

**Studien zur Funktion von murinem CD155 bei
der Migration von Leukozyten und der Entstehung
einer humoralen Immunantwort**

Von der naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Biochem. Michael Klaus Maier
geboren am 15.12.1977, in Wertheim

2007

Referent: Prof. Dr. Walter Müller

Koreferent: Prof. Dr. Reinhold Förster

Tag der Promotion: 12. Dezember 2007

Inhaltsverzeichnis

INHALT	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	III
ZUSAMMENFASSUNG	IV
SUMMARY	V
ABKÜRZUNGEN	VI
1. EINLEITUNG	1
1.1. Migration von Leukozyten	1
1.1.1. Chemokine und Zelladhäsionsmoleküle	1
1.1.2. Mechanismus der transendothelialen Migration	3
1.2. Entstehung einer humoralen Immunantwort	4
1.2.1. Das Darm-assoziierte lymphatische Gewebe	4
1.2.2. Entstehung von Antikörper-sezernierenden Plasmazellen	6
1.3. Der humane Poliovirusrezeptor (CD155)	8
1.3.1. Molekulare Struktur und Expression.....	8
1.3.2. hCD155-Liganden.....	9
1.4. murines CD155 und seine Interaktionspartner	14
1.5. Zielsetzung	15
2. MATERIAL UND METHODEN	16
2.1. Material	16
2.1.1. Geräte	16
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	17
2.1.3. Chemikalien	17
2.1.4. Adjuvantien	18
2.1.5. Puffer und Lösungen	18
2.1.6. Seren und Medien.....	20
2.1.7. Kits	22
2.1.8. Enzyme.....	22
2.1.9. Größenmarker.....	22
2.1.10. Vektoren	22
2.1.11. cDNA-Konstrukte	22
2.1.12. Oligonukleotide.....	23
2.1.13. Antikörper und Konjugate.....	23
2.2. Methoden	25
2.2.1. Molekularbiologische Methoden.....	25
2.2.2. Zellkultur	29
2.2.3. Proteinbiochemische Methoden	31
2.2.4. Immunologische Methoden.....	33
2.2.5. Mausstämme und deren Haltung.....	41

3. ERGEBNISSE	42
3.1. Generierung und Charakterisierung von anti-mCD155-Antikörpern	42
3.1.1. Generierung von anti-CD155-Antikörpern	42
3.1.2. Klonierung von chimären CD155-Proteinen.....	44
3.1.3. Epitopkartierung der anti-CD155-Antikörper.....	45
3.2. Expressionsmuster von murinem CD155.....	46
3.3. Murine Expression der CD155-Liganden CD96 und CD226.....	51
3.4. Interaktion zwischen murinem CD155 und CD96.....	53
3.4.1. CD96 bindet die erste Ig-ähnliche Domäne des CD155	53
3.4.2. Blockierung der CD96-CD155-Interaktion durch anti-CD155-Antikörper.....	54
3.5. Untersuchung der Migration von CD155-defizienten Lymphozyten	56
3.5.1. Analyse der Migration unter nicht-inflammatorischen Bedingungen.....	56
3.5.2. Untersuchung der Migration unter inflammatorischen Bedingungen.....	59
3.5.3. Anwendung weiterer Entzündungsmodelle	63
3.5.4. Untersuchung einer DTH-Reaktion in CD155 ^{-/-} Mäusen.....	63
3.6. Untersuchung der humoralen Immunantwort in CD155^{-/-} Mäusen.....	64
3.6.1. Bestimmung der Gesamt-Immunglobulin-Spiegel in CD155 ^{-/-} Mäusen.....	64
3.6.2. Oral immunisierte CD155 ^{-/-} Tiere zeigen eine verminderte humorale Antwort	65
3.6.3. Intraperitoneale und subkutane Immunisierungen zeigen keine Unterschiede zwischen CD155 ^{-/-} und Wildtyp-Mäusen.....	68
3.6.4. CD155 ^{-/-} Mäuse entwickeln eine normale IgM-Antwort auf TI-Antigene	69
3.6.5. Orale Immunisierung mit lebenden, attenuierten Salmonellen.....	70
4. DISKUSSION	72
4.1. Expression von murinem CD155, CD96 und CD226.....	72
4.1.1. Expression auf Leukozyten und Endothelien.....	72
4.1.2. Expression auf B-Zell-Subpopulationen	74
4.2. Interaktion von mCD155 und mCD96	75
4.3. Die Rolle von mCD155 bei der Migration von Leukozyten	76
4.3.1. Migration unter nicht-inflammatorischen Bedingungen	76
4.3.2. CD155-IgG-induzierte Leukozytopenie.....	77
4.3.3. Migration unter inflammatorischen Bedingungen	78
4.4. Einfluss der CD155-Defizienz auf die humorale Immunantwort	79
5. AUSBLICK.....	83
6. LITERATUR.....	85
7. ANHANG	91

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Antigenaufnahme und -erkennung im Darm (modifiziert nach A. Mowat).	5
Abb. 2: Interaktionen des humanen CD155.	9
Abb. 3: Bindung von anti-CD155-Antikörpern an ektopisch exprimiertes CD155.....	43
Abb. 4: Skizze der chimären CD155-Proteine.	45
Abb. 5: Epitopkartierung der CD155-Antikörper mit Hilfe der chimären CD155-Proteine. ...	46
Abb. 6: Untersuchung der mCD155-Expression auf Monozyten und Neutrophilen.	48
Abb. 7: CD155-Expression auf verschiedenen B-Zell-Subpopulationen.	49
Abb. 8: Expression von mCD155 auf endothelialen Gefäßen der MLN.	50
Abb. 9: Expression von CD96 und CD226 auf Monozyten und Neutrophilen.....	51
Abb. 10: Expression von CD96 und CD226 auf B-Zell-Subpopulationen.	52
Abb. 11: Murines CD96 bindet CD155 innerhalb dessen erster Domäne.	53
Abb. 12: Blockierung der CD155-CD96-Interaktion durch anti-CD155-Antikörper.....	55
Abb. 13: Adoptiver Transfer von Wildtyp- und CD155 ^{-/-} Zellen in wt und CD155 ^{-/-} Tiere....	57
Abb. 14: FTY720-induzierte Lymphopenie im Blut von Wildtyp- und CD155 ^{-/-} Mäusen.	58
Abb. 15: Modell der Zymosan-induzierten Peritonitis in CD155-IgG-behandelten Mäusen. .	60
Abb. 16: Zymosan-induzierte peritoneale Entzündung in Wildtyp- und CD155 ^{-/-} Mäusen. ...	61
Abb. 17: Depletion von Leukozyten nach intravenöser CD155-IgG-Applikation.	62
Abb. 18: Bestimmung des Gesamt-Ig-Gehalts in Wildtyp- und CD155 ^{-/-} Tieren.....	64
Abb. 19: Verlauf der spezifischen IgG1-Antwort im Serum immunisierter Tiere.	65
Abb. 20: Oral immunisierte CD155 ^{-/-} Mäuse zeigen eine verminderte Immunantwort.....	66
Abb. 21: Die Anzahl der spezifischen Plasmazellen ist in CD155 ^{-/-} Mäusen nicht reduziert..	67
Abb. 22: Intraperitoneale Immunisierung von Wildtyp- und CD155 ^{-/-} Mäusen.....	68
Abb. 23: Immunisierung mit einem T-Zell-unabhängigen Antigen.	69
Abb. 24: Antikörper-Antwort nach oraler Immunisierung mit lebenden Salmonellen.....	70

Zusammenfassung

CD155 ist ein Immunglobulin-ähnliches Zelladhäsionsmolekül, das ursprünglich als Poliovirusrezeptor identifiziert wurde. Es kann an der Zelloberfläche von Endothelien, Keimzentrums-B-Zellen, folliculären dendritischen Zellen und verschiedenen Epithelzellen des Darm-assoziierten lymphatischen Gewebes detektiert werden. Über seine *in trans* Interaktionen mit CD226, CD96, Nectin-3, Vitronectin und Fibronectin übt es vielfältige Funktionen aus, von denen einige mit dem Immunsystem verknüpft sind. Humanes CD155 ist unter anderem an Prozessen der Zell-vermittelten Zytotoxizität, der Zell-Beweglichkeit sowie bei der transendothelialen Migration von Monozyten involviert. Nach der Identifikation des murinen homologen Proteins konnte gezeigt werden, dass das Expressionsmuster im Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe mit dem des humanen Proteins weitgehend überlappt. Darüber hinaus sind die Interaktionen mit allen untersuchten Bindungspartnern konserviert.

Um die Expression genauer zu analysieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit monoklonale Antikörper gegen murines CD155 erzeugt und charakterisiert. Mit ihrer Hilfe wurde das murine Protein auf Monozyten, Endothelien und B-Zell-Subpopulationen – insbesondere auf Plasmazellen – nachgewiesen. Unter Benutzung ebenfalls neu generierter anti-CD96 und anti-CD226-Antikörper konnte auch das charakteristische Expressionsmuster dieser CD155-Liganden näher bestimmt werden.

Die Verwendung von CD155-defizienten Mäusen ermöglichte Untersuchungen der Migration von Leukozyten unter inflammatorischen und nicht-inflammatorischen Bedingungen *in vivo*. Soweit hier untersucht zeigte murines CD155 keinen Einfluss auf diese Prozesse. Da sich die Funktionsanalysen im humanen Organismus jedoch auf *in vitro*-Versuche stützen, ist diese Diskrepanz unter Umständen durch *in vivo* ablaufende kompensatorische Mechanismen zu erklären.

Aufgrund der charakteristischen Expression von murinem CD155 auf T- und B-Lymphozyten sowie folliculären dendritischen Zellen wurde die Generierung einer humoralen Immunantwort in CD155-defizienten Mäusen untersucht. Während systemische Immunisierungen keine Unterschiede erkennen ließen, zeigten oral immunisierte CD155^{-/-} Mäuse reduzierte Mengen spezifischer IgA- und IgG-Antikörper. Im Gegensatz dazu war die entwickelte IgM-Antwort unbeeinflusst. Da zudem die Anzahl der B-Zellen in der Lamina propria und den mesenterialen Lymphknoten normal waren, zeigen die Tiere möglicherweise einen Defekt beim Isotyp-Klassenwechsel der Antikörper.

Schlagerworte: CD155, CD226, CD96, transendotheliale Migration, humorale Immunantwort

Summary

CD155 is an immunoglobulin-like cell adhesion molecule, originally identified as the receptor for poliovirus. It is expressed on endothelial cells, germinal center B cells, follicular dendritic cells and various epithelial cells of the gut-associated lymphoid tissue. The human protein exerts multiple functions via its interactions *in trans* with CD226, CD96, nectin-3, vitronectin, and fibronectin. Some of these are also involved in immunologically relevant processes like cell-mediated cytotoxicity, cell motility or the transendothelial migration of monocytes. The expression pattern of recently identified murine CD155 reveals a high degree of conservation between human and mouse. Furthermore, all known interactions are conserved in mice as well.

For a more detailed analysis of the murine CD155 expression pattern, monoclonal antibodies were generated and characterized in this project. They were able to detect the CD155 protein on monocytes, endothelial cells and B cell subpopulations, especially plasma cells. Moreover, the expression patterns of murine CD96 and CD226 were investigated regarding these cell types.

The use of CD155-deficient mice allowed the investigation of leukocyte migration under inflammatory and non-inflammatory conditions *in vivo*. Surprisingly, in none of these models a significant impact of CD155 deficiency could be detected. The discrepancy between human and mouse possibly indicates a lack of conservation between the two species regarding this function. However, all human studies are based on *in vitro* assays, thus other mechanisms may account for the functional compensation of missing CD155 *in vivo*.

With regard to the expression of CD155 on T and B lymphocytes as well as on follicular dendritic cells, CD155-deficient mice were analyzed for their capacity to mount a humoral response. While systemic challenges revealed no differences, orally administered antigen evoked a reduced production of specific IgG- and IgA- antibodies in these animals when compared to wild type controls. In contrast, IgM-levels were not affected in these animals. Furthermore, the quantity of specific plasma cells in the lamina propria and in the mesenteric lymph nodes was comparable to that of wild type mice. Therefore, murine CD155 might be involved in processes like isotype class switching.

Keywords: CD155, CD96, CD226, transendothelial migration, humoral immune response

Abkürzungen

AJ	<i>adherens junction</i>	M _{inf}	inflammatorische Monozyten
APC	<i>antigen-presenting cell</i>	MLN	mesenteriale Lymphknoten
Bio	Biotin	M _{res}	residente Monozyten
CAM	<i>cell adhesion molecule</i>	mRNA	<i>messenger RNA</i>
CT	Choleratoxin	MZB	Marginalzonen-B-Zellen
CTL	cytotoxischer Lymphozyt	N	Neutrophile
Cy3	Carbocyanin 3	NP-CGG	Nitophenyl-konjugiertes Hühner- γ -Globulin
Cy5	Indodicarbocyanin		
D1 / 2 / 3	Domäne 1 / 2 / 3	PB	Plasma-B-Zelle
DAM	DNA-Adenin-Methylase	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
DC	dendritische Zelle	PE	Phycoerythrin
dH ₂ O	destilliertes Wasser	PerCP	Peridin-Chlorophyll-Protein
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>	PFA	Paraformaldehyd
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
EZM	extrazelluläre Matrix	PNA	<i>peanut agglutinin</i>
FAE	Follikel-assoziiertes Epithel	RNA	<i>ribonucleic acid</i>
FDC	follikuläre dendritische Zelle	pLN	periphere Lymphknoten
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat	PP	Peyersche Platten
FKS	Fötales Kälberserum	P/S	Penicillin/Streptomycin- Stammlösung
foB	follikuläre B-Zelle		
FSC	<i>forward scatter</i>	PV	Poliovirus
GALT	<i>gut-associated lymphoid tissue</i>	PVR	Poliovirus-Rezeptor (CD155)
hCD155	humanes CD155	rCD155	Ratten-CD155
HEV	<i>high endothelial venule</i>	rpm	<i>rotations per minute</i>
HRPO	<i>horseradish peroxidase</i>	RT	Raumtemperatur
huAlbumin	humanes Albumin	SA	Streptavidin
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>	s.c.	subkutan
IEL	intraepitheliale Lymphozyten	sIgA	sezerniertes (intestinales) IgA
Ig	Immunglobulin	SILT	<i>solitary intestinal lymphoid tissue</i>
Ig-CAM	Immunglobulin-ähnliche Zelladhäsionsmoleküle	TD	<i>T cell-dependent</i>
ILF	isolierte lymphoide Follikel	TEM	transendotheliale Migration
i.p.	intraperitoneal	TI	T-Zell-unabhängig
KZB	Keimzentrums-B-Zelle	SLO	sekundäre lymphatische Organe
LP	Lamina propria	SSC	<i>side scatter</i>
LPL	Lamina propria Lymphozyten	TNP	2,4,6-Trinitrophenol
LPS	Lipopolysaccharid	Vn	Vitronektin
mAK	monoklonaler Antikörper	Wt (+/+)	Wildtyp
mCD155	murines CD155	ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Das Immunsystem dient der Verteidigung des Organismus gegen eindringende Pathogene sowie körpereigene entartete Zellen. Dies wird über das ebenso komplexe wie effiziente Zusammenwirken verschiedener hochspezialisierter Zellen in unterschiedlichsten Regionen des Organismus ermöglicht. Aufgrund der Vielzahl der spezialisierten Gewebe kommt der Wanderung und Rekrutierung von Immunzellen zu ihren Bestimmungsorten eine zentrale Bedeutung zu. Durch das perfekt organisierte Zusammenspiel aller beteiligten Komponenten ist das Immunsystem in der Lage, auf unterschiedlichste Antigene zu reagieren.

1.1. Migration von Leukozyten

Die Migration von Immunzellen ist ein entscheidendes Kriterium, welches die effiziente Bekämpfung einer Vielzahl von Pathogenen ermöglicht. Beispielsweise residieren Antigen-präsentierende Zellen (APC) bis zum Zusammentreffen mit einem Antigen in peripheren Geweben. Dieses wird dann von der Zelle aufgenommen und über lymphatische Gefäße zum drainierenden Lymphknoten transportiert, wo es in prozessierter Form Lymphozyten präsentiert wird. Andererseits können z.B. Monozyten und andere Zellen aus dem Blut zu Infektionsherden in der Peripherie rekrutiert werden. Für diese Prozesse sind Interaktionen von „Lockstoffen“ sog. Chemokinen mit ihren Rezeptoren sowie Wechselwirkungen einer Vielzahl von Adhäsionsmolekülen von entscheidender Bedeutung.

1.1.1. Chemokine und Zelladhäsionsmoleküle

Chemokine sind aus etwa 50 bis 120 Aminosäuren bestehende Proteine, die nach ihrer Sezernierung chemotaktisch wirken können. Im Zusammenspiel mit ihren Rezeptoren sind sie bereits bei der Entwicklung des Immunsystems beteiligt [1]. Im adulten Organismus organisieren Chemokine das gewebespezifische „*Homing*“ von Leukozyten [2]. Dabei steuern sie nicht nur die Rekrutierung der Zellen in bestimmte Organe, sondern auch ihre genaue Lokalisierung innerhalb dieser. Eines von vielen Beispielen hierfür ist CCL25, welches IgA-, nicht aber IgM- oder IgG-sezernierende Plasmazellen in die Dünndarm-Mukosa rekrutiert [3]. Anhand ihrer Funktion werden Chemokine auch in eine konstitutive (homöostatische) und

eine induzierbare (inflammatorische) Gruppe unterteilt. Zur letzten Gruppe gehört unter anderem CCL2, welches eine Schlüsselrolle bei der Rekrutierung von inflammatorischen Monozyten spielt. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Chemokin an Entzündungsherden in der Haut freigesetzt wird und über die Lymphe zum drainierenden Lymphknoten gelangt. Dort wird es auf der luminalen Oberfläche von postkapillären Venolen mit hohem Endothel (*high endothelial venule*, HEV) präsentiert. Hier können dann durch die Wechselwirkung mit dem Chemokinrezeptor CCR2 inflammatorische Monozyten zur Extravasation veranlasst werden. Auf diese Weise kommt es regelrecht zu einer „Fernsteuerung“ der Monozyten [4]. Für eine genaue Übersicht über die derzeit bekannten Chemokine, deren Rezeptoren sowie die daraus resultierenden funktionellen Aspekte empfehlen sich die hervorragenden Übersichtsartikel von Charo et al. [5] und Campbell et al. [2].

Um Leukozyten am Ort ihrer Bestimmung die Adhäsion an die Gefäßwand und anschließende Extravasation zu ermöglichen, ist ein kontrolliertes Zusammenwirken vieler Adhäsionsmoleküle nötig. Zelladhäsionsmoleküle (*cell adhesion molecules*, CAMs) lassen sich in vier Untergruppen einteilen: Integrine, Selektine, Cadherine und Ig-ähnliche CAM (Ig-CAM) [6-8]. Die Familie der Ig-CAM, der auch CD155 zugeordnet werden kann, ist eine sehr heterogene Gruppe, für deren Mitglieder das Vorliegen mindestens einer Ig-ähnlichen Domäne typisch ist. Viele Ig-CAM enthalten darüber hinaus eine oder mehrere Fibronectin Typ-III Domänen. Der Aufbau dieser Adhäsionsmoleküle besteht aus der extrazellulären Domäne, welche die Ig-ähnlichen Domänen enthält, einer einfachen Transmembrandomäne und einem kurzen zytoplasmatischen Bereich [9]. Viele Ig-CAM sind für das Immunsystem von Bedeutung. Zu ihnen gehören die ICAM (*intercellular adhesion molecules*), die unter anderem auf Endothelien exprimiert werden und typischerweise mit Integrinen auf der Oberfläche von Leukozyten interagieren [10]. Eine weitere Untergruppe, die ebenfalls auf Endothelien detektierbar ist, sind VCAM (*vascular cell adhesion molecules*). Sie spielen eine besondere Rolle bei der Wanderung von Leukozyten zu Entzündungsorten [10]. Im Gegensatz dazu wurde beispielsweise PECAM-1 (*platelet/endothelial cell adhesion molecule*) zunächst über seine Interaktionen bei der Bildung von Zell-Zell-Kontakten von Endothelzellen identifiziert. Darüber hinaus ist es über homo- und heterophile Wechselwirkungen aber ebenfalls an der Zell-Migration und inflammatorischen Prozessen beteiligt [11, 12]. Da alle Ig-CAM auch eine intrazelluläre Domäne aufweisen, ist es wahrscheinlich, dass sie auch in der Lage sind, ihre Adhäsionsfunktion zu regulieren. Neben den hier aufgeführten Beispielen gehören noch weitere Molekülgruppen in die Familie der Ig-CAM. Entsprechend vielfältig sind die von ihnen ausgeübten biologischen Funktionen: Bereits bei der Embryonal-

entwicklung angefangen reichen sie über die Gewebsorganisation im adulten Organismus bis hin zur Zellwanderung und Signaltransduktion. Auch die anderen Untergruppen der Zelladhäsionsmoleküle zeichnen sich durch einzigartige Funktionen aus. Im Folgenden kann jedoch nur knapp auf ihre wichtigsten Eigenschaften eingegangen werden.

1.1.2. Mechanismus der transendothelialen Migration

Sowohl beim Ein- und Auswandern in/aus Lymphknoten, aber auch beim Übertritt ins periphere Gewebe müssen Endothelien überwunden werden. Um trotz starker Scherkräfte des fließenden Blutes (oder der Lymphe) an der Gefäßwand anzuheften und sie zu passieren, ist ein komplex regulierter, mehrstufiger Prozess notwendig, der als „transendotheliale Migration“ (TEM) bezeichnet wird. Grob vereinfacht lässt sich dieser in mehrere Stufen unterteilen: Zunächst sorgt die lockere Wechselwirkung von Selektinen oder niedrig-affinen Integrinen auf der Endotheloberfläche mit bestimmten Glykoproteinen auf der Seite der Leukozyten für eine reversible Adhäsion [13-15]. Dadurch „rollt“ der Leukozyt quasi am Endothel entlang. Der nächste Schritt wird dann von der entscheidenden Beeinflussung der auf der Gefäßseite präsentierten Chemokine geprägt. Nach der Bindung an ihre Rezeptoren verursachen sie bei Integrinen auf dem Leukozyten Konformationsänderungen, die dafür sorgen, dass die Integrine eine erhöhte Affinität und Avidität zu ihren Liganden zeigen. Durch die zusätzliche starke Interaktion der Integrine mit Adhäsionsmolekülen des Endothels wird das Rollen des Leukozyten beendet [16, 17]. Im Anschluss an diese „feste Anheftung“ kann die Immunzelle die Endothelschicht passieren, ein Vorgang der als „Diapedese“ bezeichnet wird. Auch dieser Prozess wird durch komplexe Interaktionen verschiedener Adhäsionsmoleküle ermöglicht. Unter anderem sind erneut Integrine, wie z.B. das LFA-1 (*leukocyte function-associated antigen 1*) oder Immunglobulin-ähnliche Moleküle wie CD31, beteiligt [18]. Im Gewebe angekommen, wandert der Leukozyt schließlich entlang eines Chemokingradienten zum Infektionsherd.

1.2. Entstehung einer humoralen Immunantwort

Die humorale Antwort dient in erster Linie dem Schutz der Extrazellulärräume vor Pathogenen und der Neutralisation von Toxinen. Die Träger der humoralen Immunantwort sind Antikörper, die von ausdifferenzierten B-Zellen, den Plasmazellen sezerniert werden. Ein Antikörper besteht aus der Antigen-bindenden variablen Region (V-Region) und einer konstanten Region (C-Region). Durch proteolytische Spaltung mit Papain entstehen zwei Fab-Fragmente (*fragment antigen binding*) und ein Fc-Fragment (*fragment crystallizable*), das die konstanten Regionen des Antikörpers enthält (zur detaillierten Struktur siehe [19]). Die konstante Region bestimmt die Effektorfunktion des Antikörpers. Anhand ihrer Fc-Struktur kann man die Immunglobuline in fünf Haupt-Klassen bzw. Isotypen (IgM, IgD, IgG, IgA und IgE) unterteilen. Diese sorgen für eine funktionelle Spezialisierung: Zum einen werden Fc-Fragmente unterschiedlicher Isotypen von verschiedenen Immuneffektorzellen über spezielle Fc-Rezeptoren erkannt. Zum anderen können Komplementproteine an den Fc-Teil eines Antigen-Antikörper-Komplexes binden und so die Komplement-Kaskade auslösen. Darüber hinaus können Antikörper in Abhängigkeit von ihrer Fc-Region über aktive Transportmechanismen in bestimmte Gewebe transportiert werden, in die sie sonst nicht gelangen würden. Durch die Bindung von Antikörpern an die Oberfläche von Mikroorganismen oder Toxinen werden diese durch Neutralisation, Opsonierung oder Aktivierung der Komplement-Kaskade bekämpft. Etwa 80 % aller Ig-sezernierenden Plasmazellen befinden sich in der Lamina propria des Darms [20].

1.2.1. Das Darm-assoziierte lymphatische Gewebe

Das Darm-assoziierte lymphatische Gewebe (GALT, *gut-associated lymphoid tissue*) kann funktionell in Bereiche unterteilt werden, in denen sich Effektorzellen aufhalten und hochorganisierte Gewebsstrukturen, in denen es zur Induktion der Immunantwort kommt. Die „Effektor-Orte“ sind das Epithel und die Lamina propria, in denen sich Lymphozyten in loser Struktur verteilt befinden und wo ein Großteil des IgA sezerniert wird. Die Generierung der Immunantwort findet stattdessen vorwiegend in den Peyerschen Platten (PP) und den mesenterialen Lymphknoten (MLN) statt (siehe Abb. 1). Wahrscheinlich sind auch kleinere Strukturen beteiligt, die als isolierte lymphoide Follikel oder treffender als „solitäres intestinales lymphatisches Gewebe“ (SILT) bezeichnet werden [21, 22]. Peyersche Platten sind Lymphknoten-ähnliche Gewebe, die sich direkt unter dem Darmepithel befinden. Sie

1 Einleitung

bestehen aus einem Kuppel-Bereich (*dome*) und darunter liegenden großen B-Zell-Follikeln und T-Zell-Zonen. Das lymphatische Gewebe wird vom Darmlumen nur durch eine einzige Zellschicht, dem Follikel-assoziierten Epithel (FAE) getrennt. Dieses spezielle Epithel enthält so genannte M-Zellen, die Pathogene binden und vermutlich ohne weitere Prozessierung aus dem Lumen in die PP transportieren können (Transzytose). Die mesenterialen Lymphknoten sind die größten Lymphknoten des Körpers. Über die afferente Lymphe können sowohl Zellen aus der Peripherie (z.B. der Lamina propria) als auch aus den Peyerschen Platten in die MLN gelangen. Zudem können im Blut zirkulierende Lymphozyten über HEV sowohl in die PP als auch in die MLN einwandern.

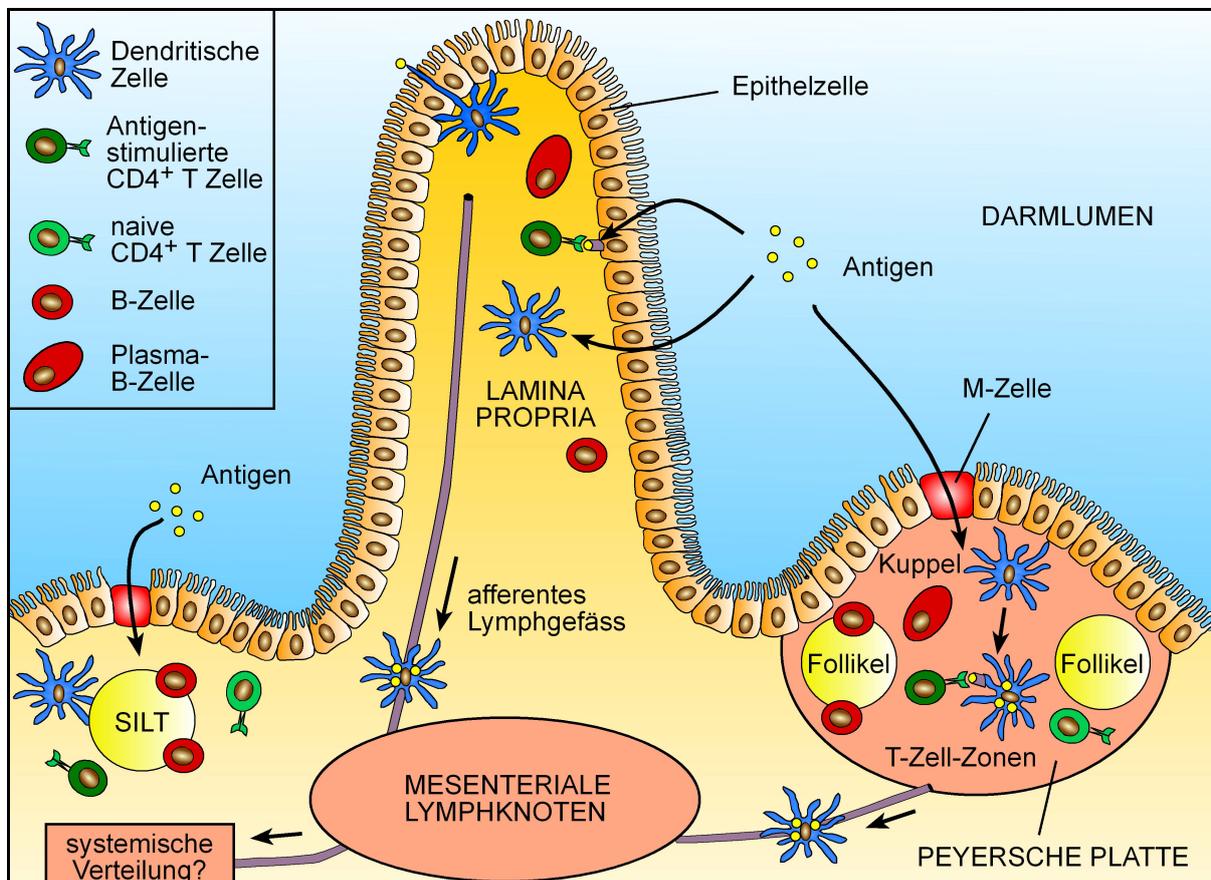


Abb. 1: Antigenaufnahme und -erkennung im Darm (modifiziert nach A. Mowat, [22]).

Die Abbildung zeigt verschiedene Routen der Antigenaufnahme und -verbreitung. Oral aufgenommene Antigene können von M-Zellen in Peyersche Platten transportiert und dort von dendritischen Zellen (DC) präsentiert werden. Antigen-beladene DC haben anschließend über die efferente Lymphe Zugang zu den mesenterialen Lymphknoten (MLN). Alternativ können Antigene auch passiv über das Epithel oder aktiv durch transepitheliale Fortsätze dendritischer Zellen in die Lamina propria (LP) gelangen. Dort ansässige DC sind in der Lage, sie über die afferente Lymphe direkt zu den MLN zu transportieren. Darüber hinaus können Antigene durch M-Zell-vermittelten Transport in solitäres intestinales lymphatisches Gewebe (SILT) gelangen. Eine weitere Alternative – die Antigenpräsentation durch Enterozyten – ist möglicherweise ebenfalls von Bedeutung. Im Gegensatz dazu hat der theoretisch denkbare passive Transport von freiem Antigen über Blutgefäße zu peripheren Lymphknoten vermutlich keine immunologische Relevanz (nicht gezeigt).

1.2.2. Entstehung von Antikörper-sezernierenden Plasmazellen

Plasmazellen sind sich nicht mehr teilende, (irreversibel) ausdifferenzierte B-Zellen, die auf die Sezernierung großer Mengen eines Immunglobulins spezialisiert sind. Abhängig von der Natur und der Dosis des Antigens, sowie dem Ort, an dem es auf einen Leukozyten trifft, entwickeln sich Plasmazellen aus verschiedenen Subtypen von B-Zellen [23].

Der häufigste B-Zell-Typ in Mensch und Maus sind die „konventionellen“ B2-Zellen. Trifft eine antigenerfahrene B-Zelle auf eine T-Helferzelle, die für das selbe Antigen spezifisch ist, wird die T-Helferzelle dazu angeregt, Zytokine freizusetzen, die wiederum die B-Zelle zur Proliferation und anschließenden Differenzierung in eine Plasmazelle anregen. Dabei bilden sie extrafollikuläre (Primär-) Foci aus Plasmazellen und sich noch teilenden Plasmablasten. Diese erste Phase der Immunantwort kann in Tierexperimenten bereits etwa zwei Tage nach der Immunisierung beobachtet werden [24].

Eine zweite Entwicklungsmöglichkeit der B2-Zellen, die T-Zell-Hilfe erhalten haben, ist die Etablierung einer Keimzentrumsreaktion in einem Follikel. Dort unterlaufen die B-Zellen viele Proliferationsrunden, die von somatischer Hypermutation begleitet sind. Dabei werden Punktmutationen in die variablen Regionen umgeordneter Gene eingeführt, die zu einer Verbesserung oder Verschlechterung der Antigenerkennung durch den B-Zell-Rezeptor führen. Während dieses Prozesses erhalten nur die Zellen wichtige Überlebens-Signale, die das Antigen mit der höchsten Affinität binden. Dieser Selektionsprozess wird auch als Affinitätsreifung bezeichnet. Darüber hinaus kann eine weitere Spezialisierung der Antikörper durch einen Isotyp-Klassenwechsel stattfinden (siehe 1.2 sowie den Übersichtsartikel von Li und Woo [25]). Diese hochkomplexen Prozesse, für deren Regulation unter anderem T-Helferzellen und follikuläre dendritische Zellen (FDC) von großer Bedeutung sind, führen zwar zu einer zeitverzögerten, aber dafür effektiveren humoralen Antwort. Eine dritte Besonderheit der Keimzentrumsreaktion ist die Generierung langlebiger Gedächtniszellen.

Ein weiterer B-Zell-Subtyp, der Antikörper-sezernierende Zellen generieren kann, sind B1-Zellen. Diese kommen in peritonealen und pleuralen Räumen sowie der Lamina propria vor. B1-Zellen haben mehrere Eigenschaften, die sie deutlich von den oben beschriebenen B2-Zellen unterscheiden. Der wohl markanteste Unterschied ist die Fähigkeit der B1-Zellen, auch ohne T-Zell-Hilfe auf bestimmte sog. T-Zell-unabhängige (TI) Antigene vom TI-2 Typ zu reagieren [26]. Solche Antigene sind oftmals bakterielle Polysaccharide, nach deren Erkennung B1-Zellen bereits vorhandene „natürliche“ IgM-Antikörper freisetzen, wodurch eine außerordentlich schnelle Reaktion auf die fremden Moleküle erfolgt. Darüber hinaus

scheinen sie aber auch in der Lage zu sein, Immunglobuline des IgA- und IgG3- Isotyps zu sezernieren [27].

Eine dritte Vorläuferpopulation für Plasmazellen sind Marginalzonen-B-Zellen (MZB) der Milz. Die fast nur dort vorkommenden Zellen zeigen die schnellste Differenzierung zu Plasmazellen. Auch sie reagieren ohne T-Zell-Hilfe auf TI-2-Antigene, können aber auch T-Zell-abhängige Antigene binden und T-Helferzellen präsentieren. Aufgrund ihrer Lokalisation sind sie prädestiniert, eine erste Reaktion auf im Blut enthaltene Antigene zu zeigen [28, 29].

Auch bei der Generierung einer intestinalen Immunantwort spielt die Migration der beteiligten Zellen eine große Rolle. In vielen Fällen wird Antigen von den M-Zellen weitertransportiert und an Antigen-präsentierende Zellen (vermutlich DC) im Epithel oder dem Kuppelbereich weitergegeben. Diese nehmen es auf, prozessieren es und wandern in T-Zell-Zonen, wo sie es den dortigen Lymphozyten präsentieren. In den Keimzentren der Peyerschen Platten kommt es zur oben beschriebenen Affinitätsreifung und zum Isotyp-Klassenwechsel. Lymphozyten, die in den PP Antigenkontakt hatten, gelangen über die Lymphe in die mesenterialen Lymphknoten, von wo aus sie nach unbestimmter Zeit schließlich über das Blut in die Darm-Mukosa gelangen (Abb. 1, [22]). Dabei spielt unter anderem das Integrin $\alpha_4\beta_7$ und seine Wechselwirkung mit mukosalem MAdCAM-1 (*mucosal addressin cell-adhesion molecule 1*) eine entscheidende Rolle [30]. Möglicherweise reifen B-Zell-Blasten erst nach dem Erreichen der Lamina propria zu Plasmazellen. Bei der Auslösung einer Immunantwort gegen oral aufgenommene Antigene sind der genaue Ort der Aufnahme sowie die Natur des Antigens von großer Bedeutung für die generierte Reaktion. Neben dem oben geschilderten Mechanismus sind auch alternative Routen denkbar. Diese wären unter anderem die Verteilung von Antigen über das Blut in periphere lymphatische Gewebe oder der Transfer zur Leber über die Portalvene. Die immunologische Relevanz dieser systemischen Verteilung erscheint jedoch sehr fraglich.

Obwohl mittlerweile viele Aspekte der intestinalen Immunabwehr bekannt sind, zeigen zahlreiche kontroverse Publikationen, dass es sich hier um hochkomplexe, noch nicht vollständig verstandene Vorgänge handelt. Beispielsweise konnte in Mäusen gezeigt werden, dass etwa 50 % der IgA-sezernierenden Zellen der Lamina propria von B1-Zellen des Peritoneums abstammen [31]. Darüber hinaus scheinen manche DC in der Lage zu sein, Isotyp-Klassenwechsel ohne T-Zell-Hilfe zu induzieren [32, 33]. Zudem unterstützen mehrere Veröffentlichungen die Theorie, dass der Isotyp-Klassenwechsel auch außerhalb der PP, möglicherweise unter Beteiligung von SILT stattfinden könnte [34, 35].

1.3. Der humane Poliovirusrezeptor (CD155)

1.3.1. Molekulare Struktur und Expression

Das Adhäsionsmolekül CD155 (PVR, Tage4, necl-5) wurde zunächst als Rezeptor für das Poliovirus identifiziert [36]. Es bildet zusammen mit den Nectinen 1 bis 4 eine Untergruppe von Ig-ähnlichen Transmembran-Glykoproteinen [37]. Sie alle eint die Struktur ihrer Ektodomänen, welche aus drei Ig-ähnlichen Domänen, einer V-Domäne (N-Terminal gelegen) und zwei C-Domänen besteht [36]. Das Gen für CD155 liegt auf dem humanen Chromosom 19 und enthält sieben Introns in der codierenden Region. Das alternative Spleißen seiner mRNA führt zur Ausbildung von vier Isoformen des Proteins: zwei membranständige (α , δ) und zwei lösliche Proteine (β , γ), denen die Transmembrandomäne fehlt [38]. Der humane Poliovirusrezeptor ist ein hoch glykosyliertes Protein, welches voll prozessiert eine apparente Masse von etwa 80 kD besitzt (membranständige Form) [39].

Mit Hilfe von quantitativer PCR konnte CD155-mRNA in vielen unterschiedlichen Geweben detektiert werden, darunter Leber, Pankreas, Plazenta, Lunge, Gehirn, Herz, Nieren und Testes. Sehr schwache Signale wurden unter anderem auch in Thymus, Darm, Milz und Leukozyten gemessen [36, 40]. Bei diesen Untersuchungen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass alle drei untersuchten Protein-Isoformen (α , β und γ) in sämtlichen getesteten Geweben in vergleichbarer Verteilung vorliegen. Dabei kommt der α -Form mit 40-60 % der größte Anteil zu. Spätere Studien belegten jedoch, dass die Oberflächen-Expression von CD155 nicht mit der in zahlreichen Geweben stattfindenden Transkription des Gens korreliert. Das CD155-Protein kann besonders deutlich auf Keimzentrums-B-Zellen (KZB) sowie FDC in Keimzentren der Mandeln nachgewiesen werden [41]. Darüber hinaus wurde CD155 in vielen Darmbereichen an der Zelloberfläche detektiert, darunter das Follikel-assoziierte Epithel (FAE) sowie nicht-epitheliale Zellen in Keimzentren der Peyerschen Platten [42]. Während im FAE CD155 auf beiden Seiten der Zellmembran detektiert werden kann, zeigt das benachbarte Gewebe nur Protein-Expression auf der basolateralen Seite. Interessanterweise findet sich auch auf der Oberfläche von M-Zellen und Endothelien CD155. Seine Expression auf M-Zellen stützt Vermutungen, dass das Poliovirus möglicherweise von diesen Zellen aufgenommen wird.

Im Rahmen weiterer Untersuchungen zeigte sich, dass CD155 darüber hinaus auf vielen Tumoren stark exprimiert ist [43]. Neben den membranständigen konnten auch die löslichen CD155-Formen auf Proteinebene nachgewiesen werden: Zellkulturüberstände sowie Humanserum und Cerebrospinalflüssigkeit enthalten signifikante Mengen der Proteine [40].

1.3.2. hCD155-Liganden

Im Gegensatz zu den ihm verwandten Nectinen, die vielfältige Funktionen im Bereich der Zelladhäsion, -migration und -polarisierung ausüben, zeigt CD155 keine homophilen *in trans* Interaktionen [44, 45]. Im Laufe der Zeit wurde jedoch eine wachsende Zahl an extrazellulären sowie intrazellulären Bindungspartnern identifiziert. Diese sowie die daraus resultierenden Funktionen werden im Folgenden, soweit bekannt, vorgestellt (siehe Abb. 2).

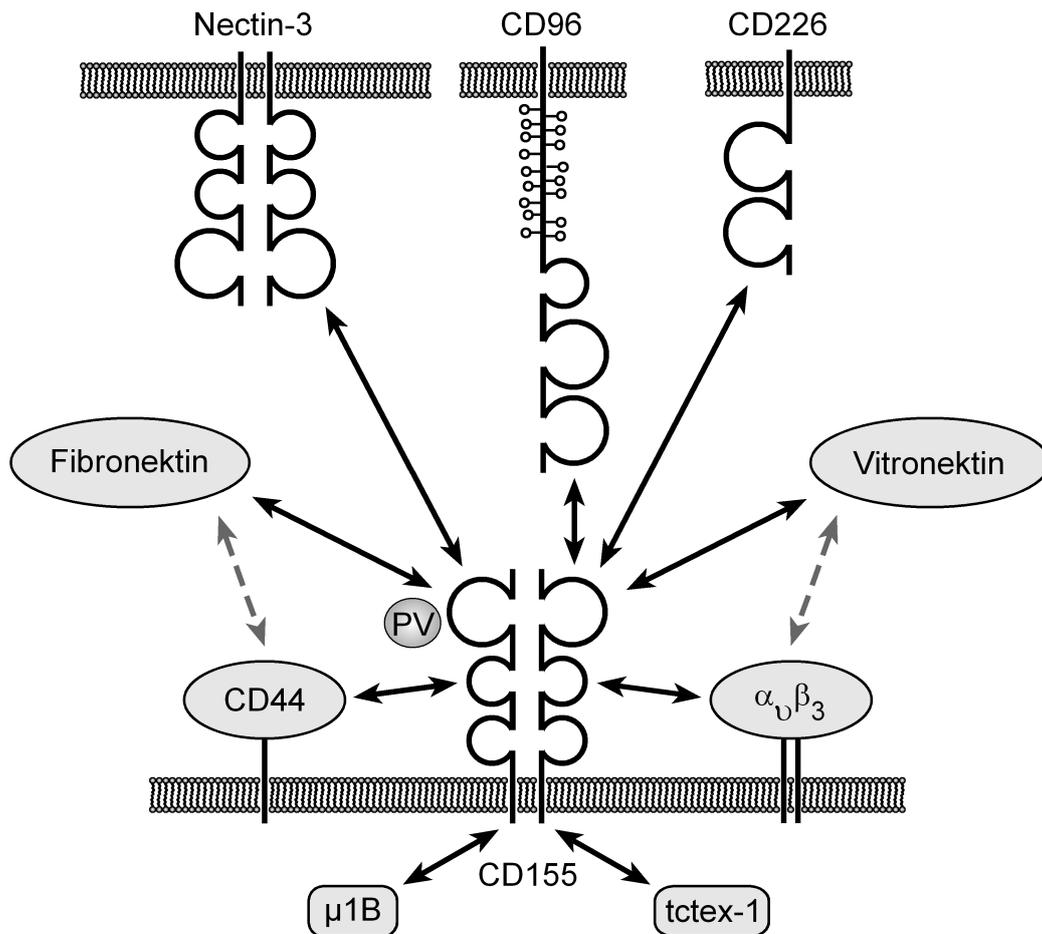


Abb. 2: Interaktionen des humanen CD155.

CD155 interagiert *in trans* mit den zellständigen Molekülen CD226, CD96 und Nectin-3. Darüber hinaus bindet es Proteine der extrazellulären Matrix wie Fibronektin und Vitronektin. CD155 kann *in cis* mit CD44 und dem $\alpha_v\beta_3$ -Integrin assoziieren. Intrazellulär sind Wechselwirkungen mit der $\mu 1B$ -Untereinheit des Clathrin-Adaptor-Proteins sowie tctex-1, einem Bestandteil des Dynein-Motor-Komplexes, beschrieben. PV: Poliovirus. Für CD155, CD226, CD96 und Nectin-3 sind die Strukturen der Ig-ähnlichen Domänen angedeutet.

1.3.2.1. *In trans Interaktionen mit Zell-ständigen Liganden*

Nectin-3

Die Ektodomäne von Nectin-3 besteht wie die des CD155 und aller anderen Nectine aus drei Ig-ähnlichen Domänen. Wie alle Nectine bildet es homo-*cis*-Dimere. Darüber hinaus kann es *in trans* mit einem weiteren Nectin-3-Molekül, CD155, Nectin-1 oder Nectin-2 interagieren, wobei die *trans*-hetero-Wechselwirkungen eine wesentlich höhere Affinität aufweisen als die *trans*-homo-Bindung [46, 47]. Während für die Bindung *in trans* die erste Domäne essentiell ist, benötigt die *cis*-Interaktion Domäne 2. Über seinen intrazellulären Bereich kann Nectin-3 mit Afadin wechselwirken, wodurch eine Verbindung zum Actin-Zytoskelett entsteht [48].

Nectin-3 wird unter anderem im Blut, Spermiden und an Orten des Zell-Zell-Kontaktes in NIH3T3-Zellen gefunden. Alle Nectine finden sich auf beiden Seiten der Zellmembran in *Adherens junctions* (AJ) von Epithelien und Fibroblasten. Über die CD155-Interaktion mit Nectin-3 ist CD155 zumindest indirekt an der Rekrutierung von E-Cadherin und somit an der Entstehung von AJ beteiligt [37, 46, 49].

Darüber hinaus gibt es aus Experimenten mit Fibroblasten Hinweise, dass die Wechselwirkung von CD155 und Nectin-3 zu erhöhter Zell-Beweglichkeit führt [50]. Zudem konnte gezeigt werden, dass NIH3T3-Zellen bei hoher Zelldichte CD155 nach Interaktion mit Nectin-3 durch Clathrin-vermittelte Endozytose aufnehmen. Dadurch kam es zur Reduktion von Beweglichkeit und Proliferation der Zellen [51].

Nectin-3 defiziente Mäuse zeigen eine abnormale Kleinheit der Augäpfel (Mikrophthalmie), sowie Störungen im Netzhaut-Epithel des Ziliarkörpers [52]. Des Weiteren sind männliche Nectin-3^{-/-} genau wie Nectin-2^{-/-} Tiere aufgrund eines Defekts in der Spermienbildung unfruchtbar [53].

CD226 (DNAM-1, DNAX accessory molecule-1)

CD226 wurde bei der Suche nach Antikörpern, die T-Zell-Rezeptor-unabhängige Zytotoxizität inhibieren, entdeckt [54]. Das glykosylierte, membranständige Protein hat eine Größe von etwa 65 kD. Wie CD155 und die Nectine ist es ein Mitglied der Ig-Superfamilie. Im Gegensatz zu den beiden Letztgenannten besteht sein extrazellulärer Teil jedoch aus 2 V-Domänen. CD226 wird im Human-Blut von der Mehrheit der T-Zellen, NK-Zellen (CD3⁻CD56⁺), Monozyten (CD14⁺) und einer B-Zell-Subpopulation exprimiert. Darüber hinaus kann das Molekül auf einer Subpopulation von Thymozyten detektiert werden. Funktionell wurde das Molekül bereits bei seiner Identifizierung mit CTL- und NK-Zell-

vermittelter Zytotoxizität in Verbindung gebracht. Spätere Untersuchungen zeigten, dass die Interaktionen von CD226 mit CD155 und Nectin-2 auf Krebszellen und transfizierten Zellen für deren NK-Zell-vermittelte Lyse von Bedeutung sind [55, 56].

CD226-Quervernetzung führt zu einer Tyrosin- und Serin-Phosphorylierung [54]. Zudem konnte in nachfolgenden Veröffentlichungen gezeigt werden, dass CD226 funktionell mit dem Integrin LFA-1 *in cis* assoziiert ist. Während die beiden Moleküle auf NK-Zellen bereits als Komplex vorliegen, kommt es auf CD4⁺ T-Zellen erst nach Stimulierung mit anti-CD3-Antikörpern oder PMA zu einer Interaktion [57].

Des Weiteren ist CD226 über die Verknüpfung mit diesem Signalweg vermutlich an der Regulation von Proliferation und Differenzierung naiver T-Zellen beteiligt [58]. Eine mögliche Rolle bei der Differenzierung von T-Zellen zu Th1-Zellen wird diskutiert [59].

Darüber hinaus wird CD226 auch von Megakaryozyten und Thrombozyten exprimiert. Zur funktionellen Bedeutung dieses Befundes konnte gezeigt werden, dass Thrombin-aktivierte Thrombozyten CD226-abhängig an Endothelzellen (HUVEC) binden [60]. Erstaunlicherweise belegten andere Untersuchungen, dass CD226 auch auf der Endothelseite exprimiert wird. Chen et al. konnten demonstrieren, dass CD226 auf HUVEC nach LPS- oder TNF α -Stimulation hochreguliert wird [61].

Kurz nach Beginn dieser Arbeit wurde eine Studie veröffentlicht, in der gezeigt wurde, dass CD155 einen essentiellen Rezeptor für CD226 auf Endothelzellen darstellt, da die Interaktion der beiden Moleküle für den Diapedese-Schritt der TEM von humanen Monozyten von Bedeutung ist [62]. Folglich scheint CD226 neben den zunächst beschriebenen Funktionen auch als Adhäsionsrezeptor zu dienen. Möglicherweise ist es zusätzlich an Differenzierungsprozessen der Monozyten beteiligt.

CD96 (TACTILE)

Ein weiterer CD155-Interaktionspartner, der ebenfalls in die Familie der Ig-Moleküle gehört, ist CD96. Das membranständige 160 kD-Protein besteht aus drei Ig-ähnlichen Domänen, einer langen Serin/Threonin/Prolin-reichen Region, einer Transmembrandomäne und einem kurzen zytoplasmatischen Bereich. CD96 ist auf fast allen peripheren T- sowie NK-Zellen detektierbar, wird jedoch erst nach deren Aktivierung stärker exprimiert (woraus der ursprüngliche Name „*T cell activation, increased late expression*“ resultierte [63]).

Seine Interaktion mit CD155 vermittelt Zell-Adhäsion zwischen der NK- und der Zielzelle. Die CD96/CD155-Wechselwirkung ist möglicherweise für die Erkennung und Eliminierung von entstehenden Tumorzellen von Bedeutung [64].

1.3.2.2. *Interaktion mit Proteinen der extrazellulären Matrix*

Neben der Interaktion mit zellständigen Molekülen sind für CD155 auch Interaktionen mit Proteinen der extrazellulären Matrix (EZM) beschrieben [41]. Eines davon ist Vitronektin (Vn), welches – trotz seiner Namensgebung – keine Verwandtschaft mit den Nectinen hat. Es wird hauptsächlich in der Leber produziert und ins Blut sekretiert. Das Protein stellt dadurch einen beträchtlichen Serum-Bestandteil dar. Vitronektin bindet verschiedene Serumfaktoren sowie Integrine, darunter $\alpha_v\beta_3$, das bei der Adhäsion, Verbreitung und Migration von Zellen involviert ist [65-67]. Es konnte gezeigt werden, dass Vitronektin von Plasmazellen über eine $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-abhängige Interaktion gebunden wird und deren Proliferation induziert [68]. Darüber hinaus gibt es mehrere Hinweise darauf, dass Vitronektin in der Lage ist, mit Proteinen des Komplementsystems zu interagieren und dadurch die späteren Schritte der lytischen Kaskade zu inhibieren [69, 70]. Da CD155 und Vitronektin in histologischen Untersuchungen mit FDC und KZB in Keimzentren von Mandeln kolokalisieren, ergibt sich eine plausible Theorie, dass Komplement-exprimierende Zellen in den Keimzentren möglicherweise über die CD155-Vn-Interaktion der Komplement-Lyse entgehen [41, 65].

Vitronektin kann des Weiteren auf Gefäßen nach deren Verletzungen sowie in Thromben detektiert werden [71]. Untersuchungen von Vitronektin-defizienten Mäusen lieferten kontroverse Ergebnisse: Einerseits scheint das Protein im Plasma der Thrombozyten-Aggregation entgegenzuwirken, andererseits ist es in Thrombozyten an Prozessen beteiligt, die deren Zusammenlagerung fördern. Zudem scheint Vitronektin bestehende Thromben zu stabilisieren [71-73].

Ein weiteres EZM-Protein, mit dem CD155 interagiert, ist Fibronektin (Günter Bernhardt, noch nicht publiziert). Neben der Vermittlung von Zelladhäsion, und somit potentieller Bedeutung für die Zellmigration, wurde auch für Fibronektin eine Proliferations-induzierende Wirkung bei Plasmazellen gezeigt [68]. Darüber hinaus ist das Protein möglicherweise an der Regulation der Phagozytose bei neutrophilen Granulozyten sowie Makrophagen von Bedeutung [74].

1.3.2.3. *Interaktion in cis*

Während alle oben beschriebenen Interaktionen Zellen untereinander oder mit der EZM verbinden, sind für CD155 auch Bindungspartner auf ein und derselben Zelle identifiziert. Unter diesen ist CD44, ein Glykoprotein, das auf humanen Monozyten *in cis* mit CD155 interagiert [75]. Es existieren zahlreiche Spleißvarianten des CD44. Entsprechend umfangreich sind das Expressionsmuster wie auch die Funktionen dieses Moleküls. Varianten des CD44 können unter anderem auf Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten, Thymozyten, Fibroblasten, Epithelien und glatten Muskelzellen detektiert werden. Verschiedenste immunologische Studien zeigen eine funktionelle Beteiligung des Moleküls beim „Homing“ sowie der Reifung und Aktivierung von Lymphozyten [76, 77]. Die funktionelle Bedeutung der Assoziation mit CD155 ist derzeit jedoch unklar.

Darüber hinaus ist bekannt, dass CD155 mit dem $\alpha_v\beta_3$ -Integrin am *leading edge* migrierender Zellen kolokalisiert. Es konnte gezeigt werden, dass CD155 zusammen mit diesem Integrin eine Wachstumsfaktor-abhängige Erhöhung der Zell-Beweglichkeit bewirkt [78]. Neueste Studien demonstrieren die direkte Interaktion des Integrins mit CD155 *in cis* [79]. Da sowohl CD155 als auch das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin auf Krebszellen hochreguliert sind und beide Moleküle Einfluss auf die Zell-Beweglichkeit haben, kommt CD155 auch eine Bedeutung bei der Invasivität von Tumoren zu.

1.3.2.4. *Intrazelluläre Interaktionen*

Bei den verschiedenen Beobachtungen, dass CD155 bei der Migration und Polarisierung von Zellen eine Bedeutung zukommt, wurden auch Interaktionen der zytoplasmatischen Domäne der membranständigen CD155-Formen aufgedeckt. Experimente mit Zelllinien zeigten, dass die CD155 α -Isoform über den C-Terminus mit der $\mu 1B$ -Untereinheit des Clathrin-Adaptor-Komplexes interagiert und so zur basolateralen Seite der Zellen sortiert wird [80].

Des Weiteren bindet die intrazelluläre Region die tctex-1-Untereinheit des Dynein-Motor-Komplexes. Diese Bindung ermöglicht den retrograden axonalen Transport von Poliovirus-enthaltenden Vesikeln [81]. Dies stellt neben dem Weg über das Blut eine weitere denkbare Route des Virus ins ZNS dar. Möglicherweise hat diese Bindung auch Einfluss auf die Zell-Beweglichkeit [82].

Während der komplexen Vorgänge bei der Bildung von Zell-Zell-Kontakten agiert CD155 außerdem als Signal-Transduktions-Molekül, indem es kleine G-Proteine (Cdc42 und rac) aktiviert [83].

1.4. murines CD155 und seine Interaktionspartner

Nachdem zunächst Nectin-2 (*Polio virus receptor related 2*, Prr2) für das homologe Protein des CD155 in der Maus gehalten wurde, konnte im Jahr 2003 Tage4 als die murine Form des CD155 identifiziert werden [45]. Die anfängliche Verwirrung bei der Suche nach dem homologen Protein resultierte aus der geringen Konservierung des Moleküls zwischen Maus und Mensch. Die Aminosäuresequenzen stimmen nur zu etwa 42 % überein, wobei die Ektodomänen eine etwas höhere Konservierung zeigen. Das murine CD155 gleicht den humanen membranständigen Isoformen (α , δ). Es besteht aus drei Ig-ähnlichen Domänen, einer Transmembranregion und einem kurzen intrazellulären Bereich. Die Gensequenz besteht wie die des CD155 aus 8 Exons. Ebenfalls konserviert sind potentielle intrazelluläre Bindungsstellen für tctex-1 und die μ 1B-Untereinheit des Clathrin-Adaptor-Komplexes. Auf Proteinebene wurden bisher keine weiteren Isoformen des murinen Homologs nachgewiesen. Das Expressionsmuster des murinen CD155 ist vergleichbar mit dem des humanen CD155. Murines CD155 ist in histologischen Untersuchungen auf FDC in Keimzentren von PP und so wie in der für humanes Gewebe beschriebenen, charakteristischen Verteilung auf verschiedenen Epithelien des Darms, darunter auch M-Zellen und FAE, detektierbar (vgl. 1.3.1, [45]). Abgesehen von der in den Gefrierschnitten nicht nachweisbaren Expression auf Keimzentrums-B-Zellen spiegelt dieses Expressionsmuster exakt das des humanen CD155 wieder.

Eine weitere Bestätigung, dass das korrekte murine Orthologe identifiziert wurde, war der Nachweis, dass die Interaktion mit Vitronektin konserviert ist. In weiterführenden Studien konnte gezeigt werden, dass auch die Interaktion mit Nectin-3 sowie murinem CD226 konserviert ist [37, 84].

CD226 wird in Mäusen von den meisten CD4⁺ und CD8⁺ Zellen, exprimiert. Im Unterschied zu humanen Leukozyten exprimieren jedoch nur Subpopulationen von NK-Zellen und Makrophagen dieses Molekül [84]. Darüber hinaus findet sich CD226 auch auf murinen CD8⁺ DC. Interessanterweise führt die Behandlung dieser mit anti-CD226-Antikörper zu ihrer Reifung [85]. Derart aktivierte Antigen-präsentierende DC führen zur Polarisation von

spezifischen T-Zellen entlang des Th1-Pfades. Außerdem ist die CD155-CD226-Wechselwirkung an der Tumor-Bekämpfung beteiligt [85]. Der Einfluss dieser Interaktion bei der transendothelialen Migration von murinen Monozyten war zu Beginn dieser Arbeit nicht untersucht.

Auch über murines CD96 existierten zu diesem Zeitpunkt keine Veröffentlichungen. Während dieser Dissertation konnte am Institut für Immunologie jedoch das Expressionsmuster auf Proteinebene beschrieben, sowie die Konservierung der Interaktion zwischen Maus und Mensch gezeigt werden (Seth, Maier et al., Manuskript eingereicht).

1.5. Zielsetzung

Nach seiner Identifizierung als humaner Poliovirusrezeptor wurden verschiedene Studien zur natürlichen Funktion des CD155 publiziert. Dabei sind viele der aufgedeckten funktionellen Aspekte mit der Polarisation und Beweglichkeit von Zellen assoziiert. Aufgrund der jüngsten Studien zur TEM von Monozyten sollte die potentielle Konservierung dieser CD155-Funktion zwischen Mensch und Maus untersucht werden. Dazu wurde zunächst die Expression der Blut-Leukozyten mit Hilfe von neu generierten anti-Maus-CD155-Antikörpern, sowie Antikörpern gegen murines CD96 und CD226 analysiert.

Im weiteren Verlauf der Arbeit standen außerdem am Institut für Immunologie generierte CD155-defiziente Mäuse zur Verfügung. Sie ermöglichten Analysen von verschiedenen *in vivo*-Modellen der Zell-Migration. Aufgrund der charakteristischen CD155-Expression im humanen GALT wurde dann auch das murine Expressionsmuster in diesem Gewebe bestimmt. Anschließend sollte mit Hilfe der CD155^{-/-} Mäuse die Entwicklung einer humoralen Immunantwort untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Digitalkamera ORCA-ER	Hamamatsu (Japan)
Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton & Dickinson (NJ, USA)
Durchflusszytometer LSR II	Becton & Dickinson (NJ, USA)
Elektrophoresekammer XCell SureLock	Invitrogen (Eggenstein)
Elektroporationssystem:	Biorad (CA, USA)
Gene pulser II	
Pulse Controller Plus	
Capacitance extender plus	
ELISA-Reader Sunrise	Tecan (Crailsheim)
ELISA-Washer ELx 405	BioTek (Bad Friedrichshall)
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Zeiss (Oberkochen)
Geldokumentationssystem	
Gene Genius Bioimaging System	Syngene (MD, USA)
Inverses Mikroskop CKX41	Olympus (Hamburg)
Kryotom CM 3050 S	Leica (Wetzlar)
Magnetrührer für Spinnerflaschen	H + P Labortechnik (Oberschleißheim)
Microplate Stacker Bio-Stack	BioTek (Bad Friedrichshall)
Netzgerät EPS 601	Amersham / GE Healthcare (NJ, USA)
Peristaltik Pumpe P-1	Amersham / GE Healthcare (NJ, USA)
pH-Meter S20 SevenEasy™ pH	Mettler Toledo (Schweiz)
Schüttelinkubator Multitron II	Infors (Schweiz)
Spektrometer Smart-Spec3000	Biorad (CA, USA)
Thermocycler Mastercycler ep	Eppendorf (Hamburg)
Vakuumzentrifuge Speedvac RVC2-18	Christ (Osterode)
Vakuumpumpe MZ 2C	Vakuumbrand (Wertheim)
Spinner-Zellkulturflaschen (0,25 L; 2 L)	Techne (NJ, USA)
Sterilwerkbank HERAsafe	Heraeus (Hanau)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
UV-Handlampe UVM-57	UVP (CA, USA)
Wasserbad 1002	GFL (Burgwedel)
Zählkammer Neubauer-improved P.	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Zell-Inkubator BBD 6220	Heraeus (Hanau)
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge Avanti J-25	Beckman Coulter (Krefeld)

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Chromatographie-Säulen Econo-Column	Biorad (CA, USA)
Cell strainer BD Falcon	Becton & Dickinson (NJ, USA)
Deckgläser (24x60 mm)	Menzel-Gläser (Braunschweig)
ELISA-Platten MaxiSorp	Nunc (Dänemark)
Entsalzungssäule PD10	Amersham / GE Healthcare (NJ, USA)
96-well Mikrotest-Platten, V-Boden	Greiner bio-one (Kremsmünster)
Microsep 30k omega (Zentrifugeneinheiten)	Pall (NY, USA)
Multiscreen HTS-Platten	Millipore (MA, USA)
Nylongaze	Sefar (Wasserburg)
Objektträger (zur Vectabond-Beschichtung)	Menzel-Gläser (Braunschweig)
PCR-Röhrchen (0,2 ml)	Biozym (Hessisch Oldendorf)
PP Röhrchen natur (1,3 ml für FACS)	Greiner bio-one (Kremsmünster)
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Spritzen (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	Braun (Melsungen)
Spritzenfilter (0,22 µm)	Roth (Karlsruhe)
Gel-Kassetten X-Cell Mini-cell (1 mm)	Invitrogen (Eggenstein)
Zellkulturflaschen (75 cm ² , 150 cm ²)	TPP (Schweiz)
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-, 96-well)	TPP (Schweiz)
Zentrifugenröhrchen (15 ml , 50 ml)	Greiner bio-one (Kremsmünster)

2.1.3. Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien in höchstem Reinheitsgrad von folgenden Firmen bezogen: Fluka (Neu-Ulm), Merck (Schwalbach), Roth (Karlsruhe), Sigma (Steinheim).

Agar Noble	Becton & Dickinson (NJ, USA)
Ampicillin	ICN Biomedicals (Eschwege)
Bacto Peptone	Becton & Dickinson (NJ, USA)
Bacto Yeast Extract	Becton & Dickinson (NJ, USA)
BSA Fraktion V	Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Riedel de Haen / Sigma (Steinheim)
5(6)-carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester (CFSE)	Molecular Probes (OR, USA)
DAPI	Roche (Mannheim)
Digitonin	Calbiochem / Merck (Schwalbach)
Geneticin G418	Gibco / Invitrogen (Eggenstein)
L-Glutamin (200 mM Stammlösung)	Gibco / Invitrogen (Eggenstein)
Lympholyte M	Cedarlane (Kanada)
Percoll	Amersham / GE Healthcare (NJ, USA)

2 Material und Methoden

Phosphate-buffered saline (PBS)	Biochrom AG (Berlin)
Penicillin-Streptomycin (Stammlösung)	Gibco / Invitrogen (Eggenstein)
Mowiol 4-88	Calbiochem / Merck (Schwalbach)
5(6)-carboxy-tetramethylrhodamine N-succinimidyl ester (TAMRA)	Molecular Probes (OR, USA)
TissueTek	Sakura Finetek (Niederlande)
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	ICN Biomedicals (Eschwege)
Zymosan A	Sigma (Steinheim)

2.1.4. Adjuvantien

Choleratoxin	List / Quadratech (Großbritannien)
Aluminiumhydroxidgel (2 %)	HCI Biosector (Dänemark)

2.1.5. Puffer und Lösungen

- AEC Substratlösung
1 AEC Tablette in 2,5 ml DMF lösen
→ unter rühren in 47,5 ml 50 mM Na-Acetat pH 5,0 geben
→ sterilfiltrieren (0,2 µm Filter), um feine Aggregate zu entfernen
→ direkt vor der Verwendung 25 µl H₂O₂ zugeben
- Auftragspuffer für Proteingele

Tris/HCl pH 6,8	50 mM
Glycerin	10 %
SDS	2 %
Bromphenolblau	0,01 %
DTT	100 mM
- Citrat-Phosphat-Puffer

NaH ₂ PO ₄	1,9 M
Natriumcitrat	0,04 M
- CFSE-Stocklösung 5 mM in DMF
- 5x Beschichtungspuffer (ELISA) 0,5 M Natriumcarbonat
- DNA-Auftragspuffer

Ficoll 400	0,25 g/ml
Orange G	0,2 mg/ml

2 Material und Methoden

- Elutionspuffer
Natrium-Citrat 0,1 M
→ auf pH 3,5 einstellen, sterilfiltrieren
- Erythrozyten-Lyse-Puffer (10x)
Ammoniumchlorid 8.99 g
Kaliumbicarbonat 1.00 g
EDTA (Dinatriumsalz) 37 mg
→ einstellen auf pH 7.3
ad 100 ml (H₂O)
- FACS-Puffer 2 % FKS in PBS
- 2x HBSS
NaCl 16 g/l
KCl 0,74 g/l
Na₂HPO₄•12 H₂O 0,537 g/l,
Dextrose 2 g/l,
HEPES 10 g/l
→ auf pH 7,08 einstellen
- 5 x Laufpuffer für SDS-Gele
Tris 15 g/l
Glycin 72 g/l
SDS 5 g/l
- OPD-Lösung
1 Tablette o-Phenylendiamin (OPD) in 40 ml Citrat-Phosphat-Puffer
- PBSd
KCl 0,2 g/l
KH₂PO₄ 0,2 g/l
Na₂HPO₄ 1,15 g/l
NaCl 8 g/l
- PBST
Tween 0,05 %
in PBS

2 Material und Methoden

- TBE

Tris	0,1 M
Borsäure	83 mM
EDTA	1 mM

- TE

Tris/HCl pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM

- TBS

Tris	121.4 g (1.0 M)
Natriumchlorid	90.0 g (1.5 M)

→ mit konz. Essigsäure auf pH 7.5 einstellen
ad 1000 ml (H₂O)

- TBST 0,05 % Tween 20 in TBS

- Waschlösung zur Präparation von intestinale IgA

0,5 M EDTA	3 ml
BSA	0,3 g
Trypsin Inhibitor	0,03 g
PBSd	27 ml

→ aliquotieren und bei -20 °C lagern

- Zelldissoziationsmedium

EDTA	2 mM
Glucose	10 mM

in PBSd

2.1.6. Seren und Medien

Dulbecco's Mod Eagle Medium (DMEM)	Gibco / Invitrogen (Eggenstein)
RPMI 1640	Gibco / Invitrogen (Eggenstein)
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA (Österreich)
FKS (<i>ultra low IgG</i>)	PAN-Biotech (Aidenbach)
Esel-Serum	Jackson ImmunoResearch (Großbritannien)
Maus-Serum	Caltag (CA, USA) und Institut f. Immunologie
Ratten-Serum	Sigma (Steinheim) und Institut f. Immunologie

2 Material und Methoden

- SOC-Medium

Glucose	20 mM
Hefeextrakt	0,5 %
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
NaCl	10 mM
Bacto Peptone	2 %

- LB-Medium

Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	1 %
Bacto Peptone	1 %

- LB/Amp-Kulturplatten

Agar	1,5 %
Ampicillin in LB-Medium	100 µg/ml

- TYM-Medium

Bacto Peptone	2 %
Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	100 mM
MgSO ₄	10 mM

- Medium für adhärent wachsende HEK293-Zellen

FKS	10 %
P/S	1 %
in DMEM	

- Medium für stabil transfizierte HEK293-Zellen in Spinner-Flaschen

FKS (PAN, <i>ultra low IgG</i>)	5 %
P/S	1 %
Geneticin G418	200 µg/ ml
L-Glutamin	1 %
in RPMI	

2.1.7. Kits

Expand High Fidelity PCR System	Roche (Mannheim)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
Plasmid Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Perfectly Blunt [®] Cloning Kit, pSTBlue-1	Novagen / Merck (Schwalbach)
Silberfärbungsskit	Pharmacia Biotech (Freiburg)

2.1.8. Enzyme

- Restriktionsenzyme
Age I, ApaLI, BamHI, Eco RI, Eco RV, Hind III, Kpn I, Nhe I, Not I, SacII, Xba I
alle NEB (MA, USA)
- sonstige Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP)	NEB (MA, USA)
Collagenase A	Roche (Mannheim)
T4-DNA-Ligase	NEB (MA, USA)
Trypsin	Biochrom AG (Berlin)

2.1.9. Größenmarker

- DNA-Marker für Agarosegele

Smart Ladder	Eurogentec (Belgien)
Smart Ladder SF	Eurogentec (Belgien)
- Proteinmarker für SDS-Gele

Prestained SDS-PAGE Standard	Biorad (CA, USA)
------------------------------	------------------

2.1.10. Vektoren

pSTBlue-1 (Perfectly Blunt Cloning Kit)	Novagen / Merck (Schwalbach)
pcDNA3	Laboreigene Bestände / Invitrogen (Eggenstein)

2.1.11. cDNA-Konstrukte

hCD155: pH20A (hCD155 in pUC19)	Laboreigene Bestände
mCD155: mT20 (mTage4 in pcDNA3)	Laboreigene Bestände
rCD155: rT4 (rTage4 in pcDNA3)	Laboreigene Bestände

2.1.12. Oligonukleotide

Die Namen der verwendeten 5'-Primer sind dabei in Großbuchstaben angegeben, der 3'-Primer in Kleinbuchstaben.

Ratte-CD155-Domänenübergänge

RCD155_NOT	(5'-)GGG CGG CCG CAC CAT GGC CCC ACT CGC CG (-3')
RATD12_NHE	GCG CTA GCC CGA CCT AAA AAC ACA GC
rcdd12:nhe	GGG CTA GCA CCT TCA GCC AGA CAT TG
RATD23_SAC	CGC CGC GGC TTA TCC ACC CGA AGT GTC
rcdd23:sac	CGC CGC GGA AAG GAT CAA TGG CTG C
RATD3T_AGE	GCA CCG GTT ACA TCA TTG CCA TCG TC
rcdd3tm:age	CGA CCG GTG CCT AAG CTT GTC TTT GGC
rcd155MYC:xba	GCT CTA GAC TAC AGA TCT TCT TCA GAA ATA AGT TTT TGT TCC CTC AAG TTG TTC GTC TCC
rcd155:xba_neu	GGT CTA GAT CAC CTC AAG TTG TTC GTC

Human-CD155 Domänenübergänge

HCD155_NOT	GGG CGG CCG CAC CAT GGC CCG AGC CAT GGC
hcdd12:nhe	GGG CTA GCA CTC GGA GCC AGA TAT CC
hcdd23:sac	GTC CGC GGT GAG GTT CAC AGT C
hcdd3tm:age	CGA CCG GTT ATG CCT GAG TGC TCA C

Maus-CD155 Domänenübergänge

MCD155_NOT	GGG CGG CCG CAC CAT GGC CCC ACT CGC C
mcdd12:nhe	GGG CTA GCA CCT TCA GCC AGG C
mcdd23:sac	GGC CGC GGA AAG GGT CAC CAG CAG
mcdd3tm:age	CGA CCG GTG TGT AAT CTT GTA TTT TGC

2.1.13. Antikörper und Konjugate

CD11b-FITC	Klon M1/70.15	Caltag / Invitrogen (Eggenstein)
Gr-1-Bio	Klon RB6-8C5	BD (NJ, USA)
IgM-Bio	Klon R6-60.2	BD (NJ, USA)
CD21-FITC	Klon 7G6	BD (NJ, USA)
CD23-PE	Klon B3B4	Caltag / Invitrogen (Eggenstein)
B220-Bio	Klon TIB146	Institut für Immunologie
B220-FITC	Klon TIB146	Institut für Immunologie
CD19-APC-Cy7	Klon 1D3	BD (NJ, USA)
CD38-PE	Klon 90	BD (NJ, USA)
CD138-PE	Klon 281-2	BD (NJ, USA)
IgA-FITC	M31101	Caltag / Invitrogen (Eggenstein)

2 Material und Methoden

IgA-HRPO	M31107	Caltag / Invitrogen (Eggenstein)
IgG1-Bio	Klon A85-1	BD (NJ, USA)
IgG2a-Bio	Klon R19-15	BD (NJ, USA)
IgG2b-Bio	Klon R12-3	BD (NJ, USA)
CD31-FITC	Klon MEC13.3	BD (NJ, USA)
Ziege anti-human-IgG-Cy5		Jackson ImmunoResearch (Großbritannien)
Maus anti-Ratte-IgG-Cy5		Jackson ImmunoResearch (Großbritannien)
SA-HRPO		Jackson ImmunoResearch (Großbritannien)
SA-PerCP		BD (NJ, USA)
Esel anti-Kaninchen-HRPO		Jackson ImmunoResearch (Großbritannien)
PNA-FITC		Sigma (Steinheim)
MECA79-Cy5		BD (NJ, USA)

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Polymerase-Kettenreaktion

Zur Klonierung der chimären CD155-Konstrukte wurden die unterschiedliche Bereiche der Ektodomänen-kodierenden Regionen durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) aus cDNA amplifiziert. Dabei fand das Expand High Fidelity PCR System (Roche) Verwendung. Die Reaktionsansätze setzten sich wie folgt zusammen:

10x Expand HF-Puffer (enthält MgCl ₂)	2,5 µl
dNTPs (je 10 mM)	0,5 µl
5'-Primer (100 pmol/µl)	0,75 µl
3'-Primer (100 pmol/µl)	0,75 µl
DNA- <i>template</i> (10 ng/µl)	1 µl
ad 24,6 µl dH ₂ O	
Expand High Fidelity PCR Enzym-Mix	0,35 µl

Programm:

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
<u>Initiale Denaturierung</u>	95 °C	120 s	1x
Denaturierung	94 °C	15 s	
Annealing	50 °C	30 s	10x
<u>Elongation</u>	68 °C	60 s	
Denaturierung	94 °C	15 s	
Annealing	50 °C	30 s	15x
<u>Elongation</u>	68 °C	60 s + Zyklen•5 s	
Finale Elongation	72 °C	400 s	

Dieses, den Herstellerangaben folgende Programm, berücksichtigt die im Laufe der PCR nachlassende Aktivität der Polymerase, indem die Elongationsphase nach den ersten 11 Zyklen verlängert wird.

2 Material und Methoden

2.2.1.2. *Aufreinigung von PCR-Produkten*

PCR-Produkte wurden mit Hilfe des Reinigungskits QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Anweisungen des Herstellers aufgereinigt. Anschließend lieferte ein analytisches Agarosegel Hinweise auf den Erfolg der PCR.

2.2.1.3. *Agarosegelelektrophorese*

Abhängig von Größe und Ladung können unterschiedliche DNA-Fragmente durch eine Agarosegelelektrophorese aufgetrennt werden, vorausgesetzt sie unterscheiden sich deutlich in ihrer Größe (je nach Anwendung und Ziel mindestens etwa 100 Basenpaare). Dafür wird Agarose in der gewünschten Menge eingewogen und durch Aufkochen in TBE-Puffer gelöst. Die hier verwendeten Gele hatten eine Agarosekonzentration von 1,0 bis 1,5 %. Nach Abkühlen auf etwa 60 °C wurden 50 µl/l Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) zugegeben und das Gel anschließend in eine Gelkammer gegossen. Die zu analysierenden Proben wurden zum Auftragen auf das ausgehärtete Gel mit DNA-Auftragspuffer versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte dann bei 85-120 V. Während analytische Gele mit einem Geldokumentationssystem dokumentiert wurden, erfolgte bei präparativen Gelen die Detektion der Banden über eine (schwächere) UV-Handlampe.

2.2.1.4. *Restriktionsverdau*

Um definierte DNA-Sequenzen aus einem Vektor auszuschneiden, oder PCR-Produkte auf die Ligation vorzubereiten, wurden verschiedene Restriktionsenzyme eingesetzt (siehe 2.1.8), welche doppelsträngige DNA an spezifischen Erkennungsstellen spalten. Zu analytischen Zwecken wurde ein 20 µl-Ansatz unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Meist wurden 10-20 U des Enzyms verwendet, wobei die Enzymlösung nicht mehr als 10 % des Ansatzes ausmachen sollte, da das im Aufbewahrungspuffer enthaltene Glycerin die Enzymaktivität sonst behindert. Wird ein Doppelverdau durchgeführt, so muss der eingesetzte Puffer für beide Enzyme verwendbar sein (entsprechende Informationen liefert der Produktkatalog des Herstellers). Für einen präparativen Verdau wurde ein 50 µl-Reaktionsansatz mit 30-40 U Enzym zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Soll eine verdaute DNA-Probe zur Ligation eingesetzt werden, empfiehlt sich nach der Restriktion eine Dephosphorylierung des Vektors, um einer Religation ohne Insert zu entgegenzuwirken.

2.2.1.5. *Gelextraktion von DNA-Fragmenten*

Zur Isolierung elektrophoretisch aufgetrennter DNA-Fragmente wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet. Um die DNA nicht durch zu starkes UV-Licht zu schädigen, wurden die gewünschten Banden mit Hilfe einer UV-Handlampe detektiert und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Das Kit ermöglicht das Auflösen des Gels und die Aufreinigung der darin enthaltenen DNA. Zur Elution wurde ein Volumen von 30 µl des mitgelieferten EB-Puffers verwendet.

2.2.1.6. *Ligation*

Zur Ligation von geschnittenem Insert in den Expressionsvektor pcDNA3 wurden 100 ng linearisierter und dephosphorylierter Vektor mit einem etwa zwei- bis vierfachen Überschuss an geschnittenem Insert sowie 1 µl 10x Ligasepuffer gemischt. Nach dem Auffüllen des Ansatzes auf 9 µl mit dH₂O erfolgten die Zugabe von 1 µl T4-DNA-Ligase (Roche) und eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur. Bei den meisten Konstrukten wurden die PCR-Fragmente zunächst in den Vektor pSTBlue-1 kloniert. Zu diesem Zweck fand das Perfectly Blunt Cloning Kit (Novagen) gemäß der Anleitung des Herstellers Anwendung.

2.2.1.7. *Transformation*

Zur Transformation wurden chemisch kompetente DH5α-Bakterien auf Eis aufgetaut und 40 µl der Bakteriensuspension mit dem gekühlten Ligationsansatz gemischt. Nach 30 min auf Eis folgte ein 5-minütiger „Hitzeschock“ bei 37 °C im Wasserbad. Dem schlossen sich die sofortige Zugabe von 500 µl SOC-Medium und eine Inkubation der Suspension für 20 min bei 37 °C unter Schütteln an. Etwa 200 µl der Mischung wurden auf Ampicillin-haltigen LB-Platten ausplattiert.

Für die Transformation der chimären CD155-Konstrukte, die eine Sequenz ohne Myc-tag enthielten, fanden JM110-Bakterien Verwendung. Dieser DAM-Methylase-defiziente Stamm musste benutzt werden, da die Restriktionsendonuklease-Erkennungssequenz im Primer red155:xba_neu eine DAM-Methylierungsstelle enthielt und dadurch der Restriktionsverdau nicht möglich war. Dieser Stamm wurde mit der Elektroporationsmethode transformiert. Zu diesem Zweck wurden 40 µl elektrokompente Bakterien des JM110-Stamms aufgetaut und auf Eis mit 1-2 µl DNA-Lösung vermischt. Anschließend konnte der Ansatz in eine

vorgekühlte 0,1 cm Küvette transferiert und weitere 5 Minuten auf Eis belassen werden. Danach erfolgte die Elektroporation mit folgenden Parametern: 25 μF ; 200 Ω ; 1,7 kV. Die so behandelte Bakteriensuspension wurde dann mit 800 μl SOC-Medium aus der Küvette gespült und vor dem Ausplattieren 30 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert.

2.2.1.8. *Schnellaufschlüsse*

Zur schnellen Präparation kleinerer Mengen an Plasmid wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur in TYM-Medium in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß pelletiert (5.000 rpm, 2 min) und das Pellet in 150 μl Puffer P1 resuspendiert. Dieser wurde (wie die folgenden Puffer) dem Plasmid Mini Kit (Qiagen) entnommen. Nach der Zugabe von 150 μl P2 und Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur folgte die Beimischung von 150 μl P3. Nach weiteren 5 Minuten auf Eis ermöglichte eine erneute Zentrifugation (3 min bei 13.000 rpm) die Abtrennung gefällter Proteine. Für die anschließende DNA-Fällung wurden 400 μl des Überstandes in einem neuen Reaktionsgefäß mit 800 μl Ethanol (absolut) gemischt und 15 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss daran folgte ein kurzes Waschen des so generierten Pellets mit etwa 150 μl Ethanol. Nach einer weiteren Zentrifugation für 2 min bei 13.000 rpm wurde der Überstand entfernt, das Pellet bei 37 °C getrocknet und schließlich in 40 μl dH₂O aufgenommen.

2.2.1.9. *Plasmidpräparation*

Zur Gewinnung größerer Mengen an gereinigtem Plasmid wurde eine Präparation mit dem Plasmid Maxi Kit (Qiagen) durchgeführt. Dafür wurden Bakterien aus 400 ml einer Übernachtskultur in TYM-Medium pelletiert (Avanti J-25, Rotor JA-20, 5.500 rpm, 4 °C). Das so gewonnene Pellet konnte dann gemäß den Anweisungen des Herstellers aufgearbeitet werden. Das aufgereinigte Plasmid wurde schließlich in 400 μl TE aufgenommen. Die photometrische Messung der Probe ermöglichte schließlich deren Konzentrations-Bestimmung.

2 Material und Methoden

2.2.1.10. *DNA-Sequenzierung*

Die Sequenzierung der Plasmid-Konstrukte wurde von der Firma MWG durchgeführt. Hierfür wurden etwa 2 µg DNA im Vakuum bei 37 °C getrocknet und zusammen mit den Primern SP6 und T7 an MWG versandt.

2.2.1.11. *Klonierung der Expressionsplasmide für chimäre CD155-Proteine*

Zur Klonierung dieser Konstrukte wurden zunächst mittels PCR-Mutagenese Schnittstellen in die Ratten-DNA-Sequenz eingefügt, die zwischen den Ig-Domänen-kodierenden Bereichen lagen (*DNA-templates* und Primer siehe 2.1.11 und 2.1.12). Anschließend wurden unterschiedlich viele Domänen umfassende Bereiche aus der humanen und der murinen cDNA kloniert (D1, D1 und D2, D1 bis D3). Dabei wurden Schnittstellen für die gleichen Restriktionsenzyme wie im Ratten-Konstrukt generiert. Bei diesen Schritten erfolgte zunächst die Subklonierung in pSTBlue-1 und nachfolgend eine Umklonierung in den Expressionsvektor pcDNA3. Darüber hinaus wurde bei allen Konstrukten eine Sequenz eingeführt, die ein Myc-tag im C-terminalen Bereich nach der Transmembrandomäne kodiert. Auf diese Weise lagen alle Konstrukte sowohl mit als auch ohne Myc-tag vor. Bei der Klonierung der Myc-tag-freien Plasmide behinderte eine DAM-Methylase-Stelle im Primer deren anschließenden Restriktionsverdau. Aus diesem Grund wurden die betreffenden Plasmide in den Methylase-defizienten Bakterienstamm JM110 transformiert (freundlicherweise von Teruko Tamura zur Verfügung gestellt). Nach erfolgreichen Testverdaus wurden die fertigen Konstrukte sequenziert (siehe 2.2.1.10).

2.2.2. **Zellkultur**

2.2.2.1. *Zellkultur von HEK293-Zellen*

Adhärent wachsende HEK293-Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert und etwa alle vier Tage passagiert. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit PBSd gewaschen, um letzte Serumreste zu entfernen. Nach dem Absaugen des PBSd wurde 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben (0,25 % Trypsin / 0,5 mM EDTA). Durch Schwenken und Klopfen der Zellkulturflasche lösten sich die trypsinisierten Zellen nach wenigen Minuten vom Boden. Die Zugabe von 9 ml Serum-haltigen Mediums inhibierte

2 Material und Methoden

schließlich die Wirkung des Enzyms. Die Zellen wurden dann in geringerer Zelldichte auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

Zur Produktion größerer Mengen löslicher rekombinanter Proteine wurden stabil transfizierte HEK293-Zellen in Spinner-Zellkulturflaschen in Suspension gehalten. Dabei fand RPMI-Medium als Basismedium Verwendung. Da aus den Überständen dieser Zellen IgG-Fusionsproteine mit Hilfe von Sepharose A aufgereinigt werden sollten, wurde in diesem Fall ein extrem IgG-armes Serum (PAN) verwendet, um „Verunreinigungen“ aus dem Serum zu vermeiden.

2.2.2.2. *Transfektion mit der Calciumphosphat-Methode*

Für die Transfektion von adhärent wachsenden HEK293-Zellen wurde die Calciumphosphat-Methode angewendet. Dabei entsteht durch Mischen von Plasmid-DNA, CaCl_2 und 2x HBSS ein Präzipitat, welches von Zellen aufgenommen werden kann. Vor der Transfektion wurde das Medium der Zellen gegen frisches Medium ausgewechselt. Zur Transfektion einer subkonfluent bewachsenen 75 cm^2 -Zellkulturflasche diente folgender Ansatz:

Plasmid 20 μg
 CaCl_2 (2M) 62,5 μl
ad 500 μl dH_2O

Diese Lösung wurde langsam unter Vortexen zu 500 μl 2x HBSS hinzugegeben. Die Präzipitatbildung dauerte etwa 8 bis 10 min. Danach konnte die Lösung auf die Zellen gegeben werden. Zur Herstellung stabil transfizierter Zellen wurden dem Medium 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Geneticin G418 zugesetzt. Nach etwa zwei Passagen reichte zum Erhalt der Zellen eine Geneticin-Konzentrationen von 270 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aus.

2.2.3. Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1. *Aufreinigung von rekombinanten IgG-Fusionsproteinen*

Die in dieser Arbeit verwendeten Fusionsproteine enthielten zwei C-terminale Domänen von humanem IgG1. Diese ermöglichten die Aufreinigung der Proteine aus Zellkulturüberständen mit Hilfe einer Sepharose A-Säule. Dabei wurden die Überstände mit etwa 90 ml pro Stunde unter Benutzung einer peristaltischen Pumpe über etwa 2 ml Protein A Sepharose (4 Fast Flow, Amersham / GE Healthcare) in einer Chromatographie-Säule (Biorad) gepumpt. Nach Waschen mit ca. 15 ml PBSd folgte die Elution mit 4 ml Elutionspuffer. Zum Puffern des niedrigen pH-Werts wurden 700 µl 0,5 M Na₂HPO₄ und 300 µl 1 M Tris pH 9,5 im Auffang-Gefäß vorgelegt. Während die Säule mit 4 M Guanidiniumhydrochlorid regeneriert wurde, erfolgte ein Umpuffern der Probe mittels PD10-Säulen nach Anweisung des Herstellers. Die proteinhaltigen PBSd-Lösungen konnten dann mit Hilfe von Zentrifugeneinheiten (Microsep 30k omega) eingeengt werden. Nach ihrer Sterilfiltration und Konzentrationsbestimmung wurden die Proteine bei 4 °C gelagert und innerhalb von maximal 4-8 Wochen benutzt.

2.2.3.2. *Herstellung von TNP-konjugierten Proteinen*

Für einige Immunisierungen wurde TNP-BSA zusammen mit einem Adjuvans verabreicht. Dabei diente die Trinitrophenylgruppe als Hapten und BSA als Trägerprotein. Im ELISA konnten so unter Verwendung von TNP-gekoppeltem Humanserumalbumin TNP-spezifische Antikörper detektiert werden.

Zur Herstellung von TNP-konjugierten Serumalbuminen wurden 10 ml einer 1 % Albuminlösung in 0,2 M Natriumhydrogencarbonatpuffer pH 9,2 mit 2 ml 5 % Picrylsulfonsäure versetzt und 3 Stunden bei RT in der Dunkelheit inkubiert. Nach Ablauf der Zeit folgte eine Umpufferung in PBSd mit Hilfe einer PD10-Säule.

2.2.3.3. *Proteinbestimmung*

Die Konzentrationsbestimmung aufgereinigter Proteine erfolgte photometrisch mit dem Advanced Protein Assay Reagent Concentrate (Cytoskeleton). In einer 96-well-Zellkulturplatte wurde eine BSA-Standardreihe von 0 bis 1 µg sowie bis zu 20 µl der Lösung des aufgereinigten Proteins vorgelegt. Anschließend folgte die Zugabe von 300 µl Färbelösung pro well und das Messen der Proben bei 590 nm im ELISA-Reader.

2 Material und Methoden

2.2.3.4. SDS-PAGE

Die Reinheit der mit Hilfe von Sepharose A präparierten Proteine wurde mittels SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) kontrolliert. Das anionische Detergens SDS denaturiert und bindet Proteine, wobei es deren Eigenladung überdeckt. Es entstehen SDS-Proteinkomplexe, deren Verhältnis von Ladung zu Masse konstant ist. Im elektrischen Feld wandern Proteine dann zum Pluspol, wobei der Molekularsiebeffekt der Gelmatrix die Komplexe weitgehend proportional zu ihrem Molekulargewicht auftrennt.

Sammel- und Trenngel setzten sich wie folgt zusammen:

<u>10 % Trenngel</u>		<u>5 % Sammelgel</u>	
1,5 M Tris pH 8,8	1,5 ml	1 M Tris pH 6,8	0,9 ml
Acrylamid	2 ml	Acrylamid	0,6 ml
dH ₂ O	2,5 ml	dH ₂ O	2,04 ml
APS	50 µl	APS	50 µl
TEMED	10 µl	TEMED	1 µl

Das Trenngel wurde in eine Gel-Kassette gegossen und mit Ethanol (absolut) überschichtet, um Luftkontakt zu vermeiden. Nach etwa 20-minütiger Polymerisation wurde das Ethanol entfernt und das Sammelgel gegossen, wobei die Kassette durch den Gelkamm verschlossen wurde. Im Anschluss an die Polymerisation des Sammelgels wurde die Kassette in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Nach dem Befüllen der Kammer mit Laufpuffer wurde der Kamm gezogen und die entstandenen Proben-Taschen mit einer Spritze ausgespült. Danach folgte ein 5-minütiger Vorlauf des Gels, um das SDS ins Gel einwandern zu lassen. Währenddessen konnten die Proben vorbereitet werden, indem sie mit Auftragspuffer versetzt und 5 min auf 95 °C erhitzt wurden. Im Anschluss daran folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm. Pro Tasche wurden etwa 15 µl Probe aufgetragen, wobei freie Taschen mit 3 µl 5x Auftragspuffer befüllt wurden. Schließlich erfolgte die Gelelektrophorese für eine Stunde bei 200 V.

2.2.3.5. *Silberfärbung*

Um die elektrophoretisch getrennten Proteine zu detektieren, wurde das Silberfärbungskit von Pharmacia Biotech (Freiburg) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Als Standard diente der Broadrange Prestained SDS-PAGE Standard der Firma Biorad (CA, USA), welcher 1:10 verdünnt eingesetzt wurde.

2.2.4. Immunologische Methoden

2.2.4.1. *Generierung der anti-CD155-Antikörper*

Die Generierung dieser Antikörper erfolgte in Kooperation mit Elisabeth Kremmer (GSF, München). Ratten wurden mit einer Mischung aus 50 µg aufgereinigtem rekombinanten CD155, 5 nmol CPG, 500 µl inkomplettem Freudschen Adjuvans und 500 µl PBS i.p. und s.c. immunisiert. Das rekombinante Protein setzte sich aus der kompletten Ektodomäne von murinem CD155 und einem HIS-tag zusammen [45]. Nach 6 Wochen wurden die Tiere erneut mit dem Protein behandelt. Drei Tage später erfolgte eine Fusion der Ratten-Milzen mit der Myelom-Zelllinie P3X63-Ag8.653. Die Überstände der Klone konnten im ELISA mit rekombinantem CD155 getestet werden. Positiv getestete Hybridome wurden darüber hinaus durchflusszytometrisch mit transient transfizierten HEK293-Zellen auf ihre Bindeeigenschaften untersucht. Geeignete Klone wurden dann mehrere Male subkloniert. Die erhaltenen Antikörper hatten folgende Isotypen: IgG1 (5A5), IgG2a (3F1 und 8A6) und IgG2b (4G3).

2.2.4.2. *Zellpräparation für die Durchflusszytometrie*

Zur durchflusszytometrischen Untersuchung wurden die Maus-Organen in FACS-Puffer auf Eis gesammelt. Soweit nicht anders angegeben erfolgten auch alle weiteren Schritte in dieser Lösung.

Präparation von Lymphozyten aus sekundären lymphatischen Organen

Axilläre, zervikale, inguinale und mesenteriale Lymphknoten, PP und Milz wurden nach ihrer Präparation vorsichtig mit dem Stempel einer 2 ml-Spritze durch Cell strainer gedrückt. Um Erythrozyten zu entfernen, folgte bei Milz-Zellsuspensionen ein hypotoner Schock durch 5-10-minütige Inkubation in 10 ml Erythrozyten-Lysepuffer. Nach Ablauf dieser Zeit wurden

2 Material und Methoden

die Ansätze zur besseren Zell-Sedimentation auf einen Gehalt von 5 % FKS eingestellt und abzentrifugiert (10 min, 1200 rpm, 4 °C).

Präparation von Leukozyten aus Blut

Murines Blut wurde mit Hilfe von Sodaglas Kapillaren unter Diethylether-Narkose aus dem retro-orbitalen Plexus entnommen und zur Verhinderung der Koagulation in 3,1 % Natrium-Citrat aufgefangen. Vor der Färbung wurde das Blut dann ähnlich wie die präparierten Milzen einer 10-minütigen Erythrozyten-Lyse bei RT unterzogen.

Präparation von Zellen der Lamina propria

Zur Analyse von Plasmazellen der Lamina propria wurde der Darm präpariert, gespült, von Fett und PP befreit und anschließend der Länge nach aufgeschnitten. Das so vorbereitete Gewebe wurde dann in etwa 5 cm lange Stücke zerteilt und zweimal mit etwa 25 ml FACS-Puffer in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen gewaschen. Im Anschluss daran folgte ein einminütiger Waschschrift mit kaltem PBS, dem 5 % FKS und 5 mM EDTA beigemischt waren. Zur Entfernung der IEL wurden die Darmstücke dreimal für 20 Minuten bei 37 °C mit je etwa 20 ml EDTA-haltigem Medium (5 % FKS, 1 % Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin-Stammlösung, 5 mM EDTA in RPMI) geschüttelt (Multitron II) und die Überstände verworfen. Anschließend wurde das Gewebe zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, kleingeschnitten und bei 37 °C in 25 ml Collagenase-Medium verdaut (6 mg Collagenase A und 20 % FKS in 25 ml RPMI). Nach 25 Minuten im Schüttelinkubator wurde das Gewebe 10 mal mit einer 20 ml Spritze ohne Nadel zur weiteren Zerkleinerung geschert und anschließend weitere 25 Minuten inkubiert. Im Anschluss daran folgte ein erneutes Scheren der Darmstücke und die Filtration durch Nylongaze. Die so erhaltenen Zellen konnten dann durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 1200 rpm und 4 °C sedimentiert werden. Zur weiteren Aufreinigung folgte ein Percoll-Gradient. Dafür wurde das Zellpellet in 40 % Percoll (in 10 % 10x-PBS und Medium) resuspendiert und vorsichtig auf 70 % Percoll-Lösung in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen geschichtet. Nach 20 Minuten Zentrifugation bei 2000 rpm (ohne Bremse) konnte der Lymphozytenring mit einer Pipette abgenommen werden. Abschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen.

2 Material und Methoden

Präparation von HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden mit Hilfe einer Absaugpumpe vom Medium befreit. Durch eine etwa 5-minütige Inkubation mit 10 ml Zelldissoziationsmedium lösten sie sich vom Boden der Zellkulturflasche. Im Anschluss daran wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min, 1200 rpm, 4 °C) und in FACS-Puffer aufgenommen.

Zell-Permeabilisierung zur Färbung intrazellulärer Moleküle

Zur intrazellulären Färbung für die Durchflusszytometrie wurden die Zellen zunächst fixiert, indem 100 µl Zellsuspension mit 100 µl 4 % PFA in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen gemischt wurden. Nach Ablauf der Zeit folgte die Zugabe von 1,2 ml PBSd und eine Zentrifugation für drei Minuten bei 1200 rpm. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 180 µl PBSd aufgenommen. Zur Permeabilisierung erfolgte dann die Zugabe von 20 µl frisch angesetzter 0,025 % Digitonin-Lösung. Nach 3 Minuten bei RT wurden 15 ml PBSd zugegeben und erneut 10 Minuten zentrifugiert. Die permeabilisierten Zellen wurden zur weiteren Behandlung schließlich in FACS-Puffer aufgenommen.

2.2.4.3. *Zellfärbung für die Durchflusszytometrie*

Die Durchflusszytometrie fand in dieser Arbeit Anwendung, um Zell-Populationen zu identifizieren und deren Expression von Oberflächenmolekülen wie CD155 und seinen Liganden zu untersuchen. Darüber hinaus ermöglichte sie aber auch die genaue Quantifizierung und Analyse der Zell-Subpopulationen, welche beispielsweise in den Migrationsmodellen rekrutiert wurden. Zur Auswertung wurde die WinList 5.0 Software verwendet (Verity Software House, ME, USA).

Die Färbung der Zellen für die Durchflusszytometrie wurde in 96-well Mikrotiterplatten mit V-förmigem Boden durchgeführt. Soweit nicht anders angegeben, erfolgten alle Schritte auf Eis. Für die Färbung wurden 10^6 Zellen in 50 µl pro well eingesetzt. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen erfolgte ein Inkubationsschritt mit 5 % Maus- oder Ratten-Serum. Danach wurden die verdünnten Antikörperlösungen zugegeben und – so nicht anders angegeben – 30 min auf den Zellen belassen. Zum (zweimaligen) Waschen der Zellen wurden die wells auf 150 µl aufgefüllt und die Zellen vorsichtig resuspendiert. Anschließend folgte die Zentrifugation der Platten für drei Minuten bei 1200 rpm (4 °C). Da die Zellen nach ihrer Sedimentation relativ fest am Platten-Boden sitzen, konnte der Überstand einfach schwungvoll ausgekippt werden.

Durchflusszytometrische Färbung von CD155

Für Färbungen mit den generierten anti-CD155-Antikörpern wurden die Zellen zunächst mit 5 % Maus-Serum geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den Antikörperklonen für eine Stunde auf Eis. Dabei wurden der Antikörperlösung zusätzlich 2,5 % Maus-Serum beigemischt. Nach Ablauf der Zeit und Waschen der Zellen folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (anti-Ratte-IgG-Cy5) ebenfalls in Gegenwart von 2,5 % Maus-Serum. Nach 20 Minuten auf Eis und erneutem Waschen der Zellen wurden die freien Valenzen des Sekundärantikörpers in einem 10-minütigen Blockierungsschritt mit 5 % Ratten-Serum abgesättigt. Danach folgten weitere Antikörperfärbungen wie zu Beginn des Kapitels beschrieben.

Durchflusszytometrie mit IgG-Fusionsproteinen

Um die Bindung der Fusionsproteine an transfizierte HEK293-Zellen zu untersuchen, wurden 2-5 µg Protein pro well eine Stunde auf Eis mit unblockierten Zellen inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen wurde das Protein mit Hilfe des anti-Human-IgG-Cy5-Antikörpers detektiert (20 Minuten auf Eis). Für Bindungs-Blockierungs-Experimente wurden zu den Zellen vor der Protein-Färbung 20 µg/ml Antikörperlösung gegeben. An eine 30-minütige Inkubation schloss sich ein einzelner Waschschrift an.

2.2.4.4. Modell der Zymosan-induzierten Peritonitis

Um die Rekrutierung von Monozyten/Makrophagen zu untersuchen, wurde unter anderem das Modell der peritonealen Entzündung verwendet. Dieses beruht auf der intraperitonealen Gabe von 1 mg Zymosan A in sterilen 500 µl PBS. Als Kontrolle dienten Tiere, die reines PBS verabreicht bekamen. Zur Untersuchung der Wirkung des CD155-IgG oder der anti-CD155-Antikörper wurden je 400 µg dieser Proteine eine Stunde vor der Zymosangabe i.v. injiziert. Nach 16 Stunden wurden die Tiere geopfert und das Peritoneum zunächst vorsichtig freigelegt. Durch eine Lavage konnten dann die Peritonealzellen isoliert werden. Dazu wurden 8 ml kalter Lavage-Puffer (3 % FKS in PBS) so injiziert, dass die Einstichstelle beim Herausziehen der Nadel durch Fettgewebe verschlossen wurde. Nach etwa einminütiger Inkubation unter leichter Massage des Peritoneums wurde die Zellsuspension mit Hilfe einer Spritze abgesaugt. Dabei fand eine Nadel mit 0,9 mm Durchmesser Verwendung, um auf die Zellen einwirkende Scherkräfte zu minimieren. Darüber hinaus wurde darauf geachtet, mindestens 6-7 ml Lösung zurückzugewinnen. Die zurückgewonnene Flüssigkeitsmenge

wurde protokolliert und die enthaltenen Zellzahlen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend folgte die durchflusszytometrische Identifikation der eingewanderten Zell-Populationen unter Benutzung von Antikörpern gegen CD11b und Gr-1.

2.2.4.5. *Markierung von Zellen mit CFSE oder TAMRA*

Für den adoptiven Transfer von Zellen wurden diese mit den Fluoreszenzfarbstoffen CFSE oder TAMRA markiert. Hierfür wurden mit Hilfe von Lympholyte M aufgereinigte Lymphozyten verwendet. Nachdem diese als Einzelzellsuspension vorlagen, wurden bis zu $10 \cdot 10^7$ Zellen in einer Konzentration von 10^7 Zellen/ml in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt. Dabei diente RPMI, dem 20 mM HEPES beigemischt waren, als Medium. Nach etwa 20 Minuten wurden die Farbstoffe in einer Endkonzentration von 0,075 µM (CFSE) bzw. 5 µM (TAMRA) zugegeben. Während der Färbung wurden die Zellen etwa alle 2-3 Minuten aufgeschüttelt. Nach 10 Minuten folgte die Zugabe von 40 ml eiskaltem FACS-Puffer, um die Färbung zu stoppen. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (1200 rpm, 15 min, 4 °C) und nach Absaugen des Überstandes erneut mit 50 ml FACS-Puffer gewaschen.

2.2.4.6. *Adoptiver Transfer*

Für den adoptiven Transfer wurden Wildtyp- und CD155^{-/-} Zellen präpariert und unterschiedlich wie unter 2.2.4.5 beschrieben markiert. Anschließend wurden die verschieden gefärbten Zellen zunächst grob 1:1 gemischt und einer durchflusszytometrischen Analyse unterzogen. Nach der Bestimmung der genauen Anteile der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen verschiedener Spender wurden die Gemische auf ein genaues 1:1-Verhältnis von Wildtyp- zu CD155^{-/-} Zellen (bezogen auf die CD4⁺ oder CD8⁺ Populationen) eingestellt. Nach einer erneuten Kontrollfärbung wurden die Zellen abzentrifugiert und in sterilem PBSd aufgenommen. Schließlich wurden etwa $5 \cdot 10^6$ Zellen des Gesamt-Zellgemisches i.v. in syngene Spendertiere injiziert. Bei geringen Abweichungen des Ausgangsverhältnisses wurden die Ergebnisse zur Auswertung im Nachhinein auf ein Ausgangsverhältnis von 1:1 normalisiert. Nach 12 Stunden wurden die Tiere getötet und die Anzahl der markierten Zellen in Blut, Milz, Lymphknoten sowie Peyerschen Platten bestimmt.

2 Material und Methoden

2.2.4.7. *FTY720-Behandlung*

Für die unter 3.5.1 beschriebenen FTY720-Experimente wurden 40 µg FTY720 oral appliziert (FTY720 wurde von V. Brinkmann [Novartis, Basel] zur Verfügung gestellt). Vor und 6 Stunden nach dieser Behandlung wurde die Zahl der Lymphozyten im Blut mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt.

2.2.4.8. *Immunisierungen*

Soweit nicht anders angegeben wurde am Tag vor der Immunisierung sowie an den Tagen 7, 14, 21 und 28 nach der Behandlung Blutproben aus dem retro-orbitalen Plexus genommen (etwa 150 µl pro Tier). Das in einem unbehandelten 1,5 ml-Reaktionsgefäß aufgefangene Blut wurde dann 10 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum abpipettiert und bei -20 °C gelagert.

Orale Immunisierung

Zur oralen Immunisierung wurden Mäuse mit einem Gemisch aus 500 µg TNP-BSA und 10 µg Cholera toxin (List) in 300 µl PBSd gavagiert.

Subkutane Immunisierung

Für die subkutane Immunisierung wurden 100 µg TNP-BSA und 10 µg Cholera toxin in 100 µl sterilem PBSd s.c. in die Flanke injiziert.

Intraperitoneale Immunisierung

Um Tiere intraperitoneal zu immunisieren, wurden 100 µg TNP-BSA oder NP-CGG zu 200 µl 2 % Aluminiumhydroxydgel gegeben und zur Komplexbildung 30 Minuten bei RT inkubiert. Im Anschluss daran wurden 200 µl i.p. appliziert.

T-Zell-unabhängige Immunisierung

Zur Immunisierung mit T-Zell-unabhängigen Antigenen wurde den Tieren 100 µl Pneumovax23 (Aventis Pasteur MSD, Leimen) i.p. verabreicht. Diese Menge enthält eine Mischung aus je 5 µg verschiedener Antigene. Nach sieben Tagen wurde das Serum der Mäuse auf spezifische IgM-Antikörper untersucht. Für diesen ELISA wurden die Platten mit 5 µl Pneumovax23 in 50 µl PBSd beschichtet.

Immunisierung mit lebenden Salmonellen

Der bei dieser Immunisierungsmethode verwendete SDB40-Salmonellenstamm wurde freundlicherweise von Dirk Buman (Universität Basel) zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um einen attenuierten *Salmonella typhimurium*-Stamm, der aufgrund einer Deletion im *aroA*-Gen nicht virulent ist. Bakterien dieses Stammes können bestimmte aromatische Verbindungen nicht selbst synthetisieren. Da diese Substanzen nicht in Säugetieren vorkommen, können sich die Bakterien dort schlecht vermehren.

Um Mäuse erfolgreich mit diesem Salmonellenstamm oral zu infizieren, muss das Trinkwasser der Tiere mindestens einen Tag vor der Behandlung mit 4 g/L Streptomycin versetzt werden. Am Tag der Infektion wurde eine 100 ml-Kultur aus einer Übernacht-Kultur angeimpft. Als Medium diente LB-Medium, welches die Antibiotika Streptomycin und Kanamycin enthielt. Nachdem die Bakterien bis zu einer optischen Dichte (600 nm) von etwa 1,5 gewachsen waren, wurden sie pelletiert und mit LB-Medium gewaschen, welches etwa 3 % Natriumhydrogencarbonat enthielt. Letzteres diente der Pufferung der Magensäure. Nach der photometrischen Bestimmung der Zellzahl wurden schließlich pro Maus 10^9 Bakterien in 100 µl oral appliziert.

2.2.4.9. *Präparation von intestinalem IgA*

Um ins Darmlumen sezernierte, Cholera-toxin-spezifische IgA-Antikörper zu präparieren, wurde der Darm freigelegt und ein 12 cm langes Stück aus der Mitte ausgeschnitten. Das Darmstück konnte dann auf einer Seite mit einer Klammer verschlossen und von der anderen Seite vorsichtig mit 400 µl Waschlösung (siehe S.20) befüllt werden. Nach dem Verschließen der noch offenen Seite und einer Minute Inkubation wurde eine Klammer entfernt und die Flüssigkeit möglichst vollständig aufgefangen. Eine nachfolgende Zentrifugation (13000 rpm, 5 min) ermöglichte die Entfernung unlöslicher Darminhalte. Die so gewonnenen Überstände wurden zu ihrer Volumenbestimmung gewogen und bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

2 Material und Methoden

2.2.4.10. ELISA

MaxiSorp-ELISA-Platten wurden übernacht bei 4 °C mit 60 ng Cholera-toxin oder 120 ng TNP-huAlbumin oder 120 ng Salmonella-LPS pro well beschichtet. Dabei diente 0,1 M Natriumcarbonatpuffer als Solvens. Nach einem einstündigen Blockschritt mit 2 % BSA in PBSd bei 37 °C wurden Verdünnungsreihen der Serumproben auf die einmal gewaschenen ELISA-Platten pipettiert. Während diesem und den folgenden Schritten diente PBST zur weiteren Minimierung unspezifischer Bindungen als Lösungsmittel. Für die Detektion antigenspezifischer Antikörper im Serum wurden HRPO- oder Biotin-konjugierte (-Bio) anti-Ig-Antikörper zugegeben und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Dabei wurden folgende mAK verwendet: anti-IgM^a-Bio, anti-IgG1-Bio, anti-IgG2a-Bio, anti-IgG2b-Bio und anti-IgA-HRPO. Biotinylierte Antikörper wurden dann durch SA-HRPO in einem weiteren Schritt nachgewiesen. Schließlich wurden die Platten 6 mal gewaschen und mit 85 µl OPD-Lösung je well versetzt. Direkt vor der Verwendung der OPD-Lösung wurden 2,8 µl H₂O₂ pro 10 ml Lösung zugegeben. Nach 5-20 Minuten konnten die Platten bei 450 nm im ELISA-Reader analysiert werden. Um mehrere verschiedene Experimente untereinander zu vergleichen, wurden die ermittelten Titer auf ein Wildtyp-Mittel von 1 normiert.

2.2.4.11. ELISPOT

Zur Quantifizierung der antigenspezifischen Plasmazellen wurde ein ELISPOT-Assay durchgeführt. Dieser ermöglichte die Bestimmung der Zellen, welche IgA-Antikörper gegen Cholera-toxin sezernieren. Zunächst wurden Multiscreen HTS-Platten übernacht bei 4 °C mit 100 ng Cholera-toxin pro well beschichtet. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, folgte ein 2-stündiger Blockierungsschritt mit 2 % BSA in PBS bei 37 °C. Anschließend wurden die wells mit je 10⁶ Zellen in 200 µl Medium (10 % FKS, 2mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin) beladen. Dabei wurden sowohl Zellen aus den MLN als auch aus der Lamina propria verwendet. Die Zellpräparation erfolgte wie für die Durchflusszytometrie beschrieben, allerdings unter weitgehend sterilen Bedingungen. Als Negativkontrolle dienten wells, die nur mit Medium versetzt wurden. Nach der Zugabe der Zellen wurden die Platten übernacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag konnten die Zellen dann durch zweimaliges Waschen mit dH₂O von den Platten entfernt werden. Zusätzlich schlossen sich zwei Wasch-Schritte mit 5 % FKS in PBS an. Zur Detektion der Cholera-toxin-spezifischen IgA-Antikörper folgte die Zugabe von 1 µg/ml anti-IgA-HRPO-

Antikörper. Schließlich wurden die Platten 6 mal mit PBST gewaschen und die Spots durch Inkubation mit AEC-Substratlösung gemäß den Angaben des Herstellers sichtbar gemacht.

2.2.4.12. *Fluoreszenzmikroskopie*

Für immunhistologische Aufnahmen wurden Gefrierschnitte einer Dicke von 8 μm angefertigt und mit 5 % Serum sowie dem DakoCytomation-Peroxidase-Blockierungsreagenz (Dako, Dänemark) in TBST blockiert. Anschließend folgte die Inkubation mit anti-CD155-Antikörper (4G3 oder polyklonales Serum) in TBST. Das Signal konnte über das Cy3-Tyramid-Verstärkersystem (Perkin Elmer, MA, USA) verstärkt werden. Im Falle des monoklonalen anti-CD155-Antikörpers wurde dann mit 3 % Ratten-Serum blockiert, bevor die Schnitte mit Antikörpern gegen CD31 (-FITC) und MECA79 (-Cy5) gefärbt wurden. Schließlich folgte eine Gegenfärbung mit DAPI (Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid). Die Analyse und Dokumentation wurde mit einem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop durchgeführt, welches mit einer Hamamatsu ORCA-ER-Digitalkamera ausgestattet ist.

2.2.5. **Mausstämme und deren Haltung**

Die verwendeten Mäuse wurden im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz gehalten und behandelt. Für alle in dieser Arbeit gezeigten Daten wurden Mäuse von reinem genetischen Hintergrund verwendet. Alle gezeigten Expressionsdaten basieren auf Untersuchungen von Balb/c-Mäusen. Das in dieser Arbeit untersuchte CD155-Expressionsmuster war jedoch absolut deckungsgleich mit dem in 129/Sv-Tieren, allerdings ist die CD155-Expression in diesen etwas schwächer. Alle hier dargestellten Tierexperimente sind, so nicht anders angegeben, von Tieren mit 129/Sv-Hintergrund.

129/Sv (J) und Balb/c (J) Tiere wurden sowohl von Charles River Lab. (Sulzfeld) als auch aus eigener Zucht (Zentrales Tierlabor, Medizinische Hochschule Hannover) bezogen. 129/Sv CD155^{-/-} Mäuse wurden in Zusammenarbeit mit W. Müller (HZI, Braunschweig) generiert (siehe [86]). CD155^{-/-} Tiere auf Balb/c-Hintergrund konnten durch die Rückkreuzung von 129/Sv CD155^{-/-} Tieren mit Balb/c-Mäusen gewonnen werden. Dabei wurden die Tiere erst ab der 7. Generation für Analysen verwendet.

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte die Funktion von murinem CD155 näher untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden zunächst monoklonale Antikörper gegen murines CD155 generiert. Die Erzeugung und Charakterisierung dieser Antikörper wird im ersten Abschnitt dieser Arbeit beschrieben. Bei der Untersuchung des Expressionsmusters von CD155 in der Maus wurde der Schwerpunkt auf Monozyten und B-Zell-Subpopulationen gelegt. Die Analyse von T-Zellen und Natürlichen Killerzellen war dagegen Inhalt der Dissertation von Sebastian Seth, die zur gleichen Zeit im Institut für Immunologie durchgeführt wurde. Im ersten Abschnitt der hier vorliegenden Arbeit werden zudem die Ergebnisse der Expressionsanalysen der CD155-Liganden CD226 und CD96 sowie der Interaktionsstudien von CD155 und CD96 dargestellt. Die durchgeführten funktionellen Studien bilden den zweiten Abschnitt der Arbeit. In diesem Abschnitt wird näher auf die Migration von Leukozyten im Gleichgewicht und unter inflammatorischen Bedingungen sowie die Untersuchung der Entwicklung einer humoralen Immunantwort eingegangen. Während murines CD155 im Gegensatz zum humanen Protein keinen Einfluss auf die Migration von Leukozyten zu haben scheint, konnte gezeigt werden, dass mCD155 nach oraler Applikation von Antigenen bei der Ausbildung einer humoralen Immunantwort involviert ist. CD155-defiziente Mäuse, die auf diese Weise mit Antigen in Kontakt kommen, zeigen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren deutlich reduzierte Mengen an spezifischen IgG1-, IgG2a-, IgG2b- und IgA-Antikörpern. Dass der beschriebene CD155-abhängige Effekt offensichtlich stark vom Applikationsweg des Antigens abhängig ist, wird dadurch belegt, dass intraperitoneal oder subkutan immunisierte Tiere eine normale humorale Antwort entwickeln.

3.1. Generierung und Charakterisierung von anti-mCD155-Antikörpern

3.1.1. Generierung von anti-CD155-Antikörpern

Um die Expression von murinem CD155 zu untersuchen, wurden in Zusammenarbeit mit Elisabeth Kremmer (GSF, München) monoklonale Ratte anti-Maus-Antikörper gegen dieses Molekül generiert. Als Antigen fungierte dabei rekombinantes CD155, welches aus der gesamten Ektodomäne sowie einem HIS-tag bestand. Die Hybridomüberstände der verschiedenen Klone wurden mittels Durchflusszytometrie von CD155-transfizierten

3 Ergebnisse

HEK293-Zellen auf ihre Fähigkeit murines CD155 zu binden untersucht. Klone, die das Protein effizient erkannten und keine Kreuzreaktivität zeigten, wurden mehrmals subkloniert, um Monoklonalität und Stabilität zu gewährleisten. Abb. 3 zeigt die Bindung von vier der generierten Antikörperklone an ektopisch CD155-exprimierende Zellen.

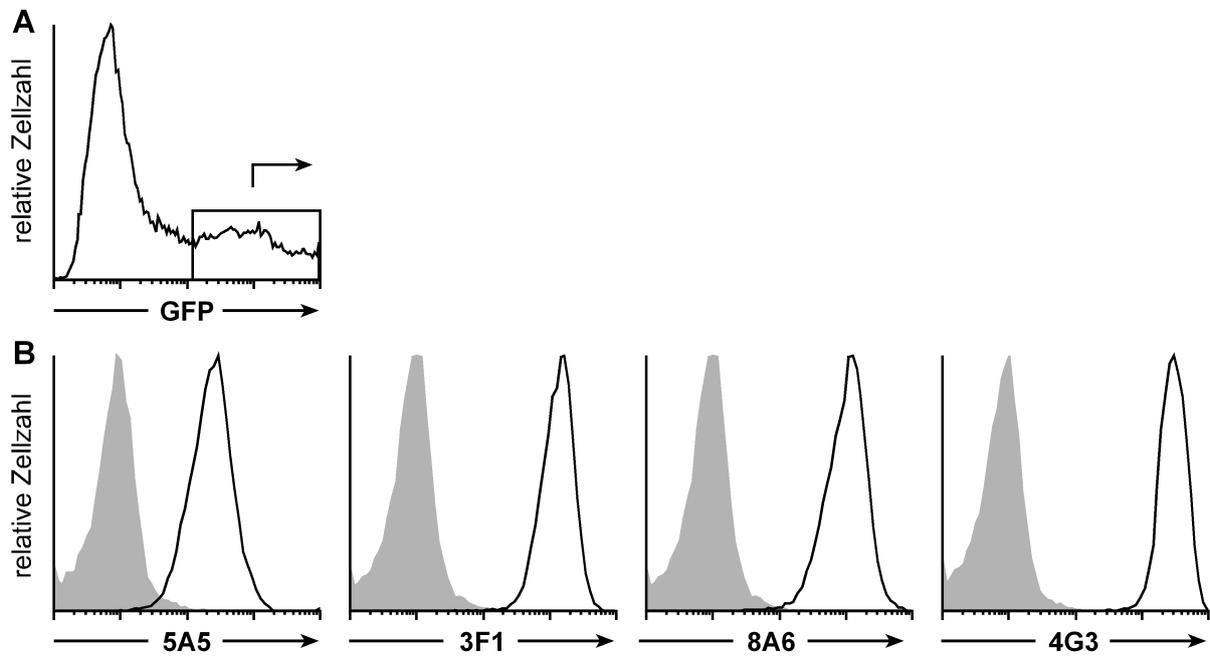


Abb. 3: Bindung von anti-CD155-Antikörpern an ektopisch exprimiertes CD155.

HEK293-Zellen wurden mit einer Mischung aus 20 μg mCD155-kodierenden und 2 μg GFP-kodierenden Plasmid kotransfiziert und durchflusszytometrisch analysiert. Um nur die tatsächlich transfizierten Zellen zu untersuchen, erfolgte die Analyse für hoch GFP-exprimierende Zellen (A). Der untere Teil der Abbildung (B) zeigt die Bindung der Antikörperklone 5A5, 3F1, 8A6 und 4G3 an diese Zellen. Die schwarze Linie zeigt die Antikörperbindung während die Isotypkontrolle grau dargestellt ist. Lebende HEK293-Zellen konnten anhand ihrer Größe und Granularität (FSC/SSC-Histogramm) identifiziert werden (nicht gezeigt).

Die Isotypen der Antikörper sind IgG1 (5A5), IgG2a (3F1, 8A6) und IgG2b (4G3). Kreuzreaktivität gegen das von HEK293-Zellen endogen exprimierte humane CD155 oder ektopisch exprimiertes Ratten-CD155 konnte bei keinem der gezeigten Klone festgestellt werden (nicht abgebildet). Parallel zur Bindung an transient exprimiertes mCD155 wurde bei der Auswahl der geeigneten Klone auch die Bindung an das endogen von Mauszellen exprimierte Protein geprüft (siehe 3.2).

3.1.2. Klonierung von chimären CD155-Proteinen

Monoklonale Antikörper können neben der Expressionsanalyse auch eingesetzt werden, um funktionelle Studien durchzuführen. Beispielsweise können sie nach Aufreinigung aus Hybridomüberständen Versuchstieren injiziert werden. Kommt es durch die Bindung des Antikörpers zu einer Blockierung der Interaktion zwischen dem Zielmolekül und dessen Liganden, kann unter Umständen eine mögliche Funktion dieser Wechselwirkung festgestellt werden. Bei so angelegten Experimenten ist es jedoch von Bedeutung, dass der Antikörper nicht nur das Zielmolekül bindet, sondern tatsächlich auch die Interaktion mit dessen Bindungspartnern (im Fall von CD155 beispielsweise CD96, CD226 oder Nectin-3) inhibiert. Um dies zu erreichen, sollte das vom Antikörper erkannte Epitop möglichst nahe an bzw. in der an der Interaktion beteiligten Region des Proteins liegen. Im Fall des CD155 ist vor allem die V-Domäne (Domäne 1) von Interesse, da – soweit bekannt – alle CD155/Nectin-Familienmitglieder ihre Interaktionen *in trans* über diese äußerste Domäne vollziehen [41, 46, 48, 87, 88]. Aus diesem Grund wurden chimäre CD155-Proteine kloniert, um mit deren Hilfe Antikörper zu finden, die die V-Domäne binden und so potentiell inhibierend wirken. Hierbei wurde von einem Plasmid ausgegangen, welches das Volllängen-Ratte-CD155 kodiert. Aufgrund der nicht vorhandenen Kreuzreaktivität der Antikörper ist ein Konstrukt dieser Spezies als „Rückgrat“ für die chimären Rezeptoren gut geeignet. Mit Hilfe von PCR-Mutagenese wurden zwischen den Domänen-kodierenden DNA-Regionen Schnittstellen für Restriktionsenzyme eingefügt, die in den entsprechenden Sequenzen von Maus, Ratte und Mensch schneiden. Durch das so entstandene „Kassettsystem“ konnten dann bei der weiteren Klonierung die Ratten-Domänen gegen murine oder humane Domänen ausgetauscht werden (siehe Abb. 4).

Die chimären Konstrukte, welche unterschiedlich viele Domänen des humanen Proteins enthalten, dienen für Interaktionsstudien mit löslichen IgG-Fusionsproteinen aus den Liganden CD96 sowie CD226. Während die Wechselwirkung der einzelnen Liganden mit Ratte- bzw. Maus-CD155 voraussichtlich gleich ausfallen müsste, ist eine Bindung an die humanen Domänen aufgrund der geringen Homologie zwischen Mensch- und Maus-CD155 nicht zu erwarten. Alle so generierten Expressionsklone wurden auch mit *Myc-tag* versehen, das den Nachweis der erfolgreichen Transfektion ermöglicht.

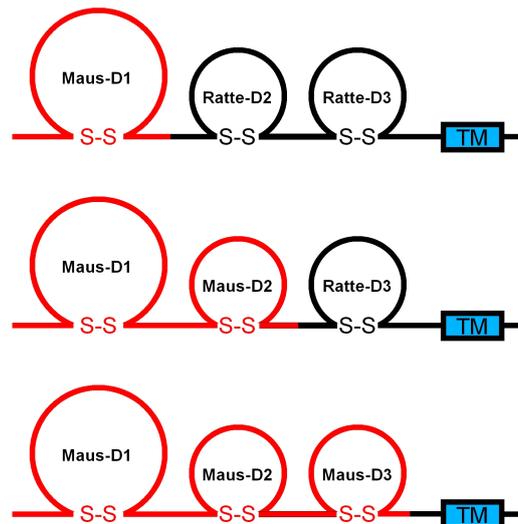


Abb. 4: Skizze der chimären CD155-Proteine.

In die DNA-Sequenz von Ratte-CD155 wurden mit Hilfe von PCR-Mutagenese zwischen den die Ig-ähnlichen Domänen-kodierenden Bereichen Schnittstellen eingefügt, welche auch in Maus-, Ratte- und Human-CD155 verwendet werden können. Durch das so entstandene universale „Kassetten-system“ konnten dann unterschiedlich viele Domänen des Rattenkonstrukts durch Domänen aus murinem oder humanem CD155 ersetzt werden. Die Abbildung zeigt ein Beispiel für drei chimäre CD155-Proteine, bei denen von oben nach unten eine, zwei oder alle drei Ig-ähnlichen Domänen gegen die entsprechende murine Sequenz ausgetauscht wurden.

Übersicht und Nomenklatur der generierten chimären CD155-Proteine:

MRR-CD155	Domäne 1: murin *
MMR-CD155	Domäne 1 und 2: murin *
MMM-CD155	Domäne 1 bis 3: murin *
HRR-CD155	Domäne 1: human *
HHR-CD155	Domäne 1 und 2: human *
HHH-CD155	Domäne 1 bis 3: human *

* Der jeweilige Rest des Proteins besteht aus Ratte-CD155. Alle sechs Konstrukte wurden mit und ohne *Myc-tag* kloniert.

3.1.3. Epitopkartierung der anti-CD155-Antikörper

Um Antikörperklone zu identifizieren, die potentiell die Interaktionen von CD155 mit seinen Liganden unterbinden können, wurden HEK293-Zellen mit Plasmiden transfiziert, die chimäre CD155-Proteine kodieren (vgl. 3.1.2). Da die Antikörper keine Kreuzreaktivität mit dem Rattenprotein zeigten, konnte die Bindung an Rezeptorchimären, die unterschiedlich viele Mausdomänen enthalten, verglichen werden. Zur Transfektionskontrolle wurden Zellen permeabilisiert und das intrazelluläre (C-terminal lokalisierte) *Myc-tag* mittels einer

Antikörperfärbung nachgewiesen. Die erfolgreiche Transfektion aller DNA-Konstrukte konnte so gezeigt werden (nicht abgebildet). Unter den vier subklonierten CD155-Antikörperklonen war jedoch keiner, dessen Epitop innerhalb der Maus-Domäne 1 des CD155 lag (Abb. 5). Im Gegensatz dazu binden alle vier Klone die Zellen, sobald zusätzlich zur Domäne 1 auch die zweite Domäne murinen Ursprungs ist (MMR-CD155). Bei Zellen, die alle drei Maus-Domänen exprimierten, konnte kein weiterer Anstieg der Bindungsintensität beobachtet werden (nicht gezeigt). Folglich scheinen alle verwendeten Antikörper ein Epitop innerhalb der Domäne 2 zu erkennen. Die relativen Bindungsstärken sind in dem gezeigten Experiment niedriger als beispielsweise die Bindung an Volllänge-mCD155 in Abb. 3. Dies ist jedoch in einer höheren Verdünnung der eingesetzten Kulturüberstände sowie der fehlenden Kotransfektion und Analyse mit GFP begründet.

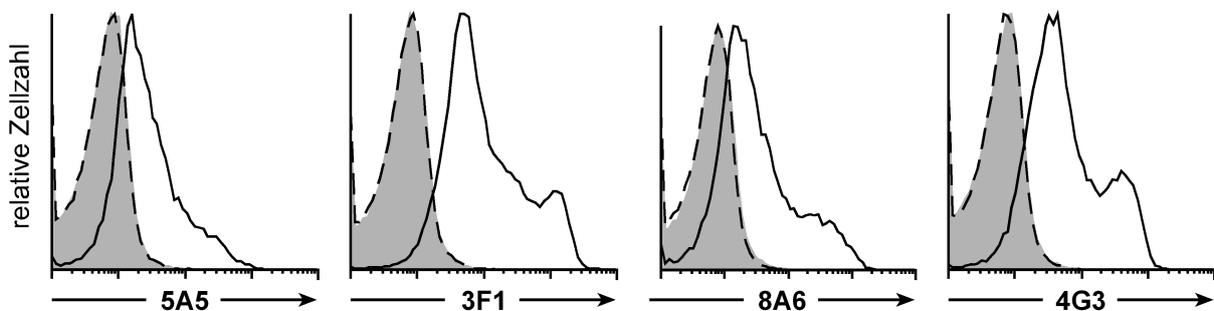


Abb. 5: Epitopkartierung der anti-CD155-Antikörper mit Hilfe der chimären CD155-Proteine.

Durchflusszytometrie von HEK293-Zellen, die mit Plasmiden für chimäre CD155-Proteine transfiziert wurden. Die Bindung der Isotypkontrollen ist grau unterlegt. Keiner der subklonierten Antikörperklone bindet das nur die Maus Domäne 1 enthaltende CD155-Konstrukt (MRR-CD155, gestrichelte Linie). Im Gegensatz dazu zeigen alle Antikörper eine Bindung an die Rezeptorchimäre, welche die murinen Domänen 1 und 2 enthält (MMR-CD155, durchgezogene Linie).

3.2. Expressionsmuster von murinem CD155

Humanes CD155 wird von einer Vielzahl verschiedener Gewebe exprimiert. Darunter zeigt sich auch ein charakteristisches Expressionsmuster auf verschiedenen Immunzellen. Es umfasst unter anderem Monozyten, DC und FDC. Nach der Identifikation von Tage4/mCD155 als das zum humanen CD155 orthologe Protein [45] sollte nun im Rahmen dieser Arbeit das murine CD155-Expressionsmuster untersucht werden. Nachdem vier monoklonale Antikörper generiert werden konnten, die sowohl ektopisch als auch endogen exprimiertes CD155 erkennen, wurden verschiedene Leukozytenpopulationen durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wurden die Untersuchungen – so nicht anders angegeben – mit dem Antikörperklon

3F1 durchgeführt. Nachdem Reymond et al. *in vitro* zeigen konnten, dass humanes CD155 an der transendothelialen Migration von Monozyten beteiligt ist, stand zunächst die Untersuchung von murinen Monozyten im Vordergrund. Im Gegensatz zu Monozyten humanen Ursprungs, welche über die Oberflächenmarker CD14 und CD16 näher charakterisiert werden können, kann man in der Maus Antikörper gegen CD11b und Gr-1 (Ly6C / Ly6G) verwenden, um Monozyten-Subpopulationen zu detektieren und zu unterscheiden: murine Monozyten lassen sich so in eine residente und eine inflammatorische Population unterteilen. Während residente Monozyten nur marginale Mengen Gr-1 exprimieren, weisen inflammatorische Monozyten eine intermediäre Expression dieses Moleküls auf. Von diesen beiden Populationen werden nur die inflammatorischen Monozyten zu lokalen Entzündungsorten rekrutiert [4]. Dabei spielt der Chemokinrezeptor CCR2 eine wesentliche Rolle. Seine Anwesenheit auf der Zelloberfläche ist ein weiteres Identifikationsmerkmal für inflammatorische Monozyten [89]. Abb. 6A zeigt eine durchflusszytometrische Untersuchung von Mausblut unter Verwendung der oben genannten Antikörper. Betrachtet man die Expression von CD11b und Gr-1 auf diesen Zellen, lassen sich vier klar getrennte Populationen erkennen. Die blau umrandete Population aus CD11b⁺Gr-1⁻ Zellen stellt die Population der residenten Monozyten dar, während die rot umrandete Population hoch CD11b und intermediär Gr-1 exprimiert und aus inflammatorischen Monozyten besteht. Dieser Befund wird durch die deutlich unterschiedliche CCR2-Expression gestützt (Der anti-CCR2-Antikörper wurde unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise von Matthias Mack zur Verfügung gestellt). Das CCR2-Expressionsmuster zeigt, dass die Färbung der Zellen mit Antikörpern gegen CD11b und Gr-1 ausreichend ist, um die beiden Monozyten-Populationen klar voneinander unterscheiden zu können. Mit Hilfe dieser beiden Marker können zudem neutrophile Granulozyten identifiziert werden, welche beide Oberflächenmoleküle sehr hoch exprimieren (Abb. 6A), [90]. Anhand dieser Färbung zur Identifikation der Zell-Populationen wurde im Folgenden die Expression von mCD155 untersucht.

Analog zu den Studien mit humanen Zellen konnte murines CD155 auf Monozyten detektiert werden. Während die inflammatorische Subpopulation moderate Mengen an CD155 aufwies (3,85-fach über dem Hintergrund), exprimierten residente Monozyten das Protein nur in geringem Ausmaß (2,26-fach; Abb. 6B). Im Gegensatz dazu konnte kein CD155 auf Neutrophilen detektiert werden.

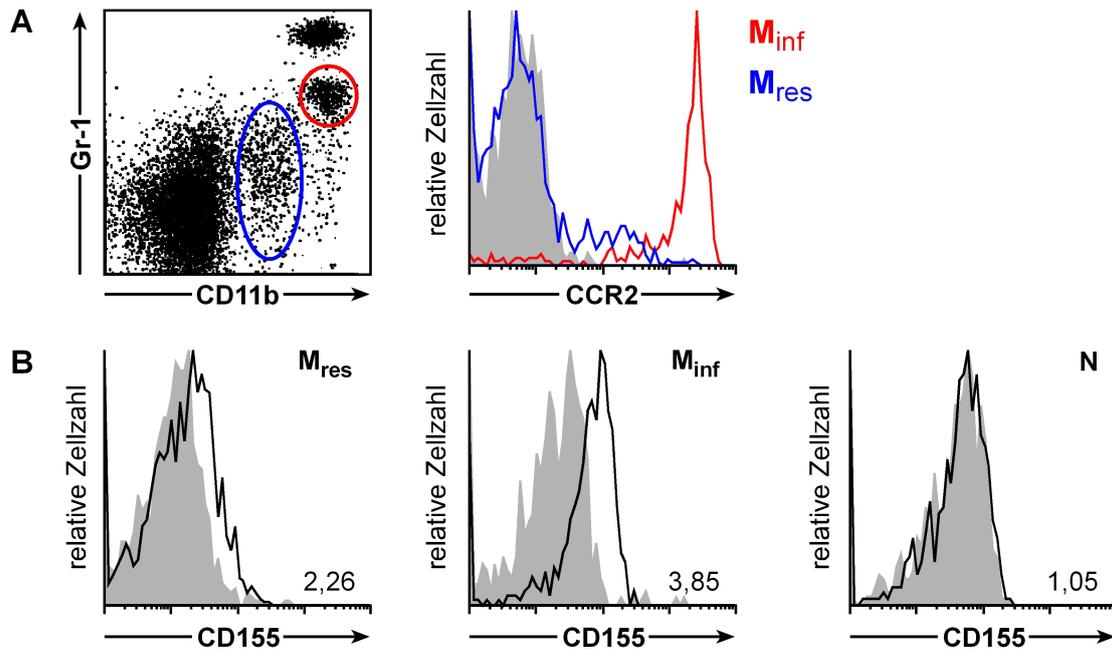


Abb. 6: Untersuchung der mCD155-Expression auf Monozyten und Neutrophilen.

(A) Murine Monozyten können in zwei Hauptpopulationen unterteilt werden: residente Monozyten (M_{res} , $CD11b^+Gr-1^-$) und inflammatorische Monozyten (M_{inf} , $CD11b^{hi}Gr-1^+$). Mit Hilfe der beiden Marker CD11b und Gr-1 können auch Neutrophile (N, $CD11b^{hi}Gr-1^{hi}$) durchflusszytometrisch bestimmt werden. Untersucht man die beiden monozytären Populationen auf die Expression von CCR2, so bestätigt sich, dass dieser Chemokinrezeptor ausschließlich auf inflammatorischen Monozyten zu finden ist. (B) Anhand obiger Kriterien wurden Monozyten und Neutrophile aus Mausblut auf ihre CD155-Expression durchflusszytometrisch analysiert. Die Zahl rechts unten im Diagramm gibt als Maß für die Expressionsstärke den Quotient aus den mittleren Fluoreszenzintensitäten von CD155-Antikörper-Bindung und Isotypkontrolle an.

Zusätzlich zu diesen Populationen wurden auch andere immunologisch relevante Zelltypen untersucht. Dies geschah, wie eingangs erwähnt, im Rahmen von anderen Dissertationen am Institut für Immunologie. Zusammengefasst zeigte sich ein mCD155-Expressionsmuster, welches größtenteils mit dem Expressionsprofil humaner Gewebe (soweit publiziert) übereinstimmte. Die höchste CD155-Expression zeigten dabei Thymozyten. Des Weiteren konnte CD155 in unterschiedlichem Ausmaß auf weiteren T-Zell-Subtypen, DC und Natürlichen Killerzellen detektiert werden ([86], und Dissertationen von Sebastian Seth und Quan Qiu). Die Ähnlichkeit des Expressionsmusters zwischen Maus und Mensch ist ein weiterer Hinweis, dass mit Tage4 das korrekte Human-Ortholog identifiziert wurde.

Zur Unterstützung der funktionellen Analysen der humoralen Immunantwort von CD155-defizienten Mäusen wurden neben den erwähnten Zellarten auch B-Zell-Subpopulationen in Wildtyp-Tieren analysiert. Hierzu wurden Zellen aus der Milz isoliert und mit Antikörpern gegen CD155, IgM, CD21 und CD23 gefärbt. Anhand dieser Färbung lassen sich folliculäre B-Zellen (foB , $CD21^{int}CD23^{hi}$) und Marginalzonen-B-Zellen (MZB , $CD21^{hi}CD23^{int}$) unter-

3 Ergebnisse

scheiden (Abb. 7A). Beide B-Zell-Populationen exprimieren nur geringe Mengen CD155, wobei die Expression auf MZB etwas höher als auf foB war.

Auch die Analyse von Keimzentrums-B-Zellen (KZB) aus Peyerschen Platten oder mesenterialen Lymphknoten zeigte nur geringe CD155-Spiegel. Diese Zellen können über die intermediäre Expression von CD38 sowie die Bindung von Erdnuss-Agglutin (PNA) identifiziert werden. Unter den B-Zell-Populationen zeigten einzig IgA⁺CD138⁺ Plasmazellen (PB) aus der Lamina propria deutlichere CD155-Expression (Abb. 7A und B).

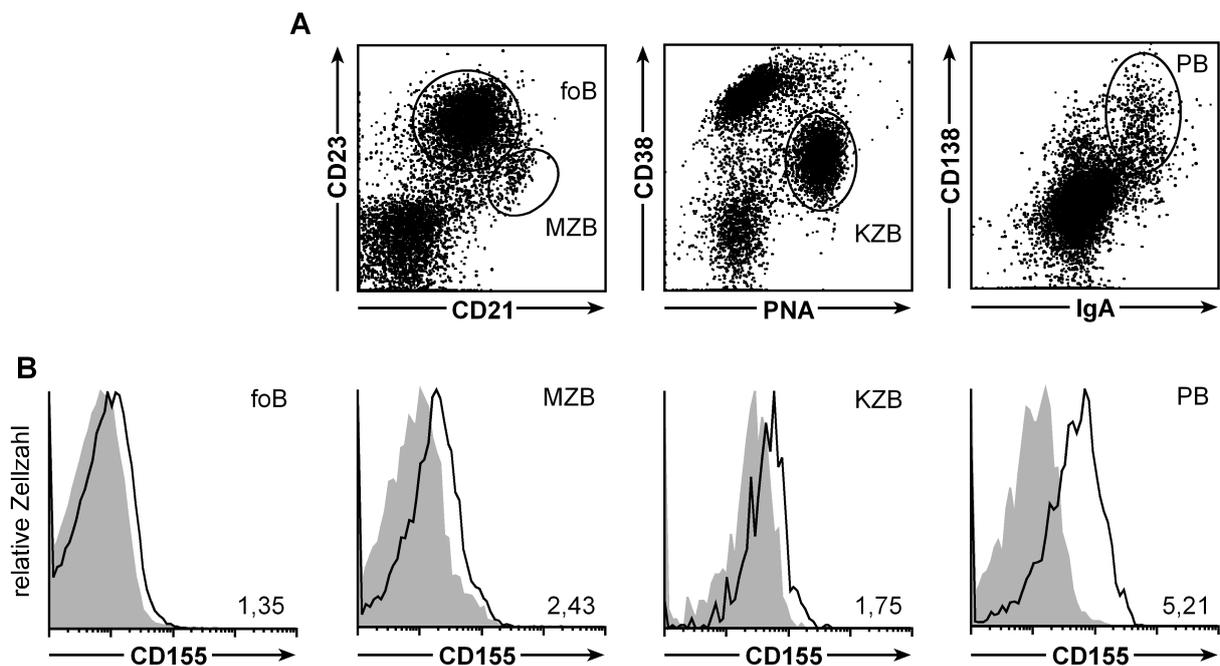


Abb. 7: CD155-Expression auf verschiedenen B-Zell-Subpopulationen.

(A) Färbestrategien zur Identifikation von B-Zell-Subpopulationen: folliculäre B-Zellen und Marginalzonen-B-Zellen der Milz wurden mit Hilfe von CD21 und CD23 identifiziert. Keimzentrums-B-Zellen (KZB) aus den mesenterialen Lymphknoten werden von PNA und anti-CD38-Antikörpern gebunden. Plasmazellen aus der Lamina propria konnten mit Antikörpern gegen Oberflächen-IgA und CD138 nachgewiesen werden. (B) CD155-Expression auf folliculären B-Zellen (foB), Marginalzonen-B-Zellen (MZB), Keimzentrums-B-Zellen (KZB) und Plasma-B-Zellen (PB).

Aufgrund der sehr geringen CD155-Expression wurden alle gezeigten durchflusszytometrischen Untersuchungen zusätzlich durch Wiederholung der Analysen mit CD155-defizienten Tieren kontrolliert. Da die schwachen Signale auf den CD155-defizienten Zellen gänzlich verschwanden, zeigten diese Experimente, dass es sich tatsächlich um eine spezifische – wenn auch teilweise sehr schwache – Expression von CD155 handelt (Daten nicht abgebildet).

3 Ergebnisse

Humanes CD155 wird auch von endothelialen Zellen der Plazenta, humanen Nabelschnurvenen-Zellen (HUVEC) sowie Endothelien im Darm exprimiert [42]. Es konnte aber nicht auf HEV von sekundären lymphatischen Organen (SLO) detektiert werden [62]. Um zu überprüfen, ob das Expressionsmuster des murinen CD155 auch hier dem humanen Expressionsprofil ähnelt, wurden Gefrierschnitte von mesenterialen Lymphknoten (und anderen SLO) angefertigt und mit Markern für Endothelzellen (CD31), HEV (MECA79) sowie CD155 angefärbt. Dabei wurde in den hier gezeigten Abbildungen ein Affinitäts-gereinigtes polyklonales Kaninchen-Serum gegen CD155 verwendet. Dieses zu Beginn der Arbeit bereits vorliegende Serum übertraf die neu generierten monoklonalen Antikörper in der histologischen Färbung. Zwar zeigten die mAK ebenfalls spezifische Zellfärbung, allerdings nicht in der hohen Intensität wie das polyklonale Serum. Die Spezifität der Färbungen wurde mit CD155^{-/-} Tieren verifiziert. Allgemein bestätigten die nachträglich mit den monoklonalen Antikörpern durchgeführten immunhistologischen Untersuchungen exakt die bereits mit dem polyklonalen Serum erzielten Ergebnisse. Die gefärbten Schnitte von Wildtyp-Mäusen zeigten eine Kolokalisation von CD155 mit allen CD31 positiven Zellen (Abb. 8). Im Gegensatz zum humanen System fand sich auch auf durch MECA79 identifizierten HEV eine deutliche Expression von CD155.

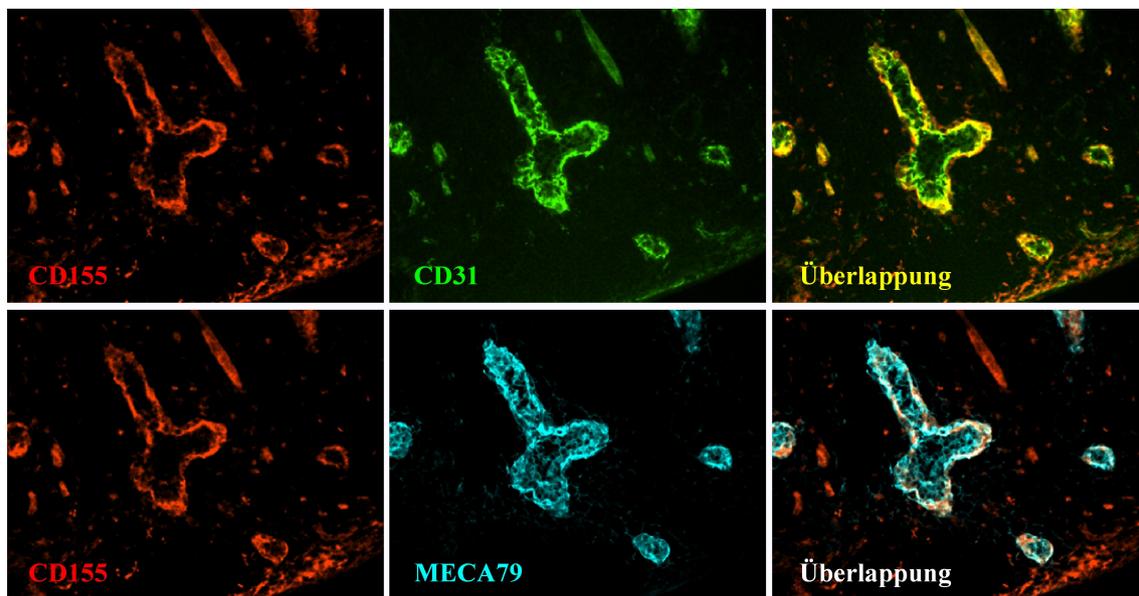


Abb. 8: Expression von mCD155 auf endothelialen Gefäßen der MLN.

Gefrierschnitte von mesenterialen Lymphknoten wurden mit anti-CD31-FITC (Endothelmarker, grün), anti-MECA79 (Marker für HEV, cyan) und gereinigtem polyklonalem Kaninchen-Antiserum gegen CD155 (rot) gefärbt. Die Aufnahme erfolgte mit einem 20x Objektiv.

3.3. Murine Expression der CD155-Liganden CD96 und CD226

CD155 bindet *in trans* an verschiedene Interaktionspartner, die auf der Zelloberfläche anderer Zellen exprimiert werden. Darunter sind CD96, CD226 und Nectin-3. Während Nectin-3 vor allem Bedeutung bei der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten zugeschrieben wird, sind CD96 und CD226 speziell in immunologischer Hinsicht interessant. Beide Moleküle werden von verschiedenen Lymphozytenpopulationen exprimiert und werden mit der NK-Zell-vermittelten Zelllyse in Zusammenhang gebracht [55, 56, 64]. In *in vitro*-Experimenten mit humanen Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass CD155 an der transendothelialen Migration von Monozyten beteiligt ist [62]. Da auch murines CD155 nicht nur auf Lymphozyten sondern auch auf Endothelzellen detektiert werden konnte, kam der Analyse der Expression von CD155-Liganden auf Lymphozyten ebenfalls Bedeutung zu. Um solche Untersuchungen zu ermöglichen, wurden im Rahmen der Dissertation in der Arbeitsgruppe Antikörper gegen murines CD96 generiert (Seth, Maier et al., Manuskript eingereicht). Später folgten auch Antikörper gegen Maus-CD226. Die hier abgebildeten Ergebnisse wurden mit dem freundlicherweise von A. Shibuya zur Verfügung gestellten anti-mCD226-Antikörperklon Tx42 durchgeführt.

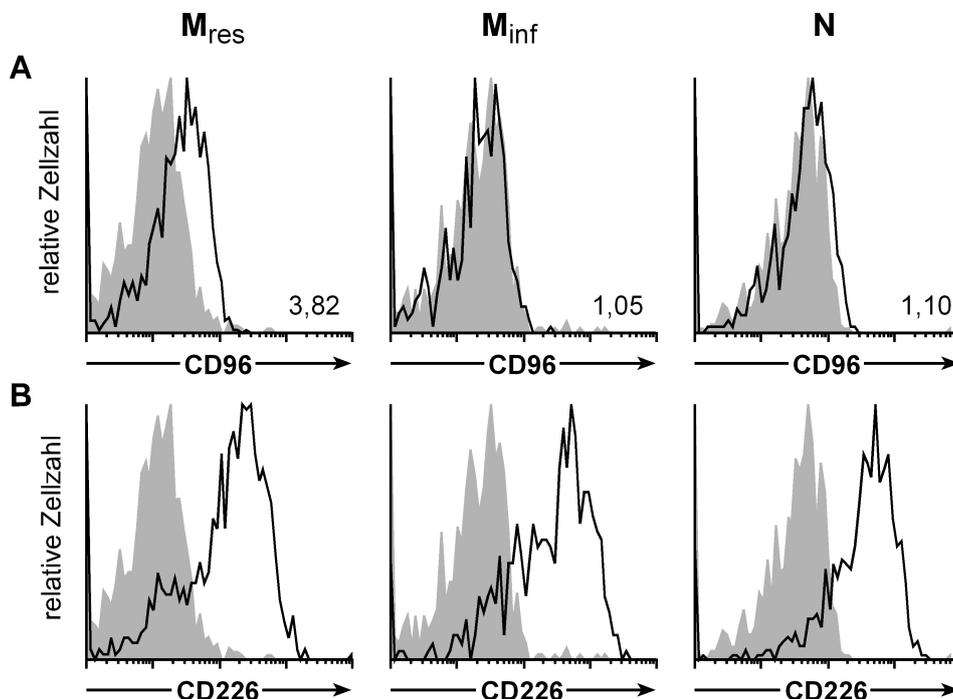


Abb. 9: Expression von CD96 und CD226 auf Monozyten und Neutrophilen.

Blutzellen wurden wie in Abb. 6 beschrieben mit anti-Gr-1 und anti-CD11b-Antikörpern gefärbt und auf ihre CD96- (A) bzw. CD226- (B) Expression untersucht. M_{res} : residente Monozyten, M_{inf} : inflammatorische Monozyten, N: Neutrophile. Aufgrund der uneinheitlichen CD226-Expression wurde auf die Angabe der Expressionsstärken verzichtet.

3 Ergebnisse

Während humanes CD96 weder auf Neutrophilen (CD16⁺) noch CD14-positiven Monozyten nachgewiesen werden konnte [64], zeigten die hier vorliegenden Untersuchungen von Zellen murinen Ursprungs, dass residente Monozyten CD96 exprimieren. Auf Neutrophilen und inflammatorischen Monozyten fanden sich dagegen keine signifikanten Signale (Abb. 9A). Anders war das Bild des CD226-Expressionsmusters. Alle drei untersuchten Populationen (M_{res} , M_{inf} , N) exprimierten verhältnismäßig große Mengen CD226 (Abb. 9B). Die erhaltenen CD226-Signale speziell auf Monozyten machten deutlich, dass CD226 innerhalb jeder der beiden Hauptpopulationen inhomogen exprimiert wird. Ein kleiner Teil der untersuchten Zellen bleibt in beiden Fällen negativ für CD226. Aus diesem Grund wurde für diese Zellen auf die Angabe von Expressionsstärken verzichtet.

Neben der Analyse von Monozyten und Neutrophilen im Blut wurde auch die Expression der Liganden CD96 und CD226 auf B-Zell-Subpopulationen untersucht (Abb. 10).

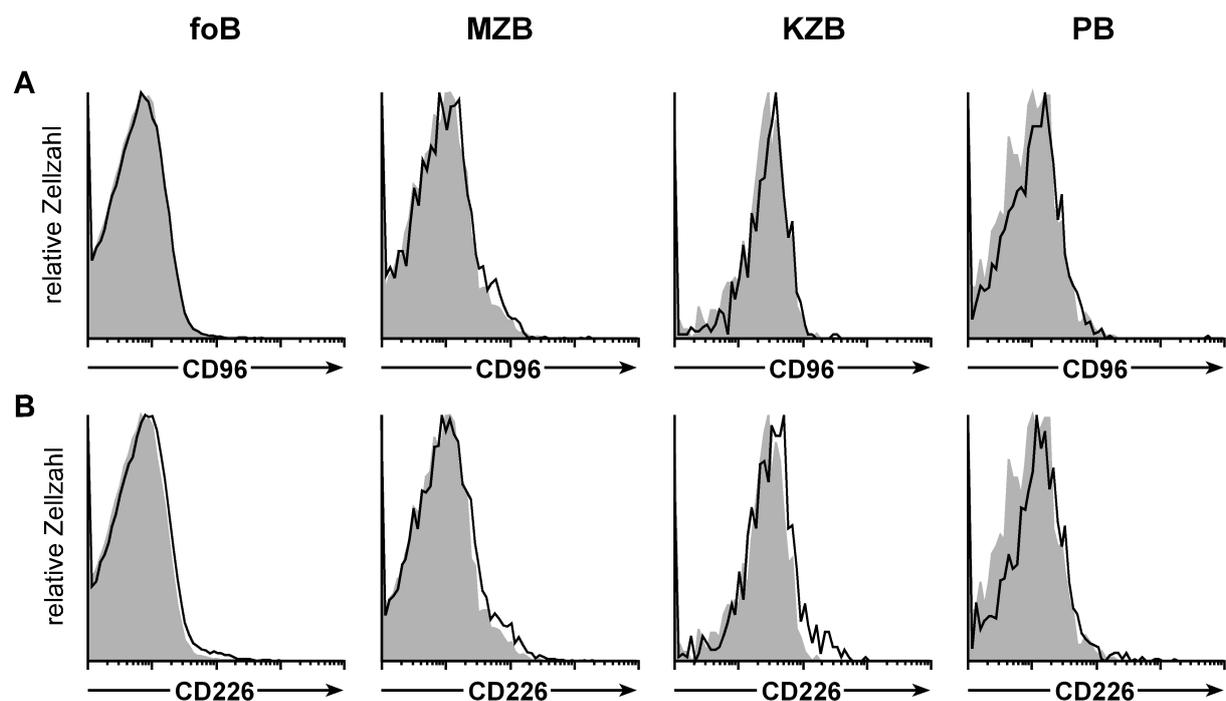


Abb. 10: Expression von CD96 und CD226 auf B-Zell-Subpopulationen.

B-Zellen wurden wie in Abb. 7 beschrieben gefärbt und auf CD96- (A) sowie CD226-Expression (B) untersucht. foB: folliculäre B-Zellen, MZB: Marginalzonen-B-Zellen, KZB: Keimzentrums-B-Zellen, PB: Plasma-B-Zellen.

Dabei stellte sich heraus, dass keine der analysierten B-Zell-Populationen nennenswerte Mengen CD96 oder CD226 auf ihrer Oberfläche trägt. Wo ein Vergleich möglich ist, deckt sich dieser Befund weitgehend mit der bisher publizierten Literatur [59, 63, 64]. In vereinzelten Studien wurde CD226-Expression auf einer sehr wenige Zellen umfassenden und nicht weiter identifizierten Subpopulation muriner und humaner B-Zellen nachgewiesen [54,

84]. Expression dieser beiden CD155-Liganden zeigte sich zudem auf T-Zellen und NK-Zellen, aber auch auf bestimmten DC-, und Thymozyten-Subpopulationen (Sebastian Seth, persönliche Kommunikation).

3.4. Interaktion zwischen murinem CD155 und CD96

3.4.1. CD96 bindet die erste Ig-ähnliche Domäne des CD155

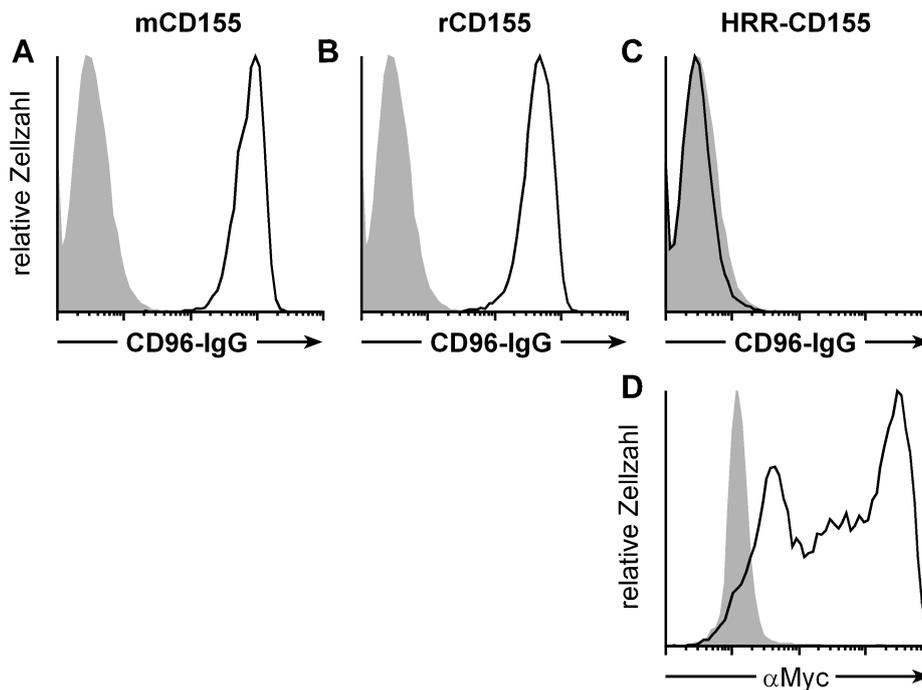


Abb. 11: Murines CD96 bindet CD155 innerhalb dessen erster Domäne.

HEK293-Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die Volllänge-Maus-CD155 (A), Ratten-CD155 (B) oder das chimäre HRR-CD155-Konstrukt (vgl. 3.1.2) kodieren (C). Als Negativkontrolle diente humanes Volllängen-CD155 (grau). Mit Hilfe eines anti-Myc-Antikörpers wurde die Expression des chimären CD155 überprüft (D).

Das Vorliegen der chimären CD155-Proteine ermöglichte neben einer Epitopkartierung der anti-CD155-Antikörper auch die Analyse, welche CD155-Domänen an der Bindung von CD96 involviert sind. Hierfür konnte auf ein lösliches Fusionsprotein aus der Ektodomäne von murinem CD96 und dem C-Terminus eines humanen IgG1-Teils zurückgegriffen werden. Die lösliche Form des CD96 kann in der Durchflusszytometrie über einen Fluoreszenzmarkierten anti-human-IgG-Antikörper detektiert werden. Erste Experimente mit transfizierten HEK293-Zellen zeigten, dass das CD96-IgG-Protein an Zellen bindet, die ektopisch Maus- oder Ratte-CD155 exprimieren (Abb. 11A und B). Da CD155 zwischen diesen beiden Spezies gut konserviert ist, war zu erwarten, dass die Interaktion zwischen Maus-CD96 und

Ratte-CD155 stattfindet. Im Gegensatz dazu konnte humanes Volllängen-CD155, welches eine Sequenz-homologie von etwa 42 % zum murinen Protein hat, nicht gebunden werden (Abb. 11, grau). Zellen, die mit einem Plasmid transfiziert wurden, welches eine CD155-Rezeptorchimäre kodiert, bei der die erste Domäne humanen Ursprungs ist (HRR-CD155), zeigten ebenfalls keinerlei Bindung des CD96-Fusionsproteins (Abb. 11C). Um die Effizienz der Transfektion zu prüfen, wurden Zellen mit einem GFP-Plasmid kotransfiziert. Darüber hinaus konnte das chimäre Konstrukt über sein *Myc-tag* und eine intrazelluläre anti-Myc-Antikörperfärbung nachgewiesen werden (Abb. 11D). Erwartungsgemäß war auch keine Interaktion mit den Rezeptorchimären festzustellen, die mehrere humane Domänen enthielten. Anhand dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass bei der CD96-CD155-Wechselwirkung die erste Ig-ähnliche Domäne des CD155 involviert ist.

3.4.2. Blockierung der CD96-CD155-Interaktion durch anti-CD155-Antikörper

Die Experimente aus Abschnitt 3.1.3 zeigten, dass die Epitope aller verwendeten anti-CD155-Antikörperklone im Bereich der zweiten Domäne des CD155-Rezeptors liegen. Dennoch ist es denkbar, dass die Antikörperbindung beispielsweise aufgrund einer sterischen Hinderung zu einer Blockierung der CD155-Interaktion mit seinen Liganden führt. Eine Untersuchung dieses Sachverhaltes wurde durch die Verwendung des löslichen CD96-IgG-Fusionsproteins ermöglicht. Als Negativkontrolle dienten HEK293-Zellen, die MOCK-transfiziert wurden. Auf diesen Zellen zeigte das Sekundärreagenz keine Reaktivität. Um die spätere Analyse auf erfolgreich transfizierte Zellen einschränken zu können, wurde ein GFP-Plasmid kotransfiziert. Darüber hinaus wurde die mCD155-Expression mit Hilfe der anti-CD155-Antikörper kontrolliert. Wie in Abb. 12 zu sehen ist, hat die Präinkubation der transfizierten Zellen mit den Antikörperklonen 5A5 und 8A6 keinen nennenswerten Einfluss auf die CD96-Bindung (Abb. 12A und C). Im Gegensatz dazu konnte eine fast vollständige Inhibition der CD96-CD155-Interaktion mit den Klonen 3F1 und 4G3 erzielt werden (Abb. 12B und D). Diese Inhibition war erwartungsgemäß abhängig von der zugegebenen Antikörperkonzentration und trat nicht bei Präinkubation mit der jeweiligen Isotypkontrolle auf. Ein lösliches CD226-IgG-Fusionsprotein lag zum Zeitpunkt der ersten Untersuchungen nicht vor, so dass zunächst nur davon ausgegangen werden durfte, dass die Bindung zwischen CD155 und dem Liganden CD96 durch zwei der Antikörper möglicherweise auch *in vivo* inhibiert werden kann.

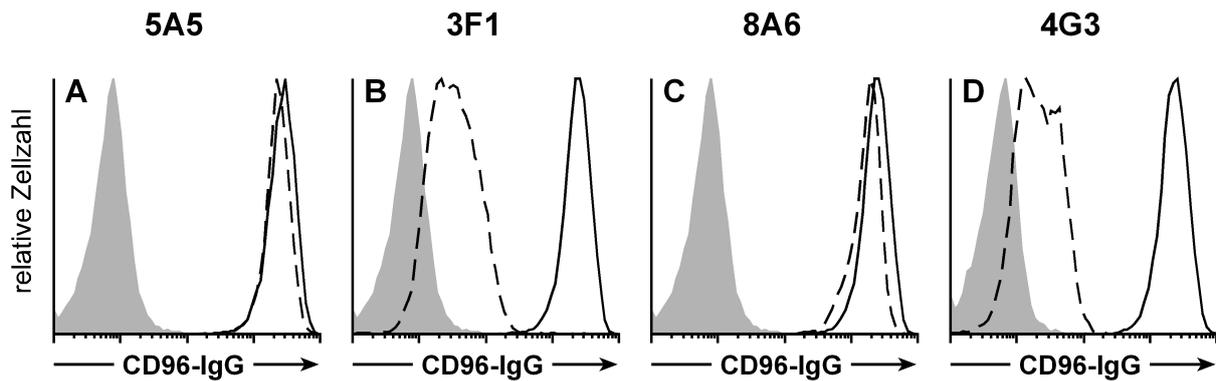


Abb. 12: Blockierung der CD155-CD96-Interaktion durch anti-CD155-Antikörper.

Bindung von löslichem CD96-IgG-Fusionsprotein an CD155-transfizierte HEK293-Zellen nach Präinkubation mit anti-CD155-Antikörpern. Die Zellen wurden mit 20 µg/ml der Antikörperklone 5A5 (A), 3F1 (B), 8A6 (C) oder 4G3 (D) vorinkubiert. Anschließend wurde die Bindung von mCD96-IgG an die Zellen mit Hilfe eines anti-IgG-Sekundärantikörpers gemessen. Grau: CD96-IgG-Bindung an untransfizierte Zellen (GFP-negative Zellen), durchgezogene Linie: CD96-IgG-Interaktion nach Präinkubation mit Isotypkontroll-Antikörper, gestrichelte Linie: CD96-IgG-Bindung nach Vorbehandlung mit anti-CD155-Antikörpern. Nicht gezeigt: Die Auswertung erfolgte für GFP^{hi-int} Zellen.

Um das Blockierungspotenzial der anti-CD155-Antikörper weiter zu untersuchen, wurden auch inhibitorische Bindungsstudien mit endogen CD155 exprimierenden Maus-Thymozyten durchgeführt. In diesen Experimenten konnte die Wechselwirkung zwischen CD155 und CD96 durch die Antikörperklone 3F1 und 4G3 vollständig unterbunden werden (Quan Qiu, persönliche Kommunikation, bzw. Seth, Maier et al., Manuskript eingereicht). Mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen von Mausblut nach intravenöser Gabe von 400 µg der anti-CD155-Antikörper konnte gezeigt werden, dass die Klone 4G3 und 3F1 nicht zu einer Depletion der CD155-positiven Zellen führen (Daten nicht gezeigt). Daher stellen diese Antikörperklone vielversprechende Kandidaten für funktionelle Studien in der Maus dar.

3.5. Untersuchung der Migration von CD155-defizienten Lymphozyten

3.5.1. Analyse der Migration unter nicht-entzündlichen Bedingungen

Um die Funktionalität des Immunsystems zu gewährleisten, zirkulieren die meisten Immunzellen ständig über den Blutstrom und die Lymphe durch sekundäre lymphatische Organe. Dadurch wird unter anderem ein effizientes Aufeinandertreffen von T-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen sowie verschiedenen regulatorisch wirkenden Zellen ermöglicht. Aufgrund des charakteristischen Expressionsmusters von CD155 und CD226 auf Lymphozyten und Endothelien sowie der Expression von CD96 auf Lymphozyten schien es möglich, dass CD155 an der Migration dieser Zellen beteiligt ist. Eine sichtbare Beeinträchtigung dieses Prozesses könnte sich darin äußern, dass das Verteilungsmuster der Lymphozyten im Blut oder innerhalb der sekundären lymphatischen Organe verändert ist. Eine derartige Störung lässt sich relativ einfach mit durchflusszytometrischen Untersuchungen aufdecken. In Studien, die zusammen mit Sebastian Seth durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass die relative Häufigkeit von zirkulierenden sowie residenten Leukozyten in den sekundären lymphatischen Organen CD155-defizienter Mäuse normal ist. Dabei wurden T-Zell-Populationen (naive CD4⁺ und CD8⁺ Zellen), DC, NK-Zellen, die meisten B-Zell-Typen (foB, MZB, KZB und Plasmazellen) sowie Monozyten und Neutrophile untersucht.

Trotz der im Gleichgewicht unbeeinträchtigten Verteilung der Immunzellen in den lymphatischen Organen ist es denkbar, dass die Abwesenheit von CD155 zu einer Beeinträchtigung der Migrationseffizienz führt. Diese könnte langfristig durch kompensatorische Mechanismen überwunden werden. Eine gute Methode, das Migrationsverhalten von Zellen zu untersuchen, ist der adoptive Transfer. Bei dieser Untersuchungsmethode werden die gewünschten Zellen einer Maus isoliert, gegebenenfalls angereichert und nach Markierung (z.B. mit einem Fluoreszenzfarbstoff) intravenös in eine syngene Empfängermaus injiziert. Zum gewünschten Analysezeitpunkt werden die Tiere dann getötet und die Menge an markierten Zellen in den sekundären lymphatischen Organen sowie im Blut bestimmt. Besonders geeignet sind kompetitive Transfer-Experimente, bei denen verschiedene Zelltypen unterschiedlich markiert werden und im gleichen Mengenverhältnis gleichzeitig in die Empfängermaus injiziert werden. Durch die Analyse des Verhältnisses der beiden transferierten Populationen ergeben sich klare und gut kontrollierte Aussagen. Solche kompetitiven Transfer-Experimente wurden auch in dieser Arbeit verwendet. Hierzu wurden Lymphozyten aus Milz und peripheren Lymphknoten von Wildtyp- und CD155^{-/-} Mäusen

3 Ergebnisse

isoliert, unterschiedlich markiert und im Verhältnis von 1:1 sowohl in CD155-defiziente als auch in Wildtyp-Empfängertiere transferiert. Durch diesen Versuchsaufbau konnte sowohl die Bedeutung des Moleküls auf der Endothel- als auch auf der Lymphozytenseite betrachtet werden.

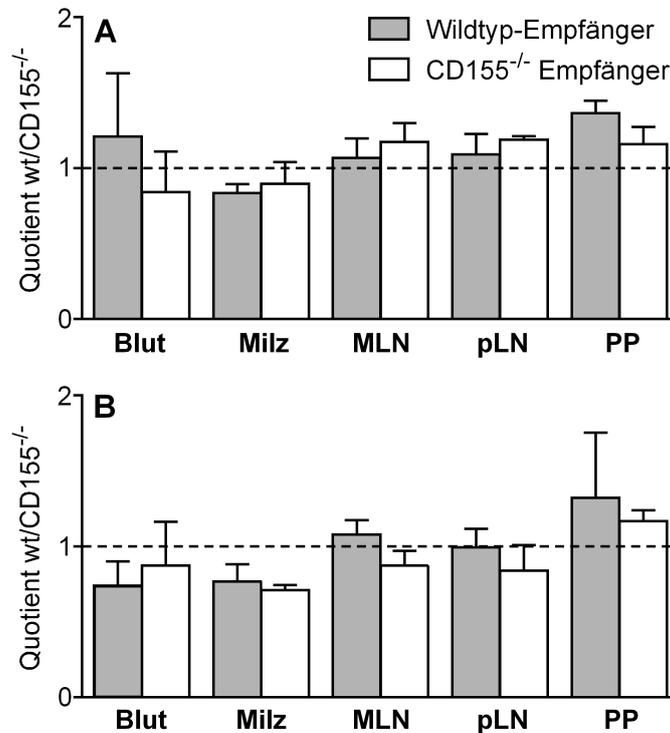


Abb. 13: Adoptiver Transfer von Wildtyp- und CD155^{-/-} Zellen in wt und CD155^{-/-} Tiere.

Lymphozyten von Wildtyp- und CD155-defizienten Mäusen wurden mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen (CFSE / TAMRA) markiert und in einem Mischungsverhältnis von 1:1 intravenös in Wildtyp- und CD155^{-/-} Empfängertiere injiziert. Nach 12 Stunden wurden Blut, Milz, mesenteriale Lymphknoten (MLN), periphere Lymphknoten (pLN) sowie Peyersche Platten (PP) durchflusszytometrisch auf eingewanderte Fluoreszenz-markierte Zellen untersucht. Gezeigt ist das Verhältnis von wiedergefundenen Wildtyp- zu CD155^{-/-} Spenderzellen. Graue Balken zeigen den Quotienten für Wildtyp-Empfänger, weiße Balken das Verhältnis in CD155-defizienten Tieren. Das gleiche Ausgangs-Verhältnis von Wildtyp-Spenderzellen zu CD155-defizienten Zellen wurde auf CD4⁺ Zellen (A) oder CD8⁺ Zellen (B) eingestellt. Bei der Wiederholung des Versuches wurde auf eine Umkehrung der Fluoreszenz-Markierungen geachtet, um Färbungs-bedingte Artefakte auszuschließen. Pro Einzelexperiment wurden je Genotyp 3 bis 4 Empfängertiere verwendet.

Abb. 13A zeigt ein repräsentatives Ergebnis eines adoptiven Transfers, bei dem speziell die Migration von CD4⁺ T-Zellen betrachtet wurde. Generell lagen die Verhältnisse der beiden Zellsorten zueinander in den untersuchten Organen sehr nahe am Ausgangsverhältnis. Dabei hatte der Genotyp der Empfängertiere offensichtlich keinen Einfluss. Die sich abzeichnende Tendenz eines effektiveren *Homings* der CD4⁺CD155⁺ Zellen in PPs von Wildtyp-Tieren konnte im Wiederholungsexperiment mit umgekehrter Fluoreszenz-Markierung nicht beobachtet werden. Bei der Durchführung des Experiments mit Blick auf CD8⁺ T-Zellen

3 Ergebnisse

(Abb. 13B) zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Migration der beiden Zellarten. Die Wanderung von B-Zellen wurde aufgrund der geringen Expression von CD155 sowie der gänzlich fehlenden Expression der Liganden CD96 und CD226 nicht weiter untersucht.

Eine andere Möglichkeit zur Untersuchung der Migration von Lymphozyten ist die orale Behandlung der Tiere mit FTY720. FTY720 ist ein strukturelles Analogon zu Sphingosin-1-phosphat. In Mäuse appliziert führt es zu einer Lymphopenie, die darauf beruht, dass die Zellen an der Auswanderung aus den sekundären lymphatischen Organen gehindert werden. Darüber hinaus wird aber auch die Immigration der Lymphozyten über HEV erleichtert [91].

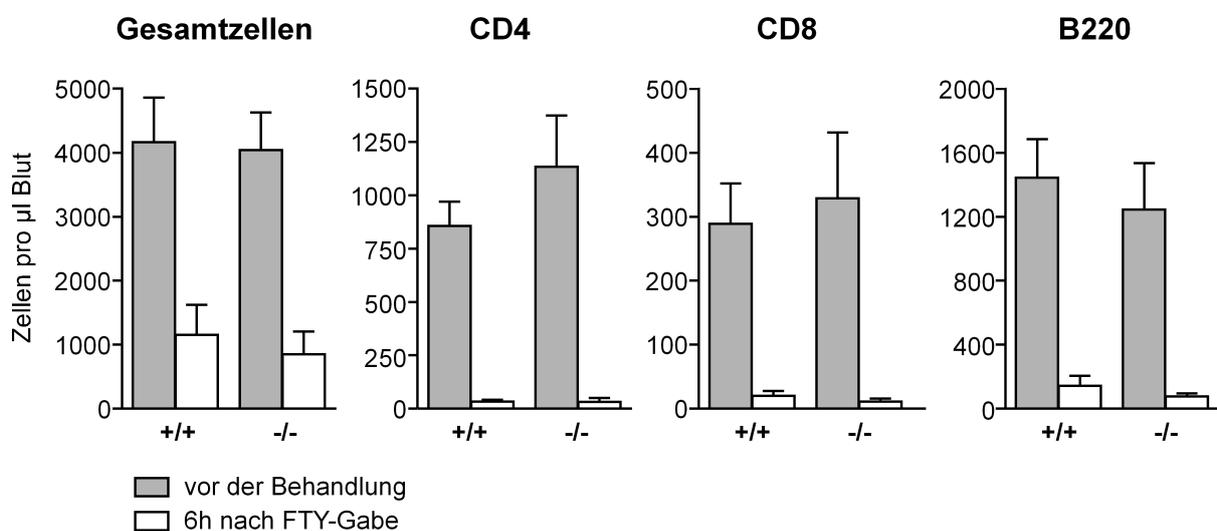


Abb. 14: FTY720-induzierte Lymphopenie im Blut von Wildtyp- und CD155^{-/-} Mäusen.

Wildtyp- und CD155^{-/-} Mäusen wurden 40 µg FTY720 oral appliziert. Vor und 6 Stunden nach der Behandlung wurde das Blut der Tiere auf seine zelluläre Zusammensetzung untersucht. CD4: CD4⁺ T-Zellen, CD8: CD8⁺ T-Zellen, B220: B220⁺ B-Zellen.

Um die FTY720-induzierte Lymphopenie zu verfolgen, wurde das Blut der Mäuse vor und sechs Stunden nach der Behandlung durchflusszytometrisch auf seine zelluläre Zusammensetzung untersucht. Die grauen Balken in Abb. 14 zeigen die Zellzahlen pro µl Blut vor der FTY720-Applikation. Sechs Stunden nach der FTY720-Behandlung zeigte sich ein massiver Rückgang in der Gesamtzahl der Lymphozyten. Im Blut fanden sich nur noch etwa 25 % der Ausgangszellen. Wie erwartet waren T-Zellen am stärksten vom FTY720-Effekt betroffen. Bei CD4⁺ und CD8⁺ Zellen war ein etwa zehnfacher Rückgang der Zellzahl zu verzeichnen. Auch die Zahl der B-Zellen ging deutlich zurück, allerdings etwas weniger dramatisch als bei den T-Lymphozyten. Das Experiment zeigte jedoch, dass die An- oder Abwesenheit von CD155 keinen Einfluss auf den FTY720-induzierten Effekt hat. Zusammenfassend ließ keines

der Migrations-Experimente unter nicht-inflammatorischen Bedingungen auf eine Beteiligung des murinen CD155 an der TEM von Lymphozyten entweder beim Eintritt in (Abb. 13) oder beim Austritt aus (Abb. 14) sekundären lymphatischen Organen schließen.

3.5.2. Untersuchung der Migration unter inflammatorischen Bedingungen

In Transwell-Experimenten konnten Reymond et al. 2004 zeigen, dass CD155 am Diapedese-Schritt der transendothelialen Migration von humanen Monozyten beteiligt ist. Im Folgenden sollte geprüft werden, inwieweit diese CD155-Funktion zwischen Mensch und Maus konserviert ist. Von der Durchführung eines Transwell-Experiments mit Maus-Monozyten wurde abgesehen, da die Gewinnung großer Zahlen muriner Monozyten (und Endothelzellen), die für derartige Analysen erforderlich wären, impraktikabel ist. Stattdessen wurde als *in vivo*-Modell die Zymosan-induzierte peritoneale Entzündung angewendet. Zymosan ist ein Präparat aus der Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae*. Über einen momentan kontrovers diskutierten Mechanismus führt seine intraperitoneale Injektion dazu, dass zunächst Neutrophile und nach einigen Stunden überwiegend Monozyten bzw. Makrophagen ins Peritoneum rekrutiert werden [92].

Da zum Zeitpunkt dieser Experimente weder anti-CD155-Antikörper noch CD155-defiziente Tiere zur Verfügung standen, wurde das lösliche CD155-IgG-Fusionsprotein verwendet, um Informationen über eine mögliche Beteiligung des murinen Proteins bei der Rekrutierung von Monozyten bzw. Makrophagen und Neutrophilen ins Peritoneum zu gewinnen. Hierfür wurde das Protein etwa eine Stunde vor der Zymosan-Injektion intravenös verabreicht. Als Kontrolle diente ein IgG-Fusionsprotein, welches die Ektodomäne von humanem Nectin-1 enthielt, sowie Mäuse, denen nur PBS intravenös verabreicht wurde. Nach 16 Stunden wurden die Peritonealzellen isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Um den Erfolg der Zellrekrutierung zu beurteilen, wurden auch Mäuse analysiert, denen kein Zymosan verabreicht worden war. Abb. 15 zeigt, dass Zymosan 16 Stunden nach seiner Applikation in etwa zu einer Verdopplung der Gesamtzellzahl im Peritoneum führt. Die behandelten Tiere zeigten zu diesem Zeitpunkt eine zusätzliche Einwanderung von etwa 600.000 Makrophagen sowie etwa 1,8 Millionen Neutrophilen. Dabei hatte die Verabreichung des Kontrollproteins (hNec1-IgG) keinen signifikanten Einfluss auf die Zellzahlen. Interessanterweise zeigten aber Tiere, die mit CD155-Fusionsprotein vorbehandelt wurden, eine deutlich geringere Gesamtzellzahl an eingewanderten Zellen (etwa 50 % Reduktion). Speziell die Zahl der isolierten Monozyten / Makrophagen war, verglichen mit den PBS-behandelten Mäusen,

3 Ergebnisse

signifikant um etwa 90 % reduziert. Die Makrophagenzahl lag dabei in einem Bereich, der dem von Tieren, die nicht mit Zymosan behandelt wurden, entsprach. Im Gegensatz dazu hatte keines der i.v. injizierten Proteine Einfluss auf die Zahl der rekrutierten Neutrophilen.

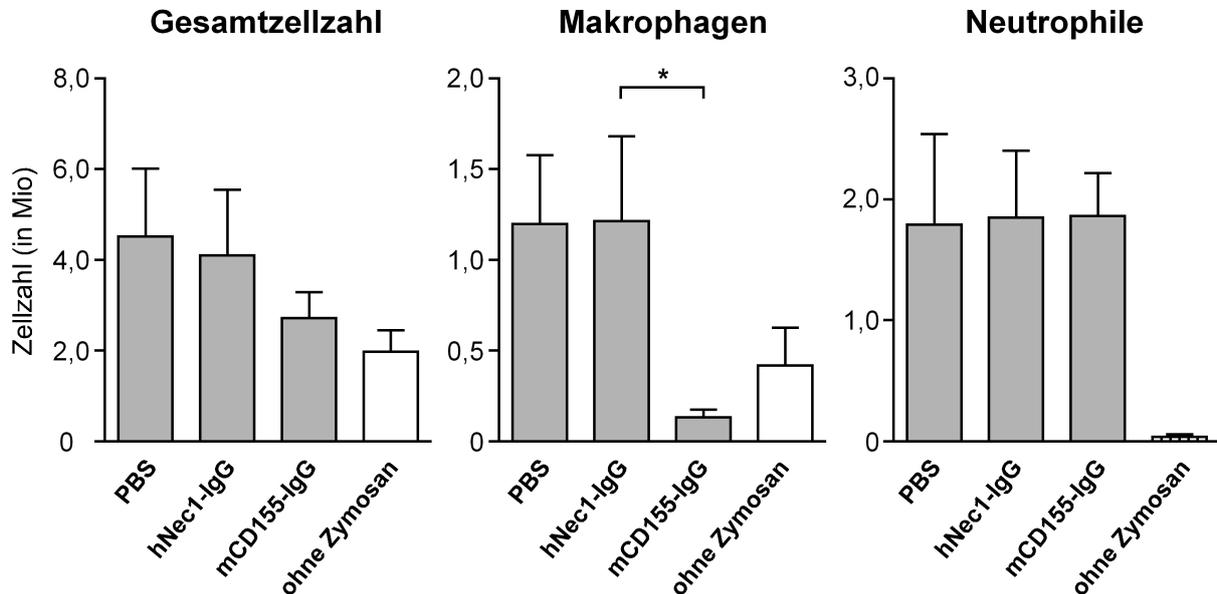


Abb. 15: Modell der Zymosan-induzierten Peritonitis in CD155-IgG-behandelten Mäusen.

Wildtyp-Mäusen wurden intravenös lösliche Fusionsproteine oder reines PBS injiziert. Nach einer Stunde wurde eine intraperitoneale Entzündung durch i.p. Applikation von 500 µg Zymosan induziert. Als Kontrolle der entstehenden Peritonitis dienten Mäuse, denen kein Zymosan verabreicht wurde (weiße Balken). Nach 16 Stunden wurden die Mäuse getötet und Peritonealzellen isoliert. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden Makrophagen und Neutrophile identifiziert. Die Vorbehandlung mit mCD155-IgG-Fusionsprotein führte dazu, dass deutlich weniger Makrophagen aus dem Peritoneum isoliert werden konnten, wohingegen das humane Nectin-1-Protein keinen Einfluss zeigte. Im weiteren Verlauf der Arbeit stellte sich jedoch heraus, dass dieser Effekt nicht auf eine Blockierung der Migration ins Peritoneum zurückzuführen ist. *: $p < 0,05$.

Dieses Experiment schien zunächst darauf hin zu deuten, dass auch murines CD155 von Bedeutung für die Migration von Monozyten ist. Zymosan-Experimente mit den kurze Zeit später zur Verfügung stehenden CD155-defizienten Mäusen zeigten jedoch, dass es sich bei dem hier beobachteten Phänomen nicht um einen migrationsabhängigen Mechanismus handelte. Weder heterozygot noch homozygot CD155-defiziente Mäuse zeigten vom Wildtyp abweichende Zellzahlen im Peritoneum nach Behandlung mit Zymosan (Abb. 16). Da jedoch die Gabe des CD155-IgG-Fusionsproteins in CD155^{-/-} Mäuse ebenfalls einen Effekt wie in Abb. 15 hatte, musste der Einfluss des Fusionsproteins andere Ursachen haben.

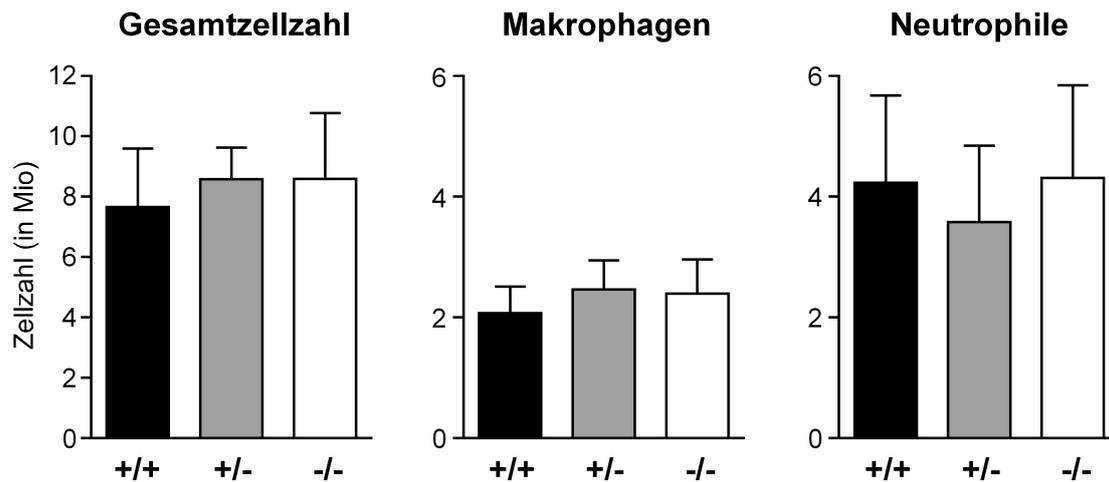


Abb. 16: Zymosan-induzierte peritoneale Entzündung in Wildtyp- und CD155^{-/-} Mäusen.

Wildtyp-Mäuse, heterozygote Tiere sowie Mäuse, die homozygot negativ für CD155 waren wurden, wie in Abb. 15 beschrieben, intraperitoneal mit Zymosan behandelt. Nach 16 Stunden erfolgte die Isolation und Analyse der Peritonealzellen. Weder heterozygote noch homozygot CD155-defiziente Tiere zeigten eine signifikante Beeinträchtigung der Zell-Infiltration des Peritoneums.

Ein manchmal ablaufender, experimentell meist unerwünschter Vorgang, der bei der intravenösen Behandlung von Tieren mit Antikörper-ähnlichen Proteinen in Betracht gezogen werden muss, ist die Fc-Rezeptor-vermittelte Komplement- oder NK-Zell-Aktivierung und daraus folgende Depletion der Zellen. Um zu ergründen, welche Auswirkungen die intravenöse Verabreichung des CD155-Fusionsproteins hatte, wurde das murine Blut einige Stunden nach der Injektion untersucht. Mit Hilfe eines ELISA konnte gezeigt werden, dass das CD155-IgG-Fusionsprotein bereits nach drei Stunden nicht mehr im Serum detektierbar war, wohingegen das Kontrollprotein eine Halbwertszeit von etwa sieben Tagen aufwies (Daten nicht abgebildet). Die Untersuchung der zellulären Zusammensetzung des Blutes nach der i.v. Behandlung ergab, dass Mäuse, denen das CD155-IgG-Protein injiziert wurde, dramatisch reduzierte Zahlen an T- und B-Zellen sowie Monozyten im Blut aufwiesen (Abb. 17). Die Reduktion der B-Zellzahl war am stärksten (etwa 90 % Reduktion), gefolgt von der der T-Zellen (etwa 75 %). Aber auch die Zahl der Monozyten war um 60 bis 80 % vermindert. Im Gegensatz dazu hatte die Applikation des Nectin-1-IgG-Kontrollproteins keinen signifikanten Einfluss auf die zelluläre Zusammensetzung des Blutes.

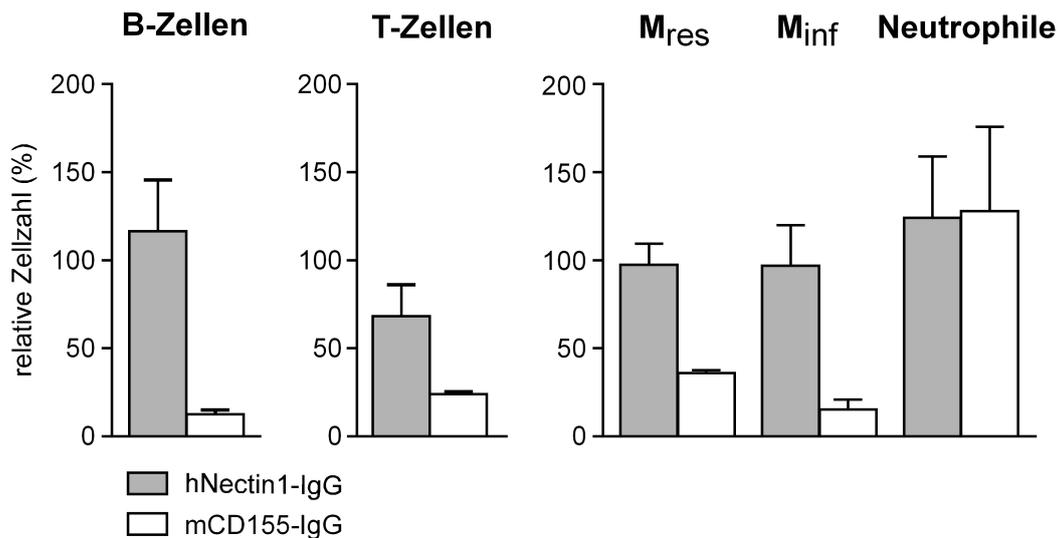


Abb. 17: Depletion von Leukozyten nach intravenöser CD155-IgG-Applikation.

Wildtyp-Mäusen wurden 400 µg mCD155- oder hNectin-1-IgG-Fusionsprotein i.v. appliziert. Die zelluläre Zusammensetzung des Blutes wurde vor und drei Stunden nach erfolgter Behandlung durchflusszytometrisch bestimmt. Die Ausgangszellzahlen vor der Behandlung wurden auf 100 % normiert – entsprechend sind die nach der Injektion ermittelten Zellzahlen in Prozent der Ausgangszahl angegeben.

Dieses überraschende Ergebnis zeigte, dass die beobachteten Phänomene bei der Zymosan-induzierten Peritonitis nicht auf einer direkten Störung der Einwanderung ins Peritoneum beruhten. Stattdessen führt die Applikation des CD155-IgG-Fusionsproteins offensichtlich zu einer Art CD155-vermittelten Depletion der Zellen aus dem Blut. Über denkbare Mechanismen dieses Effekts wird in der Diskussion näher eingegangen werden.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden auch die neu generierten anti-CD155-Antikörper verwendet, um inhibitorische Studien durchzuführen. Eine Depletion, wie sie bei der Verwendung des CD155-IgG-Fusionsproteins zu beobachten war, trat bei den getesteten CD155-Antikörperklonen nicht auf (mit Ausnahme eines leichten Effekts des 5A5-Klons, nicht gezeigt). Im Modell der Zymosan-induzierten Peritonitis konnte jedoch kein Einfluss der Antikörper auf die Migration der Monozyten oder Neutrophilen festgestellt werden (Daten nicht abgebildet).

3.5.3. Anwendung weiterer Entzündungsmodelle

Nachdem sich zeigte, dass murines CD155 nicht an der Zymosan-vermittelten Rekrutierung von Monozyten ins Peritoneum beteiligt ist, wurden weitere Maus-Modelle zur Untersuchung der Migration von Monozyten und Makrophagen etabliert. Unter anderem wurde ein "air-pouch-Modell" verwendet, welches ermöglichte, Monozyten mit Hilfe von Chemokinen wie CCL2 (MCP-1) oder CCL7 (MCP-3) in einen künstlich generierten subkutan gelegenen Luftraum zu rekrutieren. Auch Infiltrationsmodelle, die Monozyten über die Injektion von Chemokinen in eine Hautregion rekrutieren, wurden getestet. In keinem dieser Modelle konnte jedoch unter Verwendung der CD155-defizienten Mäuse oder unter Benutzung der anti-CD155-Antikörper eine Beteiligung des Moleküls an den jeweils gemessenen Reaktionen gezeigt werden. Zusammenfassend lassen die erhobenen Daten darauf schließen, dass murines CD155 im Gegensatz zum humanen Protein keine Funktion bei der transendothelialen Migration von Monozyten hat.

3.5.4. Untersuchung einer DTH-Reaktion in CD155^{-/-} Mäusen

Aufgrund von Veröffentlichungen, die auf eine mögliche Beeinflussung der Th1-Polarisation von Antigen-stimulierten T-Zellen durch CD226 deuten [59, 93], fand im Rahmen dieser Arbeit ein Modell für eine DTH-Reaktion Anwendung. Diese *Delayed Type Hypersensitivity Reaction* zeigt ein Th1-Zytokinprofil und führt überwiegend zur Rekrutierung von Makrophagen und T-Zellen. Die durch die Reaktion auftretende Gewebeschwellung am Maus-Ohr kann mit einer Mikrometerschraube gemessen werden. Sie gilt als Maß für die Stärke der Entzündungsreaktion.

In dem hier verwendeten Modell wurden Wildtyp- und CD155^{-/-} Mäuse i.p. mit Ovalbumin und inkomplettem Freudschen Adjuvans immunisiert. Nach 14 Tagen folgte eine intradermale Injektion von Ovalbumin oder PBS ins Ohr. Weitere 48 Stunden später wurde die Schwellung der Ohren mit einer Mikrometerschraube bestimmt. Die in diesem Experiment verwendeten CD155^{-/-} Tiere zeigten gleiche Schwellungsreaktionen wie Wildtyp-Mäuse.

3.6. Untersuchung der humoralen Immunantwort in CD155^{-/-} Mäusen

3.6.1. Bestimmung der Gesamt-Immunglobulin-Spiegel in CD155^{-/-} Mäusen

CD155 wird sowohl in humanen als auch murinen Keimzentren von FDC exprimiert ([41] und eigene Beobachtung). Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit auf verschiedenen B-Zell-Populationen der Maus, insbesondere auf den Antikörper-produzierenden Plasmazellen CD155 detektiert werden. Aus diesem Grund wurden zunächst die von B-Zellen produzierten Gesamtmengen verschiedener Immunglobuline in Wildtyp- und CD155-defizienten Mäusen verglichen. Der durchgeführte direkte ELISA zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mengen an Serum-IgM, -IgG1, -IgG2a oder -IgG2b. Zur Bestimmung des Gesamt-IgA-Gehalts wurden Darmabschnitte gespült und die erhaltene Waschflüssigkeit im ELISA eingesetzt. Dabei zeigten die CD155^{-/-} Tiere ebenfalls einen normalen Immunglobulin-Spiegel (Abb. 18).

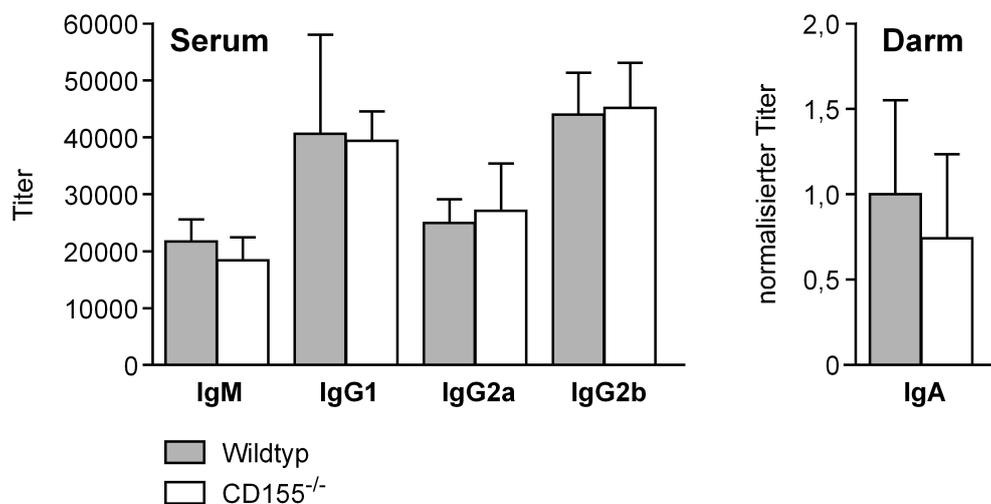


Abb. 18: Bestimmung des Gesamt-Ig-Gehalts in Wildtyp- und CD155^{-/-} Tieren.

Die Seren unbehandelter Mäuse wurden mittels ELISA auf den Gesamt-Immunglobulingehalt an IgM, IgG1, IgG2a sowie IgG2b untersucht. Darüber hinaus wurde die Gesamtmenge an luminal sezerniertem IgA in Wildtyp- und CD155^{-/-} Tieren verglichen. Pro Genotyp wurden 5 bis 10 Tiere analysiert.

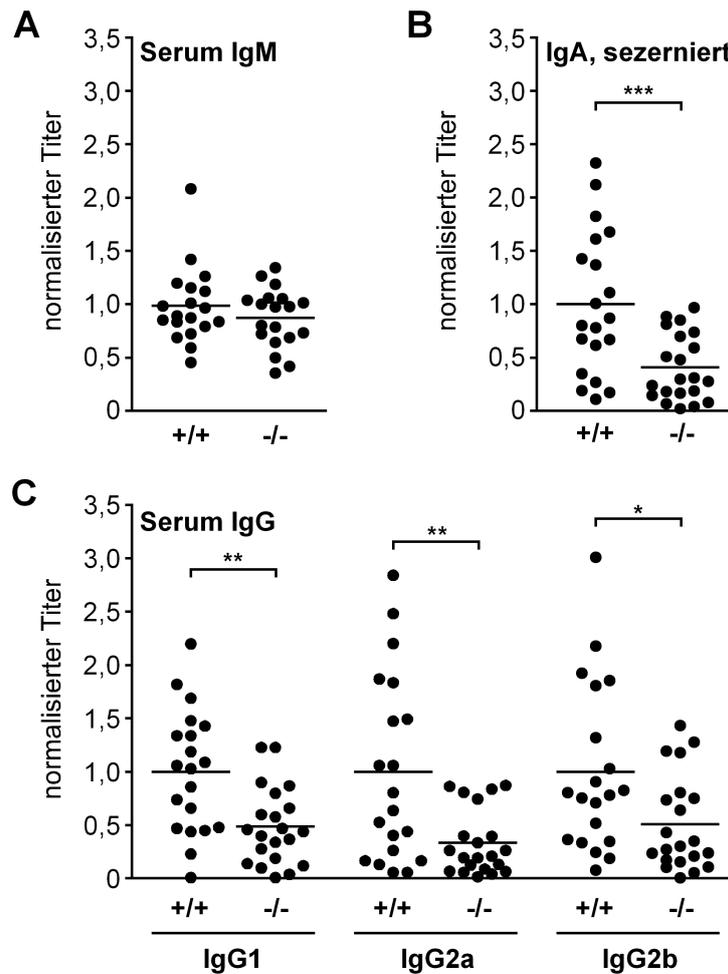


Abb. 20: Oral immunisierte CD155^{-/-} Mäuse zeigen eine verminderte Immunantwort.

CD155^{-/-} und Wildtyp-Mäuse wurden oral mit TNP-BSA und Cholera toxin immunisiert. Der Verlauf der Immunantwort wurde über 35 Tage verfolgt. Gezeigt sind die normalisierten Immunglobulin-Spiegel von Cholera toxin-spezifischem Serum-IgM an Tag 7 (A), luminalem IgA an Tag 35 (B) sowie Serum-IgG1, -IgG2a und -IgG2b an Tag 28 (C). Die abgebildeten Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Um mehrere verschiedene Experimente untereinander zu vergleichen, wurden die Titer auf ein Wildtyp-Mittel von 1 normiert. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Im Gegensatz zur reduzierten IgG1-Antwort zeigten CD155^{-/-} Mäuse normale IgM-Titer (Abb. 20A). Dieser Befund lässt vermuten, dass die in den Primärfollikeln ablaufende erste Phase der B-Zell-Antwort nicht beeinflusst ist. Im Gegensatz dazu zeigte sich beim luminal sezernierten IgA die deutlichste Beeinträchtigung der humoralen Antwort in CD155-defizienten Tieren (Abb. 20B). An Tag 28 nach der Immunisierung wurden darüber hinaus signifikant geringere Mengen aller untersuchten spezifischen Antikörper des IgG-Isotyps im Serum von CD155^{-/-} Tieren detektiert. Sowohl die Titer der spezifischen IgG1-, IgG2a- als auch IgG2b-Antikörper waren signifikant um 50 bis 60 % reduziert (Abb. 20C). Da die IgM-Spiegel nicht reduziert waren, lag es nahe, dass eine Störung in der späteren Phase der B-Zell-Antwort, welche unter anderem Affinitätsreifung und Klassenwechsel beinhaltet,

3 Ergebnisse

vorlag. Um diesen Sachverhalt etwas eingehender zu beleuchten, wurde im Folgenden überprüft, ob die Anzahl der Antigen-spezifischen Plasmazellen in den CD155-defizienten Mäusen normal ist.

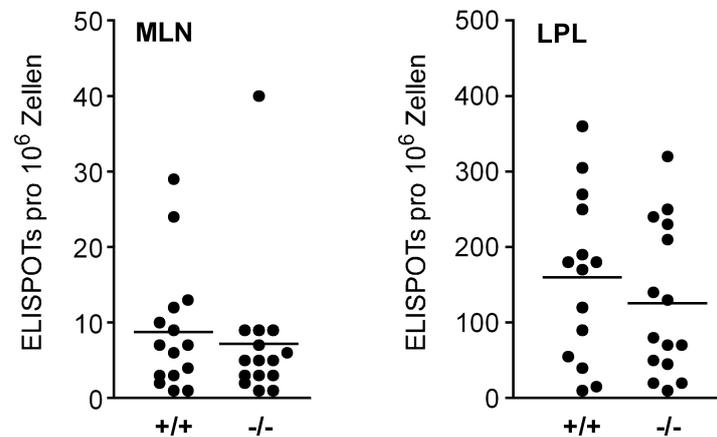


Abb. 21: Die Anzahl der CT-spezifischen Plasmazellen ist in CD155^{-/-} Mäusen nicht reduziert.

Zur Bestimmung der Anzahl der spezifischen Plasmazellen wurden ELISPOT-Experimente durchgeführt. Dabei wurden aus Gesamtpräparationen der mesenterialen Lymphknoten (A) und der Lamina propria (B) Zellen detektiert, die 14 Tage nach oraler Immunisierung Choleratoxin-spezifische Antikörper sezernieren.

Die durchflusszytometrischen Analysen der B-Zell-Subpopulationen zeigten, dass die Gesamt-B-Zellzahlen in CD155^{-/-} Tieren nicht signifikant verändert waren. Dabei lässt sich aber aufgrund der geringen Anzahl nicht auf die Menge der Choleratoxin-spezifischen Plasmazellen schließen. Um deren Häufigkeit zu bestimmen, wurden ELISPOT-Versuche durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden Tiere mit TNP-BSA und Choleratoxin immunisiert und nach 14 Tagen zur Präparation von Zellen der Lamina propria und der MLN geopfert. Mit Hilfe der ELISPOT-Methode konnten dann die Choleratoxin-spezifischen Plasmazellen identifiziert und deren Anzahl bestimmt werden. Dabei zeigte sich, dass sich die CD155-Defizienz nicht auf die Zahl der spezifischen B-Zellen in diesen beiden für die Antikörper-Sekretion wichtigsten Kompartimenten auswirkt. Auch die bei den Präparationen erhaltenen Gesamt-Zellausbeuten waren zwischen Wildtyp- und CD155^{-/-} Mäusen vergleichbar.

3.6.3. Intraperitoneale und subkutane Immunisierungen zeigen keine Unterschiede zwischen CD155^{-/-} und Wildtyp-Mäusen

Neben der Beschaffenheit des Antigens hat auch der Ort, an dem es in den Organismus gelangt, eine Auswirkung auf die generierte Immunantwort. Um zu untersuchen, inwieweit die Route der Immunisierung eine Rolle für den Phänotyp der CD155^{-/-} Mäuse spielt, wurden Tiere mit den Antigenen NP-CGG oder TNP-BSA, welches bereits bei der oralen Immunisierung verwendet wurde, intraperitoneal behandelt. Als Adjuvans diente dabei Aluminiumhydroxidgel. Das Experiment zeigte, dass, wenn das Antigen auf diese Weise in den Organismus gelangt, auch in CD155-defizienten Tieren eine normale humorale Antwort erfolgt (Abb. 22). Abgebildet sind die Ergebnisse für ein repräsentatives Experiment.

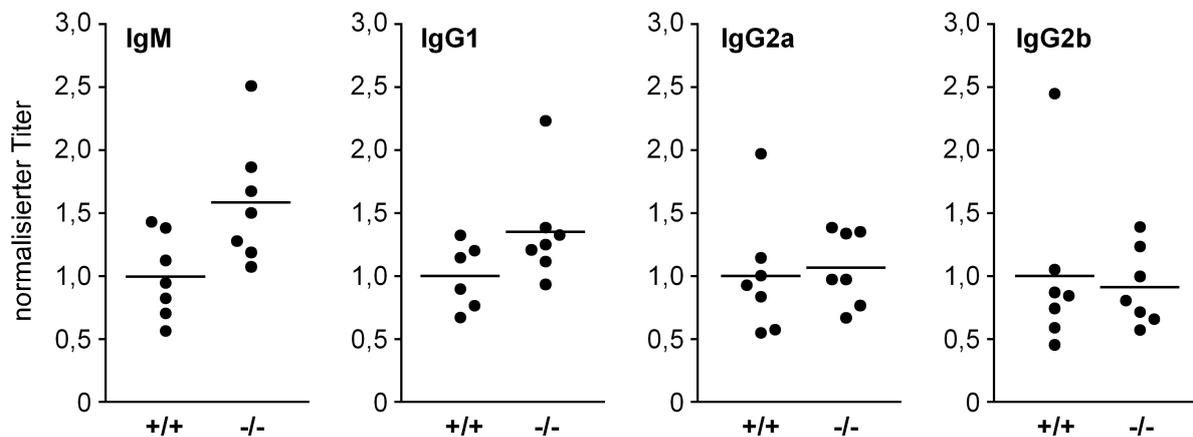


Abb. 22: Intraperitoneale Immunisierung von Wildtyp- und CD155^{-/-} Mäusen.

Mäuse wurden intraperitoneal mit NP-CGG (oder TNP-BSA) in 2 % Aluminiumhydroxydgel i.p. immunisiert. Der Verlauf der humoralen Antwort wurde über 5 Wochen verfolgt. Die Abbildung zeigt die normalisierten Serum-Titer an Tag 28 eines repräsentativen Experimentes. Zwischen Wildtyp- und CD155^{-/-} Mäusen zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Auch nach subkutaner Immunisierung mit TNP-BSA und Cholera toxin konnte eine normale Antikörper-Antwort in CD155^{-/-} Tieren beobachtet werden. Diese Versuche belegen nicht nur eine unterschiedlich ausgeprägte Bedeutung des CD155 in einer adaptiven Immunantwort im speziellen, sondern zeigen ganz allgemein, dass derartigen Immunreaktionen unterschiedliche Mechanismen – je nach lokalen Gegebenheiten – zugrunde liegen. Im weiteren Verlauf der oben beschriebenen Experimente wurde auch untersucht, ob das immunologische Gedächtnis in den CD155-defizienten Tieren beeinträchtigt ist. Zu diesem Zweck wurden i.p. oder s.c. immunisierte Tiere etwa 2-3 Monate nach der ersten Immunisierung erneut mit dem Antigen konfrontiert. Alle Tiere zeigten die zu erwartenden schnellen Anstiege in den Antikörpertitern – unabhängig von der An- oder Abwesenheit von CD155 im Organismus (nicht abgebildet).

3.6.4. CD155^{-/-} Mäuse entwickeln eine normale IgM-Antwort auf TI-Antigene

Eine Antikörper-Antwort kann von Plasmazellen verschiedenen Ursprungs generiert werden. Der "klassische" Weg ist die Differenzierung von Plasmazellen aus folliculären B-Zellen, nachdem diese auf ein Antigen getroffen sind und T-Zell-Hilfe erhalten haben. Nach der Bildung eines Keimzentrums entstehen so Plasmazellen, die Antikörper produzieren, welche eine Affinitätsreifung und meist einen Isotyp-Klassenwechsel durchlaufen haben.

Im Gegensatz dazu können unter bestimmten Umständen reife, folliculäre B-Zellen sowie manche MZB ohne Keimzentrumsreaktion für eine sehr schnelle IgM-Antikörper-Antwort sorgen [24, 28, 29]. Darüber hinaus können B1-Zellen ohne Beteiligung von T-Zellen auf so genannte „T-Zell-unabhängige Antigene“ mit der Produktion von natürlichen IgM- und IgA-Antikörpern antworten [26, 27]. Um zu überprüfen, ob die B1-Zell-vermittelte Immunantwort in CD155-defizienten Tieren beeinflusst ist, wurden Tiere mit Pneumovax immunisiert. Nach sieben Tagen wurde die spezifische IgM-Antwort in den Seren der Tiere mit Hilfe der ELISA-Methode analysiert. Wie in Abb. 23 zu sehen ist, verläuft die Immunantwort bei dieser Art der Immunisierung in den CD155^{-/-} Tieren jedoch normal.

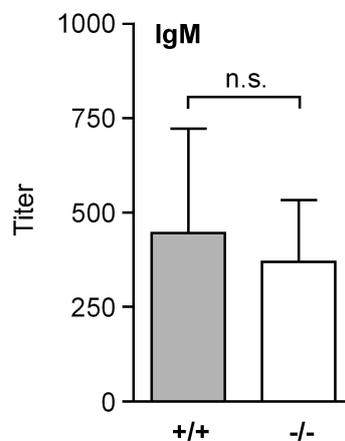


Abb. 23: Immunisierung mit einem T-Zell-unabhängigen Antigen.

Um die Entwicklung einer Immunantwort auf T-Zell-unabhängige Antigene zu untersuchen, wurden pro Gruppe vier Tiere mit Pneumovax i.p. immunisiert. Nach 7 Tagen wurden spezifische IgM-Antikörper im Serum der Tiere nachgewiesen. n.s.: nicht signifikant.

3.6.5. Orale Immunisierung mit lebenden, attenuierten Salmonellen

Während die oben beschriebenen Immunisierungsmodelle auf der Verabreichung löslicher Antigene beruhen, sollte abschließend untersucht werden, inwieweit CD155-defiziente Mäuse eine normale humorale Antwort auf ein oral aufgenommenes, partikuläres Antigen entwickeln. Um einer natürlichen Situation möglichst nahe zu kommen, wurden lebende Bakterien als Antigen verwendet. Hierfür wurde ein *aroA*-defizienter Salmonellen-Stamm verwendet (siehe Material und Methoden). Aufgrund der Deletion im *aroA*-Gen sind diese Bakterien in ihrem Wachstum stark eingeschränkt, weswegen die natürliche Darmflora der Tiere durch ein Antibiotikum reduziert werden muss. 28 Tage nach der Infektion wurden die Mäuse geopfert und auf Salmonella-spezifische Antikörper untersucht. Zu diesem Zweck wurde Salmonella-LPS für das Beschichten der Platten beim ELISA verwendet. Die humorale Antwort fiel bei allen Tieren relativ schwach aus. Erst ab Tag 14 ließen sich erste sehr geringe Mengen Salmonella-spezifischer Antikörper nachweisen (Daten nicht abgebildet). Nach 28 Tagen waren größere Mengen zu detektieren, allerdings blieben die IgG1-, IgG2a- und IgG2b-Konzentrationen der Seren so gering, dass nur der Nachweis von Salmonella-spezifischem Gesamt-IgG verlässliche Signale lieferte. Auch ELISA mit Salmonella-Extrakt als Antigen wurden durchgeführt, zeigten aber keine nennenswerten Abweichungen zum Salmonella-LPS.

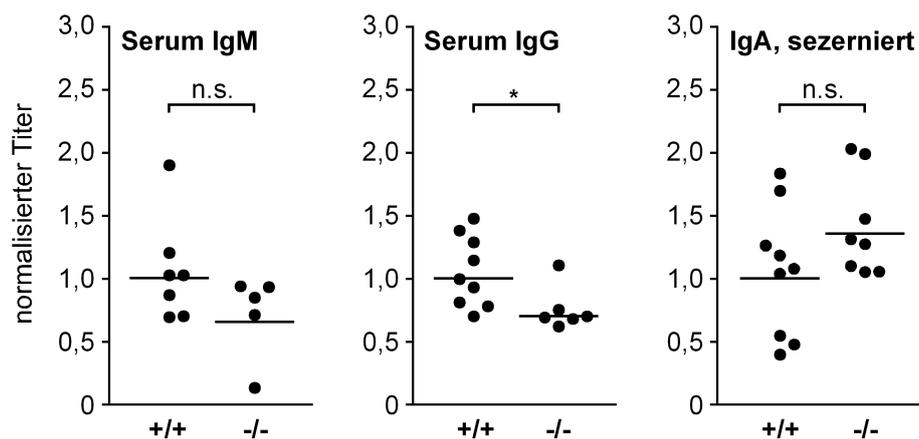


Abb. 24: Antikörper-Antwort nach oraler Immunisierung mit lebenden Salmonellen.

Wildtyp- und CD155^{-/-} Mäuse auf Balb/c-Hintergrund wurden mit lebenden Salmonellen gavagiert. Gezeigt sind die Salmonella-spezifischen normierten Antikörper-Spiegel an Tag 28. *: p < 0,05; n.s.: nicht signifikant.

3 Ergebnisse

Während Serum-IgM und sezerniertes IgA in Wildtyp- und CD155^{-/-} Mäusen in gleichen Mengen detektierbar waren, zeigten CD155-defiziente Tiere eine leicht verminderte IgG-Antwort (siehe Abb. 24). Aus Verfügbarkeits-Gründen wurden für das hier gezeigte Experiment Tiere mit genetischem Balb/c-Hintergrund verwendet. Der Versuch wurde jedoch auch mit 129/Sv-Mäusen durchgeführt. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Serum-Titern spezifischer IgG- und IgM-Antikörper. Für sIgA ist eine Beurteilung aufgrund geringer Tierzahl noch nicht möglich. Tendenziell zeigt sich hier jedoch eine schwächere Antwort bei CD155-defizienten Tieren.

4. Diskussion

Seit seiner ursprünglichen Identifizierung als Poliovirus-Rezeptor wurden verschiedenste Funktionen des humanen CD155 aufgedeckt. Dabei geht das Zelladhäsionsmolekül heterophile *trans*-Interaktionen mit den membranständigen Liganden Nectin-3, CD96, CD226 und Proteinen der extrazellulären Matrix ein. Durch die Wechselwirkungen mit CD96 und CD226, die unter anderem bei der NK-Zell-vermittelten Zellyse involviert sind, erlangt CD155 auch immunologische Bedeutung [54-56, 64]. Jüngere Studien belegen, dass die CD155-CD226-Interaktion darüber hinaus für die transendotheliale Migration von Monozyten essentiell ist [62]. Seit der Identifizierung der murinen Form des CD155 im Jahr 2003 [45] konnte gezeigt werden, dass die Interaktionen von CD155 mit Nectin-3, CD226 und Vitronektin zwischen Mensch und Maus konserviert sind [37, 45, 84]. In den Organen, die histologischen Analysen unterzogen wurden, überlappte auch das Expressionsmuster des murinen CD155 größtenteils mit dem des humanen Proteins [45].

Mit Hilfe der während dieser Arbeit generierten monoklonalen Antikörper konnte eine detailliertere Analyse der murinen CD155-Expression durchgeführt werden. Dabei bestätigte sich, dass das Expressionsmuster des Maus-CD155 weitgehend mit dem des humanen Proteins (soweit publiziert) übereinstimmt. Dennoch unterscheiden sich Maus und Mensch hinsichtlich der Bedeutung von CD155 für die Migration von Monozyten. Bei der Analyse CD155-defizienter Mäuse konnte darüber hinaus festgestellt werden, dass das murine Protein bei den späten Prozessen der Entwicklung einer humoralen Immunantwort im GALT involviert ist. Dabei wurde deutlich, wie komplex die Feinregulation dieser Vorgänge auf die Beschaffenheit und den Eintrittsort des Antigens abgestimmt sind.

4.1. Expression von murinem CD155, CD96 und CD226

4.1.1. Expression auf Leukozyten und Endothelien

Da humanes CD155 unter anderem bei der transendothelialen Migration von Monozyten involviert ist [62], wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst der Schwerpunkt der Expressionsanalysen auf im Blut zirkulierende Monozyten und Neutrophile gelegt. Auf einem Großteil der humanen Monozyten – definiert über CD14-Expression – konnte CD155 nachgewiesen werden [62, 94]. Die so definierte Population umfasst etwa 90 % aller humanen

Monozyten [95]. Detailliertere Kofärbungen von CD155 und Markern für Monozyten-Subpopulationen wurden in diesen Studien jedoch nicht durchgeführt. CD14⁺ Monozyten enthalten sowohl Zellen, die CCR2 hoch exprimieren, als auch solche, die zusätzlich für CD16 positiv sind und auf deren Oberfläche kein CCR2 detektiert werden kann. Diese CD14⁺CD16⁺ Monozyten exprimieren dafür aber höhere Mengen CCR5 [96]. Bei Monozyten korreliert die CCR2-Expression mit erhöhter Chemotaxis auf das Chemokin CCL2, welches an Entzündungsherden freigesetzt wird [97]. Auch für murine Monozyten konnte gezeigt werden, dass vor allem das Vorliegen von CCR2 auf der Zelloberfläche inflammatorische von residenten Monozyten unterscheidet [98]. Bei der Analyse muriner Monozyten-Subpopulationen von Wildtyp-Tieren zeigte sich, dass auch hier eine klare Trennung zwischen CCR2-positiven und -negativen Populationen existiert. Dabei konnte eine Beschränkung der CCR2-Expression auf CD11b^{hi}Gr-1⁺ Zellen festgestellt werden, wohingegen eine klar davon getrennte Population von CD11b⁺Gr-1⁻ Zellen kein CCR2 dafür aber partiell CCR5 exprimiert (Abb. 6A und Daten nicht abgebildet). Anhand dieser Abgrenzung konnte murines CD155 schwach auf residenten, aber etwas deutlicher auf inflammatorischen Monozyten detektiert werden (Abb. 6B).

Ein leichter Unterschied zwischen dem humanen und dem murinen Organismus zeigte sich bei der CD96-Expression. Mit Hilfe der am Institut etablierten anti-CD96-Antikörper konnte in der Maus eine auf die residente Monozyten-Population beschränkte Expression gezeigt werden (Abb. 9A). Folglich könnten diese mAK als ein weiteres Werkzeug zur Unterscheidung von residenten und inflammatorischen Monozyten dienen. Im Gegensatz dazu belegen Untersuchungen humaner Leukozyten, dass weder Monozyten-Populationen noch Neutrophile CD96 auf ihrer Oberfläche tragen [64]. Auch das murine CD226-Expressionsmuster auf diesen Zelltypen deckt sich nicht genau mit dem des humanen Proteins. Letzteres wird von über CD14-Expression definierten Monozyten exprimiert [54]. Auf Granulozyten konnte humanes CD226 in dieser Studie nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte hier für Wildtyp-Mäuse gezeigt werden, dass Neutrophile sowie residente und inflammatorische Monozyten CD226 hoch exprimieren (Abb. 9B).

In Gefäßen konnte Maus-CD155 auf allen Endothelien inklusive HEVs nachgewiesen werden (Abb. 8). Auch dieser Befund weicht leicht von einer Publikation über humanes CD155 ab, in der es zwar auf Endothelien, nicht aber auf HEVs detektiert werden konnte [62].

Trotz einiger Unterschiede in den untersuchten Expressionsmustern erschien eine Beteiligung des murinen CD155 an der Zell-Migration wahrscheinlich, da der für den Prozess der Diapedese wichtige Ligand CD226 [62] auf allen Monozyten exprimiert ist und auf allen

Endothelien CD155 nachzuweisen war. Die Feststellung, dass murines CD155 darüber hinaus stärker auf der durch CCR2 rekrutierbaren, inflammatorischen Monozyten-Population zu detektieren ist, war dabei ein weiterer interessanter Befund. Theoretisch könnte auch die umgekehrte Interaktion – nämlich CD155 auf der Leukozytenoberfläche und potentielle Liganden auf der Endothelseite – eine denkbare Rolle spielen. Für humane Nabelschnurvenen-Zellen konnte beispielsweise eine Hochregulation von CD226 nach LPS-Gabe gezeigt werden [61]. Über murines CD226 auf Endothelien liegen derzeit jedoch keine Informationen vor. Die funktionelle Bedeutung der hier untersuchten Expression von CD155 und seinen Liganden wird unter 4.3 näher diskutiert.

4.1.2. Expression auf B-Zell-Subpopulationen

CD155 erlangte besonderes immunologisches Interesse, nachdem seine Expression auf Keimzentrums-B-Zellen in Mandeln und Peyerschen Platten beschrieben wurde [41, 42]. Die hier vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass auch murines CD155 auf B-Zellen in Keimzentren der PP und mesenterialen Lymphknoten nachzuweisen ist (Abb. 7 und Daten nicht abgebildet). Im Gegensatz zu den Studien über das humane CD155 [94] konnte das Maus-Protein aber auch in sehr geringem Ausmaß auf folliculären B-Zellen sowie MZB detektiert werden. Aufgrund der äußerst schwachen Signale wurden diese (und alle anderen) durchflusszytometrischen Färbungen parallel mit CD155^{-/-} Tieren durchgeführt, wodurch sich die Spezifität der Signale in allen Fällen bestätigen ließ (Daten nicht gezeigt). Da nur sehr geringe Mengen des Proteins auf diesen Zelltypen vorliegen, ist es denkbar, dass die in humanen Studien verwendeten Antikörper nicht sensitiv genug waren, um eine Detektion zu ermöglichen. Auch einer der Antikörperklone (5A5) gegen murines CD155 war nicht in der Lage, das Molekül auf diesen Zellen nachzuweisen.

Ein interessanter Sachverhalt, der für das humane Protein bisher noch nicht beschrieben ist, ist die deutliche Expression des murinen CD155 auf Plasmazellen (Abb. 7). Vergleicht man die verschiedenen B-Zellen ergibt sich der Eindruck, dass CD155 mit zunehmender Aktivierung der Zellen hochreguliert wird. Eine ähnliche Aktivierungs-abhängige Oberflächenexpression von CD155 konnte am Institut für Immunologie auch auf DC und T-Zellen gezeigt werden. Aufgrund dieser interessanten Befunde wurde die Entwicklung einer humoralen Immunantwort in CD155-defizienten Mäusen analysiert (siehe 4.4).

Für humanes CD96 und CD226 sind kaum nennenswerte Expressionslevel auf B-Zellen publiziert. Lediglich eine sehr kleine, nicht näher identifizierte B-Zell-Subpopulation soll

CD226 exprimieren (untersucht in humanem Blut und Milzen von C57BL/6-Mäusen) [54, 84]. Möglicherweise gibt es bei den hier untersuchten Mäusen unter den Keimzentrums-B-Zellen ebenfalls eine solche Population (Abb. 10).

4.2. Interaktion von mCD155 und mCD96

Während es über CD226 zahlreiche Studien gibt, die seine vielfältigen Beteiligungen an immunologischen Prozessen nahe legen, ist die Datenlage bei CD96 deutlich weniger detailliert. In seiner Funktion beispielsweise bei der Zell-vermittelten Zytotoxizität ähnelt es wahrscheinlich dem CD226. Obwohl CD96 und CD155 in einem Genbereich liegen, in dem außerordentlich rasche Evolution stattfindet [99], konnte gezeigt werden, dass die Interaktion der Proteine zwischen Mensch und Maus konserviert ist (Seth, Maier et al., Manuskript eingereicht). Aufgrund dieser Konservierung entgegen einer schnellen genetischen Veränderung ist anzunehmen, dass der CD96-CD155-Interaktion eine biologische Funktion zukommt.

Im Rahmen der näheren Untersuchung des murinen CD96 konnte mit Hilfe von chimären CD155-Proteinen (Human/Ratte) gezeigt werden, dass für die Interaktion zwischen den beiden Molekülen die V-Domäne des CD155 essentiell ist (Abb. 11). Damit unterstreichen diese Ergebnisse ein weiteres Mal die entscheidende Funktion dieser Domäne – denn die Wechselwirkungen des CD155 mit humanem Nectin-3, CD226 oder dem Poliovirus benötigen alle diesen Proteinbereich [46, 87, 100, 101].

Mit Hilfe von chimären CD155-Molekülen (Maus/Ratte) wurde des Weiteren die Suche nach anti-CD155-Antikörpern ermöglicht, die die Wechselwirkung zwischen CD155 und möglichen Liganden blockieren können. Da erst gegen Ende dieser Arbeit ein CD226-IgG-Fusionsprotein verfügbar war, wurde hier nur die Interaktion mit CD96 untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Antikörperklone 3F1 und 4G3 die CD96-Bindung an ektopisch exprimiertes CD155 inhibieren können (Abb. 12). Da alle generierten anti-CD155-Antikörper Epitope außerhalb der an der CD96-Bindung involvierten V-Domäne erkennen (Abb. 5), ist anzunehmen, dass die beiden Antikörper eine CD155-Region nahe der V-Domäne binden und die Interaktion mit CD96 aufgrund von sterischer Hinderung unterbinden. Die blockierende Wirkung dieser beiden Antikörper konnte mit Thymozyten bestätigt werden, die endogen CD155 exprimieren (Seth, Maier et al., Manuskript eingereicht).

4.3. Die Rolle von mCD155 bei der Migration von Leukozyten

4.3.1. Migration unter nicht-inflammatorischen Bedingungen

Die meisten murinen T-Zellen exprimieren in unterschiedlichem Ausmaß CD155, CD96 und CD226 (Sebastian Seth, persönliche Kommunikation und [86]). Da Maus-Endothelien ebenfalls CD155 (siehe Abb. 8), möglicherweise aber auch zusätzlich CD155-Liganden exprimieren, wären verschiedene Konstellationen denkbar, in denen das Zusammenspiel dieser Moleküle beim *Homing* von Lymphozyten eine Rolle spielt. Darüber hinaus ist bekannt, dass die Interaktion des *in cis* mit dem CD226 assoziierten LFA-1 mit ICAM unter anderem beim *Homing* von Lymphozyten in periphere Lymphknoten bedeutend ist [102].

Um die Möglichkeit einer CD155-Beteiligung an der Migration von Lymphozyten zu überprüfen, wurden adoptive Transfer-Experimente mit naiven CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen durchgeführt. Dabei konnte jedoch keine Beteiligung des Moleküls am *Homing* dieser Zellen festgestellt werden (Abb. 13). Der Transfer von Zellmischungen aus CD155-exprimierenden sowie CD155-defizienten Lymphozyten in Wildtyp- aber auch CD155^{-/-} Empfänger-Tiere hätte dabei sowohl bei einer CD155-Involvierung auf der Endothel- als auch auf der Lymphozyten-Seite Defizite offenbaren müssen. In keinem der Fälle konnte jedoch ein unterschiedliches Migrationsverhalten der beiden Zell-Populationen beobachtet werden. Dabei wurden im Speziellen CD4⁺ und CD8⁺ Zellen analysiert. B-Zellen wurden aufgrund ihrer sehr schwachen CD155-Expression sowie dem Fehlen der CD155-Liganden auf ihrer Oberfläche nicht untersucht.

Durch die Verwendung von FTY720, welches die Lymphozyten-Einwanderung in Lymphknoten erleichtert und deren Auswanderung verhindert [91], ergaben sich Hinweise darauf, dass CD155 auch bei der Lymphozyten-Emigration aus den sekundären lymphatischen Organen keine essentielle Bedeutung hat (Abb. 14).

Auch Nectin-2, welches auf murinen Endothelien detektiert werden konnte und dabei sogar näher am Gefäß-Lumen exprimiert wird als CD155, hatte keinen Einfluss auf das *Homing* von Lymphozyten. Dies konnte mit Hilfe von adoptiven Transfer-Experimenten mit Nectin-2-defizienten Mäusen gezeigt werden (Daten nicht abgebildet). Möglicherweise beschränkt sich die Funktion des CD155 (und des ihm verwandten Nectin-2) auf Endothelien auf die Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten innerhalb des Endothelzellverbandes [37] oder kann durch andere Moleküle im CD155^{-/-} Tier kompensiert werden.

4.3.2. CD155-IgG-induzierte Leukozytopenie

Bei der Untersuchung der Zymosan-induzierten peritonealen Entzündung stellte sich heraus, dass das intravenös verabreichte CD155-IgG-Fusionsprotein binnen weniger Stunden zu einer Leukozytopenie führt (Abb. 17). Die Fc-Rezeptor-vermittelte Erkennung von an Zellen gebundenen Antikörpern durch NK-Zellen kann zur Tötung der Zellen führen, einen Vorgang, der als „Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität“ (ADCC) bezeichnet wird [103]. Da die verwendeten Fusionsproteine einen humanen IgG1-Fc-Teil enthalten und vermutlich nach ihrer Aufreinigung über Protein A Sepharose zum Teil als Oligomere vorliegen, wäre denkbar, dass die Bindung des CD155-IgG an seine auf T-Zellen und Monozyten exprimierten Liganden (CD96 oder CD226) zu einer solchen NK-Zell- oder Komplement-Aktivierung mit anschließender Depletion der Zellen führt. Eine Bindung des Nectin-1-Kontrollproteins an die Leukozyten war nicht zu erwarten, da zum Zeitpunkt der Durchführung des Experiments nur Interaktionen mit den nicht auf Leukozyten exprimierten Nectinen beschrieben waren. Allerdings konnte am Institut für Immunologie in jüngster Zeit gezeigt werden, dass murines Nectin-1 mit Maus-CD96 interagiert. Eine mögliche Kreuzinteraktion des humanen Nectin-1-Fusionsproteins mit CD96 auf murinen T-Zellen könnte die leichte Reduktion dieser nach der Behandlung mit dem Kontrollprotein erklären (Abb. 17). Die Interaktion zwischen CD96 und Nectin-1 fällt deutlich schwächer aus als die mit CD155 (Seth, Maier et al., Manuskript eingereicht). Dadurch würde sich auch die weniger deutliche Leukozytopenie der Zellen erklären.

Dieses Modell könnte einen Mechanismus für die Depletion der T-Zellen darstellen. Da naive B-Zellen jedoch weder CD96 noch CD226 (Abb. 10) und vermutlich auch kein Nectin-3 exprimieren, könnte dieses Modell nicht erklären, warum auch B-Zellen aus dem Blut verschwinden. Im Gegensatz zu T-Zellen exprimieren B-Lymphozyten jedoch Fc-Rezeptoren, durch die eine Bindung des CD155-IgG wie auch des Kontrollproteins über deren Fc-Teile denkbar wäre. So käme es möglicherweise zu einer im Blut ungewöhnlich hohen CD155- und Nectin-1-Dichte auf den B-Zellen. Aufgrund der vielfach beschriebenen Beteiligung von stark exprimiertem CD155 bei der NK-Zell-vermittelten Zelllyse [54-56, 64] wäre es theoretisch denkbar, dass auf diese Weise eine Depletion der B-Zellen erfolgt. Diese Hypothese eines CD155-spezifischen Effekts würde davon gestützt werden, dass das Nectin-1-Kontrollprotein nicht zu einer Reduktion der B-Zellen führt (Abb. 17).

4.3.3. Migration unter inflammatorischen Bedingungen

Für eine mögliche Rolle des murinen CD155 bei der Migration von Leukozyten unter inflammatorischen Bedingungen sprachen neben dem charakteristischen Expressionsmuster verschiedene Hinweise zur Funktion des humanen CD155. Der direkteste Hinweis war dabei die in *in vitro*-Experimenten gezeigte Beteiligung bei der Diapedese [62]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, mit dem CD155 *in cis* assoziiert sein kann, an der TEM humaner Monozyten beteiligt ist [104]. Obwohl auch die Interaktionen des CD155 mit seinen bisher bekannten Liganden zwischen Maus und Mensch konserviert sind, konnte im Modell der Zymosan-induzierten Leukozyten-Rekrutierung keine vergleichbare Funktion des murinen CD155 nachgewiesen werden (Abb. 16). Zymosan besteht aus Partikeln der Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae*. Es wirkt direkt auf DC und Makrophagen und stimuliert diese zur Freisetzung verschiedener Zytokine. Der genaue Mechanismus dieser Stimulation ist dabei momentan noch strittig. Zymosan wird vermutlich TLR-unabhängig von Dectin-1 (einem β -Glucan-Rezeptor) erkannt und führt zur Aktivierung von NFAT-Transkriptionsfaktoren in Makrophagen und DC, wodurch deren Zytokinproduktion reguliert wird [105, 106]. Dabei ist die genaue Route, über die die Leukozyten ins Peritoneum rekrutiert werden, unklar. Aus diesem Grund wurden auch andere Rekrutierungsmodelle etabliert, bei denen transendotheliale Migration ein zwingender Schritt ist und die zu einer Zell-Infiltration genau definierter Bereiche der Haut führen. Dazu können verschiedene Chemokine gezielt eingesetzt werden. Besonders gut eignet sich das *air pouch*-Modell, bei dem mit Hilfe von CCL2 oder CCL7 Monozyten in künstlich geschaffene subkutan erzeugte Hohlräume rekrutiert werden. Allerdings zeigte sich auch hier keine Beeinträchtigung der Zell-Infiltration – weder durch das Fehlen (CD155^{-/-} Tiere) noch durch die Blockierung von murinem CD155 mit Hilfe der generierten Antikörper (Daten nicht abgebildet). Nachdem auch ein weiteres Haut-Infiltrationsmodell unter Verwendung eines Phorbolesters (PMA) keinen Einfluss der CD155-Defizienz zeigte, muss davon ausgegangen werden, dass die Funktion des Moleküls bei der transendothelialen Migration nicht konserviert ist oder *in vivo* durch kompensatorische Mechanismen unter Involvement anderer Moleküle ausgeglichen wird. Ein möglicher Hinweis auf eine Kompensation ist die Hochregulation der Liganden CD96 und CD226 auf verschiedenen CD155-defizienten Zell-Populationen (Seth, Maier et al., Manuskript eingereicht). Den direktesten Vergleich mit den publizierten Daten hätten *in vitro*-Migrations-Experimente geliefert. Da aufgrund des kleineren Blutvolumens der Maus

murine Monozyten aber nur in vergleichsweise geringen Zahlen isoliert werden können, wurde von dieser Möglichkeit abgesehen.

Am Institut für Immunologie wurde darüber hinaus die Aufnahme von Antigenen durch Haut-DC, sowie deren Reifung und Wanderung zum drainierenden Lymphknoten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass auch diese Prozesse in den CD155^{-/-} Tieren normal verlaufen [86]. Erstaunlicherweise konnte hierbei jedoch eine Hochregulation des CD155 auf Wildtyp-DC während deren Reifung festgestellt werden (S.Seth, persönliche Kommunikation).

4.4. Einfluss der CD155-Defizienz auf die humorale Immunantwort

Murines CD155 zeigte ein charakteristisches Expressionsmuster, welches FDC sowie T- und B-Zell-Subtypen – insbesondere Plasmazellen (Abb. 7) umfasste. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die humorale Immunantwort in CD155^{-/-} Tieren untersucht. Nachdem gezeigt wurde, dass die Gesamt-Ig-Spiegel in unbehandelten Tieren nicht durch die CD155-Defizienz beeinflusst sind (Abb. 18), wurden verschiedene Immunisierungsmodelle mit den Tieren durchgeführt und die Generierung Antigen-spezifischer Antikörper im Serum bzw. Darmlumen verfolgt. In jüngeren Studien wurden kontrovers diskutierte Ergebnisse gezeigt, die auf eine mögliche Beeinflussung der Th1-Polarisation von Antigen-stimulierten CD4⁺ T-Zellen durch CD226 deuten [59, 93]. Durch das Fehlen der Interaktion mit CD155 könnte sich daher eine Verschiebung des Musters der generierten Antikörper-Klassen ergeben. Derlei Effekte wurden allerdings bei keiner der hier durchgeführten Immunisierungen entdeckt. Auch eine mit CD155^{-/-} Mäusen durchgeführte DTH-Reaktion zeigte keine Beeinträchtigung Th1-geprägter Prozesse (Abschnitt 3.5.4).

Zwar wurden bei diesen Versuchen keine Verschiebungen bei der Generierung verschiedener Klassen von Antikörpern entdeckt, CD155-defiziente Mäuse zeigten jedoch bei oraler Immunisierung mit löslichem Antigen eine gleichmäßig reduzierte Antikörper-Antwort aller Isotypklassen – ausgenommen IgM (Abb. 20). Die normalen Titer spezifischer IgM-Antikörper deuten darauf hin, dass die erste Phase der Immunisierung, in der Primärfollikel gebildet werden, in den CD155^{-/-} Tieren unbeeinträchtigt ist. Im Gegensatz dazu sind später ablaufende Prozesse betroffen, in denen es zur Generierung von Plasmazellen kommt, die sowohl hochaffine Antikörper sezernieren, als auch einen Isotyp-Klassenwechsel durchlaufen haben. Diese Vorgänge beinhalten außerdem die Wanderung von Plasmazellen an ihre

Bestimmungsorte, die Freisetzung der Immunglobuline sowie letztlich den transepithelialen Transport von IgA.

An den zum Isotyp-Klassenwechsel führenden Prozessen sind Interaktionen mit verschiedenen dendritischen Zellen und T-Helferzellen beteiligt. Unter anderem spielen FDC eine wichtige Rolle: diese Zellen können Immunkomplexe an ihrer Oberfläche tragen und so Einfluss auf den Klassenwechsel sowie die Generierung von hochaffinen Antikörpern nehmen [107]. Interessanterweise zeigen auch sie CD155-Expression auf ihrer Zelloberfläche [45]. Die Expression von CD155 kann durch das Signal-Molekül *Sonic hedgehog* aktiviert werden [108]. Jüngste Studien zeigen, dass FDC dieses Molekül freisetzen und so Keimzentrums-B-Zellen vor Apoptose schützen [109]. Darüber hinaus konnte bei Untersuchungen humanen Gewebes eine Kolo-kalisation von CD155 und Vitronektin in Keimzentren der Mandeln gezeigt werden [41]. Da Vitronektin in der Lage ist, die Komplement-Kaskade zu hemmen, wird auch hier eine Schutz-Funktion von Komplement-Rezeptor exprimierenden Zellen des Keimzentrums diskutiert [69].

Um zu überprüfen, inwieweit die Proliferation und Migration der Plasmazellen in CD155-defizienten Tieren beeinträchtigt ist, wurden ELISPOT-Experimente durchgeführt, die die Quantifizierung von Antigen-spezifischen Plasmazellen erlaubten. Dabei zeigte sich, dass am untersuchten Zeitpunkt 14 Tage nach der Immunisierung normale Mengen Choleratoxin-spezifischer Plasmazellen in den MLN und der Lamina propria der CD155^{-/-} Mäuse vorlagen (Abb. 21). Die zusätzlich durchgeführte immunohistologische Untersuchung von Gefrierschnitten ermöglichte zwar unter den gegebenen Umständen keine Detektion der spezifischen Plasmazellen, zeigte aber eine unauffällige Verteilung aller Plasmazellen in der Lamina propria (Daten nicht abgebildet).

Die potentiellen Funktionen des murinen CD155 bei den oben diskutierten Vorgängen, wie z.B. dem Schutz der B-Zellen vor Apoptose oder deren Wanderung an ihre Bestimmungsorte spielen möglicherweise nur eine untergeordnete Rolle oder können durch andere Moleküle kompensiert werden. Eine Absicherung dieser entscheidenden Vorgänge durch redundante Mechanismen erscheint plausibel. Nachdem die Proliferation und Wanderung der Plasmazellen unter den untersuchten Umständen in den CD155^{-/-} Mäusen normal ablaufen, grenzt sich der beobachtete Phänotyp auf den Klassenwechsel der Antikörper, deren Freisetzung oder den Transport der freigesetzten Antikörper ein.

Bei der Durchführung der Versuche mit Tieren eines anderen Maus-Stammes (Balb/c) zeigte sich überraschenderweise keine signifikante Reduktion der Antikörper-Titer in CD155-defizienten Tieren (Daten nicht gezeigt). Die Generierung einer humoralen Immunantwort ist

ein hochkomplexer Prozess, bei dem eine große Zahl verschiedener Genloci involviert ist. Die hier durchgeführten Experimente mit verschiedenen Mausstämmen machen dies deutlich. Leider erschwert diese Tatsache jedoch die Abschätzung der Signifikanz bzw. Übertragbarkeit auf den humanen Organismus.

Interessanterweise kann der beschriebene Phänotyp nur bei oraler Immunisierung beobachtet werden. Weder subkutan noch intraperitoneal immunisierte CD155^{-/-} Mäuse entwickeln abnormale Antikörper-Antworten (Abb. 22 und Daten nicht abgebildet). Diese Befunde zeigen, dass nicht nur die Natur des Antigens, sondern auch der Ort seiner Aufnahme von entscheidender Bedeutung für die entstehende Immunreaktion ist. Während das Antigen bei der oralen Immunisierung vor allem in PP und die MLN sowie Strukturen wie das solitäre intestinale lymphatische Gewebe gelangt (Abb. 1), kommt es bei subkutaner oder peritonealer Immunisierung vor allem zur Antigenpräsentation in peripheren Lymphknoten. Die systemische Verteilung von Antigen nach oraler Immunisierung ist zwar theoretisch denkbar – eine immunologische Relevanz hat diese vermutlich jedoch nicht [110]. Der auf orale Immunisierung beschränkte Phänotyp der CD155-defizienten Mäuse bestätigt diese Aussage, da eine systemische Verteilung des Antigens vermutlich zur Kompensation des beobachteten Effekts führen würde.

Um zu sehen, inwieweit die Natur des Antigens einen Einfluss auf den beobachteten Phänotyp der Tiere hat, wurde schließlich eine Immunisierung durchgeführt, bei der – im Gegensatz zu den davor verwendeten löslichen Antigenen – lebende, attenuierte Salmonellen als partikuläres Antigen oral verabreicht wurden. Dieses Experiment führte nicht nur zu einer normalen IgM-, sondern auch zu einer unbeeinträchtigten sIgA-Antwort in CD155^{-/-} Mäusen. Die Menge an spezifischen IgG-Antikörpern in den Seren der CD155-defizienten Tiere war jedoch reduziert (Abb. 24). Sowohl Cholera toxin als auch lebende Salmonellen sind generell in der Lage, in Peyersche Platten zu gelangen und dortige DC zur Migration in die B- und T-Zell-Bereiche dieser zu veranlassen [111]. Trotzdem scheint CD155 unterschiedlich stark bei der Generierung dieser Immunantworten involviert zu sein. Vermutlich kommt es durch den Unterschied zwischen löslicher und partikulärer Natur der Antigene zu Spezialisierungen bei der Regulation dieser Immunreaktionen.

Das Ergebnis des Versuchs könnte auch darauf hindeuten, dass die intestinale Immunabwehr nicht nur auf relativ feine Unterschiede reagiert, sondern zudem mehrere Mechanismen bei der Pathogenbekämpfung greifen. Dies zeigt sich besonders bei Experimenten mit genetisch manipulierten Tieren, die keine Keimzentren in Peyerschen Platten ausbilden können. Trotz des Fehlens dieser Keimzentren sind in der Lamina propria angesiedelte Plasmazellen in der

Lage, IgA-Antikörper zu sezernieren [112]. Bei derlei Mechanismen kommt es vermutlich zur Antigenaufnahme über M-Zellen außerhalb des Follikel-assoziierten Epithels [113] oder durch intraepitheliale DC, die in der Lage sind, über ihre Dendriten Antigene direkt aus dem Darmlumen aufzunehmen [114]. Möglicherweise ist murines CD155 bei derartigen Prozessen unterschiedlich stark involviert.

Das hier diskutierte Experiment wurde mit Tieren des Balb/c-Hintergrunds durchgeführt. Erste Versuche mit einer geringen Zahl an CD155^{-/-} Tieren des 129/Sv-Stammes zeigen jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und CD155-defizienten Mäusen. Dabei besteht aber aufgrund von geringen Tierzahlen noch Unklarheit über eine mögliche Beeinflussung auf die ins Darmlumen sezernierte IgA-Menge. Die Untersuchungen diesbezüglich sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen.

Die Ergebnisse der durchgeführten Immunisierungs-Experimente mit den CD155-defizienten Tieren lassen einen Defekt beim Klassenwechsel der Antikörper am wahrscheinlichsten erscheinen. An diesem Vorgang sind Zelltypen wie FDC [107] und so genannte folliculäre T-Helferzellen (T_{FH}) maßgeblich beteiligt [115, 116]. Letztere sind eine Effektor-T-Zell-Subpopulation, die CD4, CXCR5, ICOS und CD40L exprimiert und deren Lokalisation innerhalb sekundärer lymphatischer Organe über die feine Regulation ihrer CXCR5- und CCR7-Expression gesteuert wird. Sie können in B-Zell-Follikel rekrutiert werden und tragen dort zur effizienten B-Zell-Hilfe bei. Interessanterweise zeigten Studien mit CXCR5-defizienten Mäusen, dass CXCR5 für die T-Zell-Migration in B-Zell-Follikel essentiell ist. Immunisierte CXCR5^{-/-} Tiere zeigen eine reduzierte IgG-Antikörper-Antwort während die IgM-Titer denen der Wildtyp-Tiere gleichen [115]. Diese und andere Studien liefern Hinweise auf eine essentielle Beteiligung der T_{FH}-Zellen am Isotyp-Klassenwechsel. Andere Untersuchungen konnten demonstrieren, dass T_{FH}-Zellen jedoch nicht für das immunologische Gedächtnis relevant sind [117]. Die Parallelen zwischen den Phänotypen der CD155^{-/-} und CXCR5^{-/-} Mäuse nach erfolgter Immunisierung könnten einen Hinweis darauf geben, dass die Funktion des CD155 möglicherweise mit dieser Zell-Population assoziiert ist.

5. Ausblick

Die Untersuchungen des murinen CD155-Expressionsmusters sowie die Konservierung aller bisher dokumentierten Interaktionen untermauern, dass mit Tage4 das richtige homologe Protein zu humanem CD155 identifiziert wurde. Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen konnte keine Beteiligung des murinen CD155 bei der Migration von Monozyten festgestellt werden. Durch die Vielzahl der bei diesen Vorgängen beteiligten Moleküle erscheint eine Kompensation *in vivo* jedoch nicht unwahrscheinlich. Aus diesem Grund könnten – in Anlehnung an Publikationen über die Beteiligung des CD155 bei der Motilität von Zellen – Experimente durchgeführt werden, bei denen die Beweglichkeit von isolierten Zellen *in vitro* untersucht wird. Da die Durchführung von Transwell-Experimenten aufgrund des großen Bedarfs an murinen Monozyten impraktikabel wäre, böten sich beispielsweise *Time-lapse*-Experimente an. Darüber hinaus stehen mittlerweile zusätzlich anti-CD226-Antikörper zur Verfügung. Durch ihre Injektion in CD155^{-/-} Mäuse wäre möglicherweise eine umfassendere Blockierung der beteiligten Moleküle erreichbar. Auf diese Weise könnte sich unter Umständen klären lassen, inwieweit eine Kompensation der CD155-Defizienz *in vivo* auftritt oder ob diese biologische Funktion des CD155 nicht zwischen Mensch und Maus konserviert ist.

Bei der Untersuchung der humoralen Immunantwort in CD155-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass oral immunisierte CD155^{-/-} Tiere Defizite bei der Generierung von IgA- und IgG-Antikörpern aufweisen. Aufgrund der normal ablaufenden ersten Phase der Immunreaktion (was durch reguläre IgM-Spiegel nahegelegt wird) sowie der ungestörten Migration der B-Zellen an ihre Bestimmungsorte grenzt sich die Ursache des Phänotyps auf die Mechanismen der Freisetzung der Immunglobuline oder den Isotyp-Klassenwechsel ein. Da sich erstaunliche Ähnlichkeiten zur Beeinflussung der humoralen Antwort in CXCR5-defizienten Mäusen zeigen, wäre eine Beeinträchtigung der Migration oder Funktion von T_{FH}-Zellen in CD155^{-/-} Mäusen denkbar. Nähere Untersuchungen dieser Zell-Subpopulation sind bereits in Vorbereitung. Sollten diese Zellen tatsächlich für den Phänotyp der CD155-defizienten Mäuse verantwortlich sein, wäre zunächst zu klären, ob ein Migrationsdefekt oder eine Störung des Mechanismus der durch diese Zellen vermittelten B-Zell-Hilfe vorliegt. Die Existenz der CD155^{-/-} Tiere ermöglicht eine vielversprechende weitere Analyse dieser Sachverhalte.

Neben den hier gezeigten Studien wird derzeit auch die Involvierung des murinen CD155 bei der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität, der Differenzierung von T-Zellen und der frühen T-Zell-Entwicklung untersucht. Darüber hinaus wären aufgrund der Infektionsroute des Poliovirus bei der Poliomyelitis auch Untersuchungen neurologischer Gewebe angebracht.

6. Literatur

1. Ansel, K.M. and J.G. Cyster, *Chemokines in lymphopoiesis and lymphoid organ development*. Current Opinion in Immunology, 2001. **13**(2): p. 172-9.
2. Campbell, D.J., C.H. Kim, and E.C. Butcher, *Chemokines in the systemic organization of immunity*. Immunological Reviews, 2003. **195**: p. 58-71.
3. Bowman, E.P., et al., *The intestinal chemokine thymus-expressed chemokine (CCL25) attracts IgA antibody-secreting cells.[see comment]*. Journal of Experimental Medicine, 2002. **195**(2): p. 269-75.
4. Palframan, R.T., et al., *Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues.[see comment]*. Journal of Experimental Medicine, 2001. **194**(9): p. 1361-73.
5. Charo, I.F. and R.M. Ransohoff, *The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation*. New England Journal of Medicine, 2006. **354**(6): p. 610-21.
6. Gonzalez-Amaro, R. and F. Sanchez-Madrid, *Cell adhesion molecules: selectins and integrins*. Critical Reviews in Immunology, 1999. **19**(5-6): p. 389-429.
7. Rojas, A.I. and A.R. Ahmed, *Adhesion receptors in health and disease*. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine, 1999. **10**(3): p. 337-58.
8. Hynes, R.O., *Cell adhesion: old and new questions*. Trends in Cell Biology, 1999. **9**(12): p. M33-7.
9. Aplin, A.E., et al., *Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins*. Pharmacological Reviews, 1998. **50**(2): p. 197-263.
10. Bevilacqua, M.P., *Endothelial-leukocyte adhesion molecules*. Annual Review of Immunology, 1993. **11**: p. 767-804.
11. Watt, S.M., S.E. Gschmeissner, and P.A. Bates, *PECAM-1: its expression and function as a cell adhesion molecule on hemopoietic and endothelial cells*. Leukemia & Lymphoma, 1995. **17**(3-4): p. 229-44.
12. Newman, P.J., *The role of PECAM-1 in vascular cell biology*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1994. **714**: p. 165-74.
13. Butcher, E.C. and L.J. Picker, *Lymphocyte homing and homeostasis*. Science, 1996. **272**(5258): p. 60-6.
14. Springer, T.A., *Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration*. Annual Review of Physiology, 1995. **57**: p. 827-72.
15. Alon, R., et al., *Glycolipid ligands for selectins support leukocyte tethering and rolling under physiologic flow conditions*. Journal of Immunology, 1995. **154**(10): p. 5356-66.
16. Laudanna, C., et al., *Rapid leukocyte integrin activation by chemokines*. Immunological Reviews, 2002. **186**: p. 37-46.
17. Campbell, J.J., et al., *Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions*. Science, 1998. **279**(5349): p. 381-4.
18. Imhof, B.A. and M. Aurrand-Lions, *Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(6): p. 432-44.
19. Amzel, L.M. and R.J. Poljak, *Three-dimensional structure of immunoglobulins*. Annual Review of Biochemistry, 1979. **48**: p. 961-97.
20. Brandtzaeg, P., I.N. Farstad, and G. Haraldsen, *Regional specialization in the mucosal immune system: primed cells do not always home along the same track*. Immunology Today, 1999. **20**(6): p. 267-77.

21. Pabst, O., et al., *Cryptopatches and isolated lymphoid follicles: dynamic lymphoid tissues dispensable for the generation of intraepithelial lymphocytes*. Eur J Immunol, 2005. **35**(1): p. 98-107.
22. Mowat, A.M., *Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens*. Nature Reviews. Immunology, 2003. **3**(4): p. 331-41.
23. Shapiro-Shelef, M. and K. Calame, *Regulation of plasma-cell development*. Nature Reviews. Immunology, 2005. **5**(3): p. 230-42.
24. Jacob, J., R. Kassir, and G. Kelsoe, *In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations*. Journal of Experimental Medicine, 1991. **173**(5): p. 1165-75.
25. Li, Z., et al., *The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination*. Genes & Development, 2004. **18**(1): p. 1-11.
26. Berland, R. and H.H. Wortis, *Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5*. Annual Review of Immunology, 2002. **20**: p. 253-300.
27. Stoel, M., et al., *Restricted IgA repertoire in both B-1 and B-2 cell-derived gut plasmablasts*. Journal of Immunology, 2005. **174**(2): p. 1046-54.
28. Pillai, S., A. Cariappa, and S.T. Moran, *Positive selection and lineage commitment during peripheral B-lymphocyte development*. Immunological Reviews, 2004. **197**: p. 206-18.
29. Lopes-Carvalho, T. and J.F. Kearney, *Development and selection of marginal zone B cells*. Immunological Reviews, 2004. **197**: p. 192-205.
30. Berlin, C., et al., *Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1*. Cell, 1993. **74**(1): p. 185-95.
31. Kroese, F.G., et al., *A major peritoneal reservoir of precursors for intestinal IgA plasma cells*. Immunological Investigations, 1989. **18**(1-4): p. 47-58.
32. Litinskiy, M.B., et al., *DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLYS and APRIL.[see comment]*. Nature Immunology, 2002. **3**(9): p. 822-9.
33. Castigli, E., et al., *TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells*. Journal of Experimental Medicine, 2005. **201**(1): p. 35-9.
34. Fagarasan, S., et al., *In situ class switching and differentiation to IgA-producing cells in the gut lamina propria.[see comment]*. Nature, 2001. **413**(6856): p. 639-43.
35. Fagarasan, S., et al., *Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora*. Science, 2002. **298**(5597): p. 1424-7.
36. Mendelsohn, C.L., E. Wimmer, and V.R. Racaniello, *Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily*. Cell, 1989. **56**(5): p. 855-865.
37. Takai, Y., et al., *Nectins and nectin-like molecules: Roles in cell adhesion, migration, and polarization*. Cancer Sci, 2003. **94**(8): p. 655-67.
38. Koike, S., et al., *The poliovirus receptor protein is produced both as membrane-bound and secreted forms*. EMBO J., 1990. **9**(10): p. 3217-3224.
39. Bernhardt, G., et al., *The poliovirus receptor: Identification of domains and amino acid residues critical for virus binding*. Virology, 1994. **203**: p. 344-356.
40. Baur, B., et al., *Identification of secreted CD155 isoforms*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **309**(1): p. 175-82.
41. Lange, R., et al., *The poliovirus receptor CD155 mediates cell-to-matrix contacts by specifically binding to vitronectin*. Virology, 2001. **285**(2): p. 218-27.
42. Iwasaki, A., et al., *Immunofluorescence analysis of poliovirus receptor expression in Peyer's patches of humans, primates, and CD155 transgenic mice: implications for poliovirus infection*. J Infect Dis, 2002. **186**(5): p. 585-92.

43. Masson, D., et al., *Overexpression of the CD155 gene in human colorectal carcinoma*. Gut, 2001. **49**(2): p. 236-40.
44. Aoki, J., et al., *Mouse homolog of poliovirus receptor-related gene 2 product, mPRR2, mediates homophilic cell aggregation*. Exp. Cell Res., 1997. **235**(2): p. 374-384.
45. Ravens, I., et al., *Characterization and identification of Tage4 as the murine orthologue of human poliovirus receptor/CD155*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **312**(4): p. 1364-71.
46. Mueller, S. and E. Wimmer, *Recruitment of nectin-3 to cell-cell junctions through trans-heterophilic interaction with CD155, a vitronectin and poliovirus receptor that localizes to alpha(v)beta3 integrin-containing membrane microdomains*. J Biol Chem, 2003. **278**(33): p. 31251-60.
47. Satoh-Horikawa, K., et al., *Nectin-3, a new member of immunoglobulin-like cell adhesion molecules that shows homophilic and heterophilic cell-cell adhesion activities*. J Biol Chem, 2000. **275**(14): p. 10291-9.
48. Takai, Y. and H. Nakanishi, *Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 1): p. 17-27.
49. Sato, T., et al., *Involvement of heterophilic trans-interaction of Necl-5/Tage4/PVR/CD155 with nectin-3 in formation of nectin- and cadherin-based adherens junctions*. Genes Cells, 2004. **9**(9): p. 791-9.
50. Ikeda, W., et al., *Tage4/Nectin-like molecule-5 heterophilically trans-interacts with cell adhesion molecule Nectin-3 and enhances cell migration*. J Biol Chem, 2003. **278**(30): p. 28167-72.
51. Fujito, T., et al., *Inhibition of cell movement and proliferation by cell-cell contact-induced interaction of Necl-5 with nectin-3*. J Cell Biol, 2005. **171**(1): p. 165-73.
52. Inagaki, M., et al., *Roles of cell-adhesion molecules nectin 1 and nectin 3 in ciliary body development*. Development, 2005. **132**(7): p. 1525-37.
53. Inagaki, M., et al., *Role of cell adhesion molecule nectin-3 in spermatid development*. Genes to Cells, 2006. **11**(9): p. 1125-32.
54. Shibuya, A., et al., *DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes*. Immunity, 1996. **4**(6): p. 573-81.
55. Castriconi, R., et al., *Natural killer cell-mediated killing of freshly isolated neuroblastoma cells: critical role of DNAX accessory molecule-1-poliovirus receptor interaction*. Cancer Res, 2004. **64**(24): p. 9180-4.
56. Tahara-Hanaoka, S., et al., *Functional characterization of DNAM-1 (CD226) interaction with its ligands PVR (CD155) and nectin-2 (PRR-2/CD112)*. Int Immunol, 2004. **16**(4): p. 533-8.
57. Shibuya, K., et al., *Physical and functional association of LFA-1 with DNAM-1 adhesion molecule*. Immunity, 1999. **11**(5): p. 615-23.
58. Shibuya, K., et al., *CD226 (DNAM-1) is involved in lymphocyte function-associated antigen 1 costimulatory signal for naive T cell differentiation and proliferation*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1829-39.
59. Dardalhon, V., et al., *CD226 is specifically expressed on the surface of Th1 cells and regulates their expansion and effector functions*. J Immunol, 2005. **175**(3): p. 1558-65.
60. Kojima, H., et al., *CD226 mediates platelet and megakaryocytic cell adhesion to vascular endothelial cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(38): p. 36748-53.
61. Chen, L., et al., *The expression, regulation and adhesion function of a novel CD molecule, CD226, on human endothelial cells*. Life Sciences, 2003. **73**(18): p. 2373-82.
62. Reymond, N., et al., *DNAM-1 and PVR regulate monocyte migration through endothelial junctions*. J Exp Med, 2004. **199**(10): p. 1331-41.

63. Wang, P.L., et al., *Identification and molecular cloning of tactile. A novel human T cell activation antigen that is a member of the Ig gene superfamily*. J Immunol, 1992. **148**(8): p. 2600-8.
64. Fuchs, A., et al., *Cutting edge: CD96 (tactile) promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD155)*. J Immunol, 2004. **172**(7): p. 3994-8.
65. Preissner, K.T., *Structure and biological role of vitronectin*. Annu Rev Cell Biol, 1991. **7**: p. 275-310.
66. Preissner, K.T., et al., *The dual role of the urokinase receptor system in pericellular proteolysis and cell adhesion: implications for cardiovascular function*. Basic Research in Cardiology, 1999. **94**(5): p. 315-21.
67. van der Flier, A. and A. Sonnenberg, *Function and interactions of integrins*. Cell & Tissue Research, 2001. **305**(3): p. 285-98.
68. Ria, R., et al., *Alpha(v)beta(3) integrin engagement enhances cell invasiveness in human multiple myeloma.[see comment]*. Haematologica, 2002. **87**(8): p. 836-45.
69. Podack, E.R., W.P. Kolb, and H.J. Muller-Eberhard, *The SC5b-7 complex: formation, isolation, properties, and subunit composition*. Journal of Immunology, 1977. **119**(6): p. 2024-9.
70. Podack, E.R., K.T. Preissner, and H.J. Müller-Eberhard, *Inhibition of C9 polymerization within the SC5b-9 complex of complement by S-protein*. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. (S) suppl., 1984. **284:92**: p. 889.
71. Konstantinides, S., et al., *Plasminogen activator inhibitor-1 and its cofactor vitronectin stabilize arterial thrombi after vascular injury in mice*. Circulation, 2001. **103**(4): p. 576-83.
72. Fay, W.P., et al., *Vitronectin inhibits the thrombotic response to arterial injury in mice*. Blood, 1999. **93**(6): p. 1825-1830.
73. Reheman, A., et al., *Vitronectin stabilizes thrombi and vessel occlusion but plays a dual role in platelet aggregation.[see comment]*. Journal of Thrombosis & Haemostasis, 2005. **3**(5): p. 875-83.
74. Brown, E.J., *The role of extracellular matrix proteins in the control of phagocytosis*. Journal of Leukocyte Biology, 1986. **39**(5): p. 579-91.
75. Freistadt, M.S. and K.E. Eberle, *Physical association between CD155 and CD44 in human monocytes*. Mol. Immunol., 1997. **34**(18): p. 1247-1257.
76. Miyake, K. and P.W. Kincade, *A new cell adhesion mechanism involving hyaluronate and CD44*. Current Topics in Microbiology & Immunology, 1990. **166**: p. 87-90.
77. Khaldoyanidi, S., A. Denzel, and M. Zoller, *Requirement for CD44 in proliferation and homing of hematopoietic precursor cells*. Journal of Leukocyte Biology, 1996. **60**(5): p. 579-92.
78. Ikeda, W., et al., *Nectin-like molecule-5/Tage4 enhances cell migration in an integrin-dependent, Nectin-3-independent manner*. J Biol Chem, 2004. **279**(17): p. 18015-25.
79. Minami, Y., et al., *Necl-5/poliovirus receptor interacts in cis with integrin alphaVbeta3 and regulates its clustering and focal complex formation*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(25): p. 18481-96.
80. Ohka, S., et al., *Basolateral Sorting of Human Poliovirus Receptor alpha Involves an Interaction with the &mgr;1B Subunit of the Clathrin Adaptor Complex in Polarized Epithelial Cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **287**(4): p. 941-8.
81. Ohka, S., et al., *Receptor (CD155)-dependent endocytosis of poliovirus and retrograde axonal transport of the endosome*. J Virol, 2004. **78**(13): p. 7186-98.
82. Kaverina, I., O. Krylyshkina, and J.V. Small, *Regulation of substrate adhesion dynamics during cell motility*. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2002. **34**(7): p. 746-61.

83. Sato, T., et al., *Common signaling pathway is used by the trans-interaction of Necl-5/Tage4/PVR/CD155 and nectin, and of nectin and nectin during the formation of cell-cell adhesion.* *Cancer Sci*, 2005. **96**(9): p. 578-89.
84. Tahara-Hanaoka, S., et al., *Identification and characterization of murine DNAM-1 (CD226) and its poliovirus receptor family ligands.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **329**(3): p. 996-1000.
85. Tahara-Hanaoka, S., et al., *Tumor rejection by the poliovirus receptor family ligands of the DNAM-1 (CD226) receptor.* *Blood*, 2006. **107**(4): p. 1491-6.
86. Maier, M.K., et al., *The adhesion receptor CD155 determines the magnitude of humoral immune responses against orally ingested antigens.* *Eur J Immunol*, 2007. **37**(8): p. 2214-2225.
87. Selinka, H.C., A. Zibert, and E. Wimmer, *Poliovirus can enter and infect mammalian cells by way of an intercellular adhesion molecule 1 pathway.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991. **88**(9): p. 3598-3602.
88. Yasumi, M., et al., *Role of each immunoglobulin-like loop of nectin for its cell-cell adhesion activity.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **302**(1): p. 61-6.
89. Gu, L., S.C. Tseng, and B.J. Rollins, *Monocyte chemoattractant protein-1.* *Chemical Immunology*, 1999. **72**: p. 7-29.
90. Lagasse, E. and I.L. Weissman, *Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes.* *Journal of Immunological Methods*, 1996. **197**(1-2): p. 139-50.
91. Pabst, O., et al., *Enhanced FTY720-mediated lymphocyte homing requires G alpha i signaling and depends on beta 2 and beta 7 integrin.* *J Immunol*, 2006. **176**(3): p. 1474-80.
92. Srikrishna, G., et al., *A novel anionic modification of N-glycans on mammalian endothelial cells is recognized by activated neutrophils and modulates acute inflammatory responses.* *J Immunol*, 2001. **166**(1): p. 624-32.
93. Shibuya, K., et al., *Comment on "CD226 is specifically expressed on the surface of Th1 cells and regulates their expansion and effector functions".[comment].* *Journal of Immunology*, 2006. **176**(7): p. 3855; author reply 3856.
94. Freistadt, M.S., H.B. Fleit, and E. Wimmer, *Poliovirus receptor on human blood cells: a possible extraneural site of poliovirus replication.* *Virology*, 1993. **195**(2): p. 798-803.
95. Ziegler-Heitbrock, H.W., *Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14+ CD16+ subpopulation.* *Immunology Today*, 1996. **17**(9): p. 424-8.
96. Weber, C., et al., *Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations.* *Journal of Leukocyte Biology*, 2000. **67**(5): p. 699-704.
97. Boring, L., et al., *Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice.* *Journal of Clinical Investigation*, 1997. **100**(10): p. 2552-61.
98. Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman, *Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties.* *Immunity*, 2003. **19**(1): p. 71-82.
99. Ida-Hosonuma, M., et al., *Host range of poliovirus is restricted to simians because of a rapid sequence change of the poliovirus receptor gene during evolution.* *Arch Virol*, 2003. **148**(1): p. 29-44.
100. Shibuya, A., S. Tahara-Hanaoka, and K. Shibuya, *DNAM-1 (CD226): A Two-Sword Fencer for Innate and Adaptive Immunity.* *Curr. Med. Chem.*, 2005. **4**: p. 53-58.
101. Koike, S., I. Ise, and A. Nomoto, *Functional domains of the poliovirus receptor.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991. **88**(10): p. 4104-4108.

102. Berlin-Rufenach, C., et al., *Lymphocyte migration in lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1-deficient mice*. Journal of Experimental Medicine, 1999. **189**(9): p. 1467-78.
103. Trinchieri, G., *Biology of natural killer cells*. Advances in Immunology, 1989. **47**: p. 187-376.
104. Weerasinghe, D., et al., *A role for the alphavbeta3 integrin in the transmigration of monocytes*. J Cell Biol, 1998. **142**(2): p. 595-607.
105. Goodridge, H.S., R.M. Simmons, and D.M. Underhill, *Dectin-1 stimulation by Candida albicans yeast or zymosan triggers NFAT activation in macrophages and dendritic cells*. Journal of Immunology, 2007. **178**(5): p. 3107-15.
106. Mullaly, S.C. and P. Kubes, *Mast cell-expressed complement receptor, not TLR2, is the main detector of zymosan in peritonitis*. European Journal of Immunology, 2007. **37**(1): p. 224-34.
107. Aydar, Y., et al., *The influence of immune complex-bearing follicular dendritic cells on the IgM response, Ig class switching, and production of high affinity IgG*. Journal of Immunology, 2005. **174**(9): p. 5358-66.
108. Solecki, D.J., et al., *Expression of the human poliovirus receptor/CD155 gene is activated by sonic hedgehog*. J Biol Chem, 2002. **277**(28): p. 25697-702.
109. Sacedon, R., et al., *Sonic hedgehog is produced by follicular dendritic cells and protects germinal center B cells from apoptosis*. Journal of Immunology, 2005. **174**(3): p. 1456-61.
110. Worbs, T., et al., *Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells*. J Exp Med, 2006. **203**(3): p. 519-27.
111. Shreedhar, V.K., B.L. Kelsall, and M.R. Neutra, *Cholera toxin induces migration of dendritic cells from the subepithelial dome region to T- and B-cell areas of Peyer's patches*. Infection & Immunity, 2003. **71**(1): p. 504-9.
112. Yamamoto, M., et al., *Alternate mucosal immune system: organized Peyer's patches are not required for IgA responses in the gastrointestinal tract*. Journal of Immunology, 2000. **164**(10): p. 5184-91.
113. Rosner, A.J. and D.F. Keren, *Demonstration of M cells in the specialized follicle-associated epithelium overlying isolated lymphoid follicles in the gut*. Journal of Leukocyte Biology, 1984. **35**(4): p. 397-404.
114. Rescigno, M., et al., *Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria.[see comment]*. Nature Immunology, 2001. **2**(4): p. 361-7.
115. Hardtke, S., L. Ohl, and R. Forster, *Balanced expression of CXCR5 and CCR7 on follicular T helper cells determines their transient positioning to lymph node follicles and is essential for efficient B-cell help*. Blood, 2005. **106**(6): p. 1924-31.
116. Junt, T., et al., *CXCR5-dependent seeding of follicular niches by B and Th cells augments antiviral B cell responses*. Journal of Immunology, 2005. **175**(11): p. 7109-16.
117. Breitfeld, D., et al., *Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production.[see comment]*. Journal of Experimental Medicine, 2000. **192**(11): p. 1545-52.

7. Anhang

Publikationsliste

Heuer, H; Maier, MK; Iden, S; Mittag, J; Friesema, EC; Visser, TJ; Bauer, K;
The monocarboxylate transporter 8 linked to human psychomotor retardation
is highly expressed in thyroid hormone-sensitive neuron populations.
Endocrinology, 2005

Teile dieser Arbeit sind in die folgende Publikation eingegangen:

Maier^{*}, MK; Seth^{*}, S; Czeloth, N; Qiu, Q; Ravens, I; Kremmer, E; Ebel, M; Müller,
W; Pabst, O; Förster, R; Bernhardt, G; The adhesion receptor CD155 determines the
magnitude of humoral immune responses against orally ingested antigens.
European Journal of Immunology, 2007

Eingereichte Manuskripte

Seth^{*}, S; Maier^{*}, MK; Qiu, Q; Ravens, I; Kremmer, E; Förster, R; Bernhardt, G;
Murine CD96 interacts with CD155 and nectin-1.
Biochemical and Biophysical Research Communications

* Beide Autoren haben gleich viel beigetragen

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Prof. Dr. Reinhold Förster dafür danken, dass er mir die Anfertigung dieser Dissertation in seiner Arbeitsgruppe ermöglicht hat. Sowohl die hervorragende technische Ausstattung des Instituts als auch die regelmäßige Diskussion der Ergebnisse waren bei der Entstehung dieser Arbeit außerordentlich hilfreich.

Besonderer Dank geht an Dr. Günter Bernhardt, der die direkte Betreuung der Arbeit übernommen hat und der jederzeit mit einer Vielzahl an Ideen während der teils überraschenden Entwicklung dieses Projekts zur Seite stand.

Weiterhin danke ich herzlich Prof. Dr. Walter Müller für die Übernahme des Referats zu dieser Arbeit.

Viele Teile dieser Dissertation wurden erst durch die Kooperationen mit externen Partnern ermöglicht. Besonderer Dank geht in diesem Rahmen an Prof. Dr. Werner Müller (Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig), der bei der Generierung der CD155-defizienten Mäuse behilflich war. Darüber hinaus bedanke ich mich bei Dr. Elisabeth Kremmer (GSF, München) für die Unterstützung bei der Herstellung monoklonaler Antikörper. Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Dr. Matthias Mack, dessen anti-CCR2- und anti-CCR5-Antikörper bei der Identifikation muriner Monozyten-Subpopulationen halfen.

Ein großes Dankeschön geht an alle Mitarbeiter des Instituts für Immunologie. Die Auflistung all derer, die mich bei diesem Projekt unterstützt haben würde den hier gegebenen Rahmen bei Weitem überschreiten. Aus diesem Grund möchte ich mich an dieser Stelle auf den besonders herzlichen Dank bei Sebastian Seth beschränken, der mir nicht nur bei technischen und wissenschaftlichen Problemen sondern auch als Freund stets zur Seite stand.

Außerdem gilt mein Dank Elke Blissenbach, die nicht nur mit ihrem unendlichen Einsatz bei allen offiziellen Angelegenheiten, sondern auch mit ihrer stets guten Laune eine echte Bereicherung der letzten Jahre darstellte.

Für das zusätzliche kritische Korrekturlesen dieser Arbeit (oder Teilen davon) danke ich Sebastian Seth, Simon Berberich, Eva Maria Amen, Niklas Czeloth und Wolfgang Kuhn.

Der größte Dank gebührt meinen Eltern, die mich in jeglicher Hinsicht immer unterstützt haben und ohne deren Zutun dieser Abschluss nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

Name	Michael Klaus Maier
Geburtstag	15.12.1977
Geburtsort	Wertheim
Nationalität	deutsch

Schulbildung

1984 bis 1988	Grundschule Wertheim
1988 bis 1997	Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium Wertheim
Juli 1997	Abschluss: Abitur

Zivildienst

1997 bis 1998	Zivildienst als Rettungshelfer beim DRK Wertheim
---------------	--

Universitäre Ausbildung

1998 bis 2000	Biochemie-Grundstudium an der Ruhr-Universität-Bochum
2000 bis 2003	Biochemie-Hauptstudium an der Leibniz-Universität Hannover
ab April 2003	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für experimentelle Endokrinologie Hannover
Nov. 2003	Abschluss: Diplom
seit Feb. 2004	Doktorarbeit am Institut für Immunologie in der AG Prof. Förster

Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation

selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den

(Unterschrift)

Name: Michael Klaus Maier