotoxic T cells. *Immunology* **71**, 208
- Tovey, E.R., Baldo, B.A.. (1987).** Comparison of semi-dry and conventional tank-buffer electrotransfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose membranes. *Electrophoresis* **8**, 384
- Trauth, B.C., Klas, C., Peters, A.M.J., Matzku, S., Moller, P., falk, W., Debatin, K.-M., Krammer, P.H. (1989).** Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* **245**, 301
- Trinchieri, G. (1989).** Biology of the natural killer cells. *Adv. Immunol.* **47**, 187
- Trinchieri, G. (1997).** Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ ). *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 17
- Tsujioka, H., takami, N., Misumi, Y., Ikehara, Y. (1999).** Intracellular cleavage of glycosylphosphatidylinositol by Phospholipase D induces activation of protein kinase C $\alpha$ . *Biochem. J.* **342**, 449
- Vaage, J.T., Naper, C. Lovic, G., Lambracht, D., Rehm, A., Hedrich, H.J., Wonigeit, K., Rolstad, B. (1994).** Control of rat natural killer cell-mediated allorecognition by a major histocompatibility complex region encoding nonclassical class I antigens. *J.Exp.Med.* **180**, 641
- Vakeva, A.M., Jauhianem, M., Ehnholm, C., Lehto, T., Meri, S. (1994).** High-density lipoproteins can act as carriers of glycoposphoinositol lipid-anchored CD59 in human plasma. *Immunology* **82**, 28.



- Velette, A., Koryk, I. D., Horak, E. M., Bookman, M.A., Bolen, J. B. (1988).** Alteration of the lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (p56lck) during T cell activation. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 4353.
- Vicar, D.W., Blake, T.B., Burns, C.M., Conlon, K.C., Ortaldo, J.R., O' Shea, J.J. (1996).** Differential basal protein tyrosine phosphorylation in natural killer (NK) and T cells: a biochemical correlate of lymphoid functional activity. *Cell. Immunol.* **169**, 302
- Vivier, E., Morin, P.M., O'Brien, S.F., Schlossman, S.F., Anderson, P. (1991).** CD2 is functionally linked to the  $\zeta$ -natural killer receptor complex. *Eur.J.Immunol.* **21**, 1077
- Vujanovic, N.L, Herberman, R.B., maghazachi, A.A., Hiserodt, J.C. (1988).** Lymphokine activated killer cells in the rat. III. *J.Exp.Med.* **167**, 15
- Vujanovic, N. L., Rabinowich, H., Lee, Y. J., Jost, L., Herberman, R. B., Whiteside, T. L. (1993).** Distinct phenotypic and functional characteristics of human natural killer cells obtained by rapid interleukin 2-induced adherence to plastic. *Cell. Immunol.* **151**, 133
- Waite, D. J., Handler, E. S., Mordes, J. P., Rossini, A. A., Greiner, D. L. (1993).** The RT6 rat lymphocyte alloantigen circulates in soluble form. *Cell. Immunol.* **152**, 82
- Walker, W., Aste-Amezaga, M., Kastelein, R.A., Trinchieri, G., Hunter, C.A. (1999).** IL-18 and CD28 use distinct molecular mechanisms to enhance NK cell production of IL-12-induced IFN- $\gamma$ . *J. Immunol.* **162**, 5894
- Waite, D. J., Appel, M. C., Handler, E. S., Mordes, J. P., Rossini, A. A., Greiner, D. L. (1996).** Ontogeny and immunohistochemical localization of thymus-dependent and thymus-independent RT6+ cells in the rat. *Am. J. Pathol.* **148**, 2043
- Wang, A.M., Doyle, M.V., Mark, D.F.. 1989.** Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 9717

- Wang, J., Nemoto, E., Kots, A. Y., Kaslow, H. R., Dennert, G. (1994).** Regulation of cytotoxic T cells by ecto-nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) correlates with cell surface GPI-anchored/arginine ADP-ribosyltransferase. *J. Immunol.* **153**, 4048
- Wang, J., Nemoto, E., Dennert, G. (1996).** Regulation of CTL by ecto-nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) involves ADP-ribosylation of a p56lck-associated protein. *J. Immunol.* **156**, 2819
- Weber, K., Osborne, M. (1969).** The reliability of molecular weight determination by dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406
- Weiss, A., Imboden, J.B. (1987).** Cell surface molecules and early events involved in human T lymphocyte activation. *Adv. Immunol.* **41**, 1
- Weng, B., Thompson, W.C., Kim, H.-J., Levine, R.L., Moss, J. (1999).** Modification of the ADP-ribosyltransferase and NAD glycohydrolase activities of a mammalian transferase (ADP-ribosyltransferase 5) by auto-ADP-ribosylation. *J. Biol. Chem.* **274**, 31797
- Wirthmüller, U., Kurosaki, T., Murakami, M.S., Ravetch, J.V. (1992).** Signal transduction by Fc $\gamma$ RIII (CD16) is mediated through the  $\gamma$  chain. *J. Exp. Med.* **175**, 1381
- Wonigeit, K. (1979a).** Definition of lymphocyte antigens in Rats: RT-Ly-1, RT-Ly-2, and a new MHC-linked antigen system. *Transpl. Proc.*, **6**, (2), 1334
- Wonigeit, K. (1979b).** Characterization of the RT-Ly-1 and RT-Ly-2 alloantigenic systems by congenic rat strains. *Transpl. Proc.*, **6**, (3), 1631
- Wonigeit, K., Schwinzer, R. (1987).** Polyclonal activation of rat T lymphocytes by RT6 alloantisera. *Transplant Proc* **19**, 296
- Wonigeit, K., Dinkel, A., Fangmann, J., Thude, H. (1997).** Expression of the ectoenzyme RT6 is not restricted to resting peripheral T cells and is differently regulated in normal peripheral T cells, intestinal IEL, and NK cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **419**, 229

- Yokoyama, W.M. (1998).** Natural killer cell receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 298
- Young, H.A., Ortaldo, J.R. (1987).** One signal requirement for interferon-gamma production by human large granular lymphocytes. *J.Immunol.* **139**, 724
- Zlatkine, P., Mehul, B., Magee, A. I. (1997).** Retargeting of cytosolic proteins to the plasma membrane by the Lck protein tyrosine kinase dual acylation motif. *J. Cell. Sci.* **110**, 673
- Zolkiewska, A., Nightingale, M. S., Moss, J. (1992).** Molecular characterization of NAD:arginine ADP-ribosyltransferase from rabbit skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 11352
- Zolkiewska, A., Moss, J. (1993).** Integrin alpha 7 as substrate for a glycosylphosphatidylinositol- anchored ADP-ribosyltransferase on the surface of skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 25273

## Lebenslauf

Name: Alexandra Kiefeld

Geburtsdatum: 25.8.1966

Geburtsort: Hamburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1972 - 1973: Grundschule Berghausen, Baden-Württemberg

1973 - 1976: Grundschule Hemmingen-Westerfeld, Niedersachsen

1976 - 1985: Kaiser-Wilhelm-Gymnasium, Hannover

Juni 1985: Abschluß mit Abitur

Berufsausbildung: 1985 - 1987: Berufsfachschule B. Blindow,

Ausbildung zur biologisch technischen Assistentin,

Abschluß: Juni 1987

Oktober 1988 - April 1996: Studiengang Biochemie/Diplom

Februar 1996: Diplom-Prüfungen in den Fächern Biochemie, Biophysikalische Chemie und Immunologie

April 1996: Abgabe der Diplomarbeit mit dem Thema „Induktion der frühen lichtinduzierbaren Proteine in Gerste (*Hordeum vulgare*, L.) durch eine kombinierte Hitze- und Lichtstreß-Behandlung“, angefertigt im Institut für Botanik der Universität Hannover unter Betreuung von Herrn Prof. K. Kloppstech

April 1996 - April 1999: Stipendiatin des Graduiertenkollegs „Molekulare Pathophysiologie des Zellwachstums“ (Sprecher: Prof. Dr. R.E. Schmidt) im Transplantationslabor der Klinik für Visceral- und Transplantationschirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover mit dem Ziel der Promotion zum Dr. rer. nat.

Mai 1999 - Juni 2000: wissenschaftliche Mitarbeiterin im Transplantationslabor der Klinik für Visceral- und Transplantationschirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover

## Danksagung

Herrn Dr. K. Wonigeit, Leiter des Transplantationslabores der Klinik für Visceral- und Transplantationschirurgie an der Medizinischen Hochschule Hannover, danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und die theoretische Betreuung dieser Arbeit. Außerdem danke ich Herrn Dr. Wonigeit für die Möglichkeit, diese Arbeit als Stipendiatin im Graduiertenkolleg „Molekulare Pathophysiologie des Zellwachstums“ (Sprecher Prof. Dr. R.E. Schmidt) durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. R. Pichlmayr (†) und Herrn Prof. Dr. J. Klempnauer, Leiter der Klinik für Visceral- und Transplantationschirurgie an der Medizinischen Hochschule Hannover, danke ich für die Bereitstellung des ausgezeichnet ausgestatteten Arbeitsplatzes im Transplantationslabor der Klinik.

Herrn Prof. Dr. W. Müller, der mir während des gesamten Studiums und der Promotion stets mit Rat und Tat zur Seite stand, gilt mein besonderer Dank. Seine mitreißenden Vorlesungen haben mir einen besonders faszinierenden Zugang zu dem Gebiet der Biochemie eröffnet. Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. W. Müller für die Übernahme des Referates.

Herrn Prof. Dr. M. Martin danke ich herzlich für die Übernahme des Korreferates. Seine ausgesprochen hilfreichen Anregungen beim Verfassen dieser Arbeit haben entscheidend zu ihrem Gelingen beigetragen.

Bei Herrn Dr. B. Bortfeldt, Dr. T. Ebensen und Dr. H. Dulat bedanke ich mich herzlichst für die inspirierenden fachlichen Diskussionen und das freundschaftliche Arbeitsklima.

Herrn Prof. Dr. Dr. B. Tümmler und Herrn Prof. Dr. R.E. Schmidt danke ich für die persönliche Betreuung im Rahmen des Graduiertenkollegs.

Den Mitgliedern des Transplantationslabores danke ich für die gute Zusammenarbeit. Bei Frau Andrea Deiwick und Frau Corinna Lücke bedanke ich mich für ihre stetige Hilfsbereitschaft und ihre kompetente praktische Unterstützung.

Herrn Dr. F. Rhode danke ich für die praktische Einführung in die kompetitive RT-PCR-Technik.

Meiner Mutter danke ich für ihre liebevolle persönliche Unterstützung.

