

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

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

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

Die immunregulatorischen Trigger-Rezeptoren auf myeloiden Zellen
(TREM) beim Haushuhn

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

von
Matthias Hanczaruk
aus Passau

München 2008

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Göbel

Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. Matis
Univ.-Prof. Dr. Wolf
Univ.-Prof. Dr. Ammer
Univ.-Prof. Dr. Zerbe

Tag der Promotion: 18. Juli 2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	15
2	Literaturübersicht	16
2.1	Allgemeine Charakteristika der Ig-ähnlichen Rezeptoren	16
2.1.1	Extrazytoplasmatischer Bereich	16
2.1.2	Transmembraner und zytoplasmatischer Bereich mit Signaltransduktion.....	17
2.1.2.1	Inhibitorische Rezeptoren	17
2.1.2.2	Aktivierende Rezeptoren.....	17
2.2	TREM beim Säuger.....	18
2.2.1	Die TREM-Rezeptor-Familie.....	18
2.2.1.1	Allgemeine strukturelle Merkmale und Nomenklatur	19
2.2.1.2	Chromosomale Lokalisation	19
2.2.2	TREM-1	20
2.2.2.1	Struktur und Expression	20
2.2.2.2	Funktion	21
2.2.2.3	Klinische Relevanz.....	22
2.2.2.4	Ligand.....	23
2.2.2.5	TREM-1 bei anderen Spezies.....	24
2.2.2.5.1	Schwein	24
2.2.2.5.2	Rind	24
2.2.3	TREM-2	24
2.2.3.1	Struktur und Expression	24
2.2.3.2	Funktion	25
2.2.3.3	TREM-2 und Nasu-Hakola-Erkrankung	26
2.2.3.4	Ligand.....	27
2.2.4	TREM-3	28
2.2.5	TLT-1	28
2.2.5.1	Struktur und Expression	28
2.2.5.2	Funktion	28
2.2.6	TLT-2	29
2.2.6.1	Struktur und Expression	29
2.2.6.2	Funktion	29
2.2.7	TRAPC	29

2.2.7.1	Struktur und Expression	29
2.2.7.2	Funktion	30
2.2.7.3	Ligand.....	30
2.3	TREM beim Huhn.....	30
2.3.1	Chromosomale Lokalisation	30
2.3.2	Nomenklatur	32
2.3.3	Struktur.....	32
2.3.4	Phylogenetische Aspekte.....	33
3	Zielsetzung	34
4	Material und Methoden	35
4.1	Tiere und Tierhaltung.....	35
4.1.1	Hühner.....	35
4.1.2	Mäuse	35
4.1.3	Kaninchen.....	35
4.2	Präparation primärer Hühnerleukozyten.....	36
4.2.1	Material	36
4.2.2	Durchführung	36
4.3	Kultivierung von Zellen	37
4.3.1	Zellkulturmedien und Stammlösungen	37
4.3.2	Präparation von Thrombozyten und Makrophagen.....	40
4.3.3	Stimulation primärer Leukozyten.....	40
4.3.3.1	Stimulation von Makrophagen mit LPS und IFN γ	40
4.3.3.2	Stimulation von Leukozyten mit PMA/Calonophor und ConA.....	40
4.3.4	Zelllinien	41
4.3.5	Einfrieren von Zellen	41
4.3.6	Auftauen von Zellen.....	42
4.3.7	Passagieren von Zellen.....	42
4.4	RNA-Präparation.....	42
4.4.1	Material	42
4.4.2	Durchführung	43
4.5	cDNA-Synthese mittels reverser Transkription	43
4.6	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	44
4.6.1	Material	44
4.6.2	Durchführung	45

4.7	Real-time quantitative PCR (qPCR)	46
4.7.1	Primer für die qPCR	46
4.7.1.1	Primerdesign	46
4.7.1.2	Etablierung der Primer für die qPCR	46
4.7.1.3	Bestimmung der Effizienz der Primerpaare	48
4.7.2	Durchführung der qPCR	49
4.7.2.1	Material	49
4.7.2.2	Durchführung	50
4.7.3	Auswertung	50
4.8	Agarosegelelektrophorese	51
4.8.1	Material	51
4.8.2	Durchführung	52
4.9	Restriktionsenzymverdau und Gelaufreinigung	53
4.9.1	Material	53
4.9.2	Durchführung	53
4.10	Ligation in Vektoren	53
4.10.1	Vektoren	53
4.10.1.1	FLAG- bzw. V5-Konstrukte	54
4.10.1.2	FLAG-zeta-Konstrukte für BWZ.36-Zellen	55
4.10.1.3	COMP-FLAG-Konstrukte für 293-Zellen	56
4.10.2	Material	57
4.11	Durchführung	57
4.12	Transformation von chemokompetenten TOP 10 E. coli und Plasmidaufreinigung	57
4.12.1	Material	57
4.12.2	Durchführung	58
4.13	DNA-Sequenzierung	58
4.14	Transfektion eukaryotischer Zellen	58
4.14.1	Transfektion von 293T- und 293-Zellen	59
4.14.1.1	Material	59
4.14.1.2	Durchführung	59
4.14.2	Stabile Transfektion von 2D8-Zellen	60
4.14.2.1	Material	60
4.14.2.2	Durchführung	60
4.14.3	Stabile Transfektion von BWZ.36-Zellen	60

4.14.3.1	Material	60
4.14.3.2	Durchführung	61
4.15	BWZ-Reporterassay	61
4.15.1	Material	61
4.15.2	Durchführung	62
4.16	Affinitätschromatographie	63
4.16.1	Aufreinigung von TREM-A1-huIg	63
4.16.1.1	Material	63
4.16.1.2	Durchführung	64
4.16.2	Aufreinigung von TREM-A1-COMP-FLAG	65
4.16.2.1	Material	65
4.16.2.2	Durchführung	66
4.17	Herstellung polyklonaler Antiseren	67
4.17.1	Material	67
4.17.2	Durchführung	67
4.18	Herstellung monoklonaler Antikörper	68
4.18.1	Immunisierung	68
4.18.2	Fusion	68
4.18.2.1	Material	69
4.18.2.2	Durchführung	69
4.18.3	Selektion auf bestimmte Hybridome (Screening)	69
4.18.4	Isotypenbestimmung	70
4.19	ELISA	70
4.19.1	Material	70
4.19.2	Durchführung	72
4.19.3	ELISA mit dem Kaninchenserum	72
4.19.4	ELISA zur Selektion bestimmter Hybridome	73
4.19.5	ELISA zum Nachweis von COMP-FLAG-Konstrukten	73
4.20	Durchflusszytometrie	73
4.20.1	Material	74
4.20.2	Durchführung	75
4.21	Zelllyse	75
4.21.1	Material	75
4.21.2	Durchführung	76

4.22	Immunpräzipitation	76
4.22.1	Material	77
4.22.2	Durchführung	77
4.23	Deglykosilierung von Proteinen.....	78
4.23.1	Material	78
4.23.2	Durchführung	78
4.24	Western Blot.....	79
4.24.1	SDS-PAGE.....	79
4.24.1.1	Material	79
4.24.1.2	Durchführung	81
4.24.2	Transfer der Proteine auf Nitrozellulose (Semi-Dry-Elektroblotting)	81
4.24.2.1	Material	81
4.24.2.2	Durchführung	82
4.24.3	Proteindetektion durch spezifische Antikörper	82
4.24.3.1	Material	82
4.24.3.2	Durchführung	84
4.25	Pervanadatbehandlung stabil transfizierter 2D8-Zellen.....	84
4.25.1	Material	84
4.25.2	Durchführung	85
4.26	Computerprogramme zur Auswertung von Sequenzen	86
4.26.1	Lasergene 7 Software	86
4.26.2	New GENSCAN	86
4.26.3	Simple Modular Architecture Research Tool (SMART)	86
4.26.4	Primer Express® 3.0	86
4.26.5	NCBI Nucleotide Blast.....	86
5	Ergebnisse	87
5.1	Identifizierung zusätzlicher TREMs beim Huhn	87
5.1.1	BAC (Bacterial Artificial Chromosome)-Analyse	87
5.1.2	Klonierung einer neuen Variante von TREM-B2	87
5.1.3	Zusammenfassung aller TREMs beim Huhn	89
5.2	Analyse des Expressionsmusters mit Hilfe der Real-time quantitativen PCR.....	91
5.2.1	Gewebeverteilung von TREM-A1	92
5.2.2	Gewebeverteilung der Ig-Domäne von TREM-A1	92
5.2.3	Gewebeverteilung von TREM-B1	94

5.2.4	Gewebeverteilung von TREM-B2	95
5.2.5	Expression der TREMs auf stimulierten Makrophagen.....	95
5.3	Analyse des Expressionsmusters von TREM-A1 mit Hilfe der Durchflusszytometrie	96
5.3.1	Herstellung eines spezifischen mAk gegen TREM-A1	96
5.3.2	Immunphänotypisierungen mit dem spezifischen mAk gegen TREM-A1	97
5.3.2.1	Einfachfärbungen	97
5.3.2.2	Doppelfärbungen.....	98
5.4	Biochemische Analyse von TREM-A1 und TREM-B1.....	101
5.4.1	Western Blot Analyse von TREM-A1	101
5.4.2	Western Blot Analyse von TREM-B1	102
5.5	Nachweis von phosphorylierten ITIMs und SHP-1 und -2.....	103
5.6	Ligandensuche mit Hilfe des BWZ.36-Reporterassays	103
5.6.1	Ligand für TREM-A1	104
5.6.2	Ligand für TREM-B1	104
5.7	Herstellung eines polyklonalen Kaninchenserums gegen TREM-A1	105
5.8	Herstellung des TREM-A1-COMP-FLAG-Konstruktes	107
5.8.1	Nachweis des TREM-A1-COMP-FLAG-Konstruktes	107
5.8.2	Nachweis der Pentamerstruktur im Western Blot.....	108
5.8.3	Nachweis der Bindung von TREM-A1-COMP-FLAG an seinen Liganden .	109
6	Diskussion	111
6.1	Eingehende Charakterisierung von TREM-A1	111
6.1.1	Struktur und biochemische Analyse.....	111
6.1.2	Gewebeverteilung.....	111
6.1.3	Splice-Variante.....	113
6.1.4	Ligand.....	113
6.2	Eingehende Charakterisierung von TREM-B1	114
6.2.1	Struktur und biochemische Analyse.....	114
6.2.2	Gewebeverteilung.....	114
6.2.3	Signaltransduktion.....	115
6.2.4	Ligand.....	115
6.3	Charakterisierung von TREM-B2	116
6.3.1	Struktur.....	116
6.3.2	Gewebeverteilung.....	116

6.4	Weiterführende Untersuchungen	117
6.4.1	Nachweis des Adaptormoleküls von TREM-A1	117
6.4.2	Etablierung eines Tests für sTREM-A1	117
6.4.3	Expression einer löslichen Variante von TREM-B1	117
6.4.4	Identifizierung des Liganden von TREM-A1	118
7	Zusammenfassung	119
8	Summary	121
9	Literaturverzeichnis	123

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Position der Gene im TREM-Cluster.....	20
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Gene im TREM-Cluster	30
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Lage der verschiedenen TREM-Gene auf Chromsom 26 des Huhnes.....	31
Abbildung 4: Darstellung der Exon/Intron Struktur der Mitglieder der TREMs beim Huhn..	31
Abbildung 5: Schematische Zusammenstellung der Mitglieder der TREMs	32
Abbildung 6: Phylogenetischer Vergleich der TREMs von Huhn und Mensch	31
Abbildung 7: Beispiel für eine Standardkurve.....	47
Abbildung 8: Schmelzkurvenanalyse des PCR-Produktes aus Abbildung 7.....	47
Abbildung 9: Ermittlung der Effizienz eines Primerpaares.....	48
Abbildung 10: Modifizierter pcDNA3.4/V5-His©TOPO® Vektor	54
Abbildung 11: Modifizierter pcDNA3.4/V5-His©TOPO® Vektor	55
Abbildung 12: Modifizierter pCR TM 3 Vektor.....	56
Abbildung 13: Darstellung der AS-Sequenz von TREM-B2v3.....	88
Abbildung 14: DNA-Karte von TREM-A1	89
Abbildung 15: DNA-Karte von TREM-B1.....	90
Abbildung 16: Lage der Primer für die qPCR.....	91
Abbildung 17: Gewebeverteilung der mRNA von membranständigem TREM-A1	92
Abbildung 18: Gewebeverteilung der mRNA von membranständigem TREM-A1 verglichen mit der mRNA der Ig-Domäne von TREM-A1	93
Abbildung 19: Gewebeverteilung der mRNA von membranständigem TREM-A1 verglichen mit der mRNA der Ig-Domäne von TREM-A1	93
Abbildung 20: Gewebeverteilung der mRNA von TREM-B1.....	94
Abbildung 21: Gewebeverteilung der mRNA von TREM-B1.....	94
Abbildung 22: Gewebeverteilung der mRNA aller Varianten von TREM-B2.....	95
Abbildung 23: Darstellung der mRNA-Expression von TREM-A1, TREM-B1 und TREM-B2 nach Stimulation.....	96
Abbildung 24: Immunphänotypisierungen, die zur Herstellung des mAk 14C9 durchgeführt wurden.....	97
Abbildung 25: Darstellung der in der Durchflusszytometrie mit Anti-TREM-A1 (14C9) getesteten primären Zellen.....	98

Abbildung 26: Darstellung der Doppelfärbungen mit Anti-TREM-A1 (14C9) 99

Abbildung 27: Doppelfärbung mit Anti-TREM-A1 (14C9)..... 100

Abbildung 28: Western Blot von transient mit dem TREM-A1-V5-Konstrukt transfizierten
293T-Zellen..... 101

Abbildung 29: Western Blot von stabil mit dem TREM-B1-FLAG-Konstrukt transfizierten
2D8-Zellen. 102

Abbildung 30: Western Blot von stabil mit dem TREM-B1-FLAG-Konstrukt transfizierten
2D8-Zellen, die unterschiedlich lange mit Pervanadat behandelt wurden.... 103

Abbildung 31: Darstellung der β -Galaktosidase-Expression nach Kreuzvernetzung von
TREM-A1-FLAG auf BWZ.36-Zellen 104

Abbildung 32: Darstellung der β -Galaktosidase-Expression nach Kreuzvernetzung von
TREM-B1-FLAG auf BWZ.36-Zellen 105

Abbildung 33: ELISA zum Nachweis der Spezifität des Kaninchenserums mit TREM-A1-
huIg..... 106

Abbildung 34: ELISA zum Nachweis der Spezifität des Kaninchenserums mit TREM-A1-
spezifischem Peptid..... 106

Abbildung 35: ELISA zum Nachweis des aufgereinigten TREM-A1-COMP-FLAG-
Konstruktes..... 107

Abbildung 36: ELISA zum Nachweis der Konformation des aufgereinigten TREM-A1-
COMP-FLAG-Konstruktes. 108

Abbildung 37: Im Western Blot aufgetragenes aufgereinigtes pentameres
TREM-A1-COMP-FLAG. 109

Abbildung 38: Darstellung der Färbungen von Milzleukozyten mit TREM-A1-COMP-FLAG
..... 110

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beschreibung der verwendeten Zelllinien.....	41
Tabelle 2: Aufstellung der in der PCR verwendeten Primer.....	45
Tabelle 3: Aufstellung der in der qPCR verwendeten Primer.....	49
Tabelle 4: Auflistung der für die Herstellung der V5- bzw. FLAG-markierten Konstrukte verwendeten Primerkombinationen und Restriktionsenzyme.....	54
Tabelle 5: Auflistung der für die Herstellung der FLAG-zeta-Konstrukte verwendeten Primerkombinationen und Restriktionsenzyme.	55
Tabelle 6: Auflistung der für die Herstellung der COMP-FLAG-Konstrukte verwendeten Primerkombinationen und Restriktionsenzyme.	56

Abkürzungsverzeichnis

APEC	Avian Pathogenic Escherichia Coli
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
AS	Aminosäure
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA (engl. complementary DNA)
COMP	oligomeres Protein der Knorpelmatrix (engl. Cartilage Oligomeric Matrix protein)
ConA	Concanavalin A
CPRG	Chlorophenolrot- β -D-Galactopyranosid
Ct	Cycle threshold
DAP12	DNAX Aktivierungsprotein mit einer Größe von 12 kDa (engl. DNAX Activation Protein of 12 kDa)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. Desoxyribonucleic Acid)
DTT	Dithiothreitol
E	Effizienz
EDTA	Ethylendiamintetraacetic Acid
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FACScan	Fluorescence-Activated-Cell-Scanner
Fc α R	Fc α Rezeptor
FCA	Freund'sches komplettes Adjuvanz
FCS	Fetales Kälberserum (engl. Fetal Calf Serum)
FIA	Freund'sches inkomplettes Adjuvanz
FITC	Fluorescein-Iso-Thiocyanat
FSC	Forward scatter
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/sec. ²)
HRP	Meerrettisch-Peroxidase (engl. Horse Radish Peroxidase)
huIg	CH ₂ und CH ₃ -Domäne des humanen Ig-Moleküls
IFN γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IL-6	Interleukin 6
ITAM	Immunrezeptor Tyrosin-basierendes aktivierendes Motiv
ITIM	Immunrezeptor Tyrosin-basierendes inhibitorisches Motiv
LB	Luria Broth
LPS	Lipopolysaccharid
mAk	monoklonaler Antikörper

min.	Minute
M _R	Relatives Molekulargewicht
mRNA	messenger RNA
siRNA	small interfering RNA
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBMC	Periphere mononukleäre Zellen des Blutes (engl. Peripheral Blood Mononuclear Cells)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (engl. Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polymerase Ketten Reaktion (engl. Polymerase Chain Reaction)
PE	Phycoerythrin
PMA	Phorbol-12-myristat-13-Acetat
POD	Meerrettich-Peroxidase
qPCR	Real-time quantitative PCR
RNA	Ribonucleinsäure (engl. Ribonucleid Acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rounds per minute)
RPMI	Rosewell Park Memorial Insitute
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. Sodium Dodecyl Sulfate)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec.	Sekunde
SHP	Src-homolgy-2-containing-Protein-Tyrosin-Phosphatase
SSC	Sideward scatter
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TLT	TREM-Like-Transcript
TMB	Tetramethylbenzidin
TRAPC	Triggering Receptors Expressed on Antigen Presenting Cells
TREM	Triggering Receptors Expressed on Myeloid Cells
18S rRNA	18S ribosomale RNA

In den Abbildungen wurde der Buchstabencode für Aminosäuren verwendet.

1 Einleitung

Biologische Systeme werden meist durch die Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts aus stimulierenden und hemmenden Signalen stabilisiert. Wird dieses Gleichgewicht auf eine Seite hin verschoben, kommt es entweder zur Aktivierung des Systems oder zu einer Hemmung. Dabei wirken fast immer positive und negative Feedbackmechanismen gemeinsam. Das Immunsystem stellt ein solches biologisches System dar, in welchem es eine Vielzahl an aktivierenden und inhibitorischen, membranständigen Rezeptoren und löslichen Zytokinen gibt.

Rezeptoren auf der Oberfläche von Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der Übertragung von Signalen vom extrazellulären Raum ins Zellinnere. Dabei wurden in den vergangenen Jahrzehnten vornehmlich die aktivierenden Rezeptoren des Immunsystems erforscht, während die Bedeutung der inhibitorischen Rezeptoren erst in den letzten Jahren genauer untersucht wurde. Durch den Verlust von aktivierenden Signalen kann der Organismus auf Pathogene nicht mehr oder nur unzureichend reagieren, der Verlust von inhibitorischen Signalen dagegen kann zu chronischen Entzündungen oder sogar zu Autoimmunerkrankungen führen.

Bevor in Folge einer Infektion das adaptive Immunsystem spezifische T- und B-Zellen entwickelt, versuchen die Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Makrophagen und NK-Zellen, durch Elimination der Pathogene den Schaden für den Organismus so gering wie möglich zu halten. Dafür besitzen diese Zellen Rezeptoren, die bestimmte Strukturen der pathogenen Erreger erkennen, wie Toll-like-Rezeptoren und Mannose-Rezeptoren, und Rezeptoren, die über das Komplementsystem aktiviert werden. Mit Hilfe solcher Rezeptoren können die Pathogene aufgenommen und zerstört werden. Die Zellen des angeborenen Immunsystems besitzen aber auch aktivierende und hemmende Rezeptoren, die in der letzten Zeit genauer charakterisiert wurden. Diese Rezeptoren lassen sich grob in zwei Gruppen einteilen: Zum einen handelt es sich dabei um die Gruppe der C-Typ Lektine, zum anderen um Rezeptoren, die Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie sind. Während von einigen Mitgliedern dieser Familien die Funktion mittlerweile bekannt ist, müssen bei der überwiegenden Zahl dieser Rezeptoren die genaue Expression, die potentiellen Liganden und letztlich die Funktion erst noch untersucht werden.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollen nun die Mitglieder eine Rezeptor-Familie aus der Immunglobulin-Superfamilie beim Haushuhn, die *Triggering Receptors Expressed on Myeloid Cells* (TREM), genauer charakterisiert werden.

2 Literaturübersicht

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Multigenfamilien charakterisiert, die für das Immunsystem von entscheidender regulatorischer Bedeutung sind. Es handelt sich dabei um Rezeptoren, die auf einem Genabschnitt dicht aneinandergereiht liegen und immunologische Prozesse nach ihrer Stimulation aktivieren oder inhibieren können. Alle Gene dieser Rezeptorfamilien kodieren für Proteine, die als Membranproteine in die Zellmembran eingelagert sind und aus einem extrazytoplasmatischen, einem transmembranen und einem zytoplasmatischen Bereich bestehen. Diese Rezeptoren auf der Oberfläche von Zellen binden mit ihrem extrazytoplasmatischen Bereich Liganden, werden dadurch aktiviert und geben dann über ihren zytoplasmatischen Abschnitt durch biochemische Vorgänge Signale ins Zellinnere weiter, wobei es abhängig von der Art der Signale zur Zellaktivierung oder –inhibition kommt. Während man über die mögliche Funktion aktivierender Rezeptoren noch spekuliert, ist die Funktion inhibitorischer Vertreter *in vivo* größtenteils schon geklärt. Im Folgenden soll nun die Rezeptorfamilie der *Triggering Receptors expressed on Myeloid Cells* (TREM) beschrieben werden, die auf einem gemeinsamen Chromosomenabschnitt lokalisiert ist und zur Immunglobulin (Ig)-Superfamilie gehört, weswegen diese Rezeptoren auch als Ig-ähnliche Rezeptoren bezeichnet werden.

2.1 Allgemeine Charakteristika der Ig-ähnlichen Rezeptoren

Die extrazytoplasmatischen, transmembranen und zytoplasmatischen Bereiche von Ig-ähnlichen Rezeptoren weisen jeweils charakteristische Strukturen auf, die eine weitere Einteilung der Rezeptoren ermöglichen und daher im Folgenden genauer erläutert werden.

2.1.1 Extrazytoplasmatischer Bereich

Die Ig-ähnlichen Rezeptoren sind Typ I transmembrane Proteine, da sich ihr N-Terminus auf der extrazytoplasmatischen Seite befindet, und besitzen als Mitglieder der Ig-Superfamilie eine unterschiedliche Anzahl an Ig-Domänen. Diese bestehen wiederum aus β -Ketten, die durch Disulfidbrücken stabil gehalten werden und so eine β -Faltblattstruktur bilden, und werden je nach Anzahl der β -Ketten, der Aminosäure (AS)-Sequenz, die sie umgibt, und dem Abstand der Cysteine, die die Disulfidbrücken bilden, in Ig-Domänen vom V-, C1- oder C2-Typ eingeteilt [2].

2.1.2 Transmembraner und zytoplasmatischer Bereich mit Signaltransduktion

2.1.2.1 Inhibitorische Rezeptoren

Inhibitorische Rezeptoren zeichnen sich durch eine ungeladene transmembrane Region und durch einen langen zytoplasmatischen Bereich aus, in dem sich eine unterschiedliche Anzahl an sog. ITIMs befindet (Immunrezeptor Tyrosin-basierende inhibitorische Motive). Solche ITIMs bestehen aus einer Konsensussequenz von sechs AS mit folgendem Muster: als erste AS steht entweder Isoleucin, Valin, Leucin oder Serin, darauf folgt eine variable AS, anschließend das für die Signaltransduktion wichtige Tyrosin, dann wieder zwei variable AS und als letztes Valin oder Leucin [3].

Werden inhibitorische Rezeptoren durch die Bindung eines spezifischen Liganden aktiviert, kommt es zur Phosphorylierung der Tyrosinreste in den ITIMs. Durch eine Konformationsänderung des zytoplasmatischen Bereichs werden Protein-Tyrosin-Phosphatasen dorthin rekrutiert, bei denen es sich vor allem um die *Src-homology-2-containing*-Protein-Tyrosin-Phosphatase (SHP)-1 und SHP-2 handelt. Diese dephosphorylieren durch Protein-Tyrosin-Kinasen vermittelte Phosphorylierungen. Normalerweise besteht zwischen der Aktivität der Phosphatasen und der Aktivität der Kinasen ein Gleichgewicht, so dass es nur zu geringgradigen Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen von Tyrosinresten kommt. Werden aktivierende Rezeptoren stimuliert, überwiegen die durch Kinasen vermittelten Phosphorylierungen. Bei Stimulation inhibitorischer Rezeptoren kommt es zu einer Zunahme der Aktivität der Phosphatasen und damit zu starken Dephosphorylierungen dieser Phosphatreste. Da die Signaltransduktion durch die Phosphatasen zu einem relativ frühem Zeitpunkt stattfindet, kommt es weder zur Bildung von Inositol-3-Phosphat noch zur Mobilisierung intrazellulären Kalziums [4].

2.1.2.2 Aktivierende Rezeptoren

Im Gegensatz zu den inhibitorischen Rezeptoren besitzen aktivierende Rezeptoren nur einen sehr kurzen zytoplasmatischen Bereich ohne ein bekanntes Signalmotiv, aber im transmembranen Bereich eine positiv geladene AS, wie zum Beispiel Lysin, so dass es dort zur Assoziation mit einem Adaptormolekül kommen kann, das eine negativ geladene AS im transmembranen Bereich, nur eine sehr kurze extrazytoplasmatische Region, aber im zytoplasmatischen Anteil ein sog. ITAM (Immunrezeptor Tyrosin-basierendes aktivierendes Motiv) besitzt. Ein ITAM besteht aus einer Konsensussequenz von vier AS, welche zweimal

im Abstand von sechs bis acht AS auftritt, und als erste AS Tyrosin besitzt, darauf zwei variable AS und als letzte AS entweder Leucin oder Isoleucin [5].

Je nach Rezeptor werden unterschiedliche Adaptormoleküle assoziiert, die immer als Homodimere exprimiert werden und bei denen es sich um das *DNAX Activation Protein of 12 kDa* (DAP12), FcεRIγ oder CD3ζ handelt. Zur vollständigen Aktivierung der folgenden Signalkaskade nach Bindung eines Liganden an einen aktivierenden Rezeptor müssen beide Tyrosinreste im ITAM des Adaptormoleküls phosphoryliert werden [6]. Daraufhin werden Syk und ZAP-70 zur Plasmamembran rekrutiert, was zur Aktivierung weiterer Signaltransduktionsmoleküle führt. Durch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1, NFκB und NFAT kommt es schließlich abhängig vom Zelltyp zur Sekretion von Zytokinen, zur Hoch- oder Niederregulation von Oberflächenmolekülen und zur Freisetzung von Granulas. Zusätzlich kommt es zur Aktivierung der Protein-Kinase B, der Protein-Kinase θ und der Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen, zum Rearrangement des Zytoskeletts und zur Freisetzung intrazellulären Kalziums [4].

2.2 TREM beim Säuger

Viele Zellen des angeborenen Immunsystems exprimieren ein oder mehrere Mitglieder von Rezeptor-Gruppen aus der Ig-Superfamilie. Diese werden aufgrund von Ähnlichkeiten in der Gen- und Protein-Organisation und aufgrund ihrer genomischen Lokalisation auf den sythenischen Loci bei Mensch und Maus zu einer Multigen-Familie zusammengefasst. Eine dieser Familien ist die TREM-Rezeptor-Familie, die im Folgenden genauer charakterisiert werden soll.

Die meisten Daten wurden bisher über die TREM-Rezeptor-Familie von Mensch und Maus veröffentlicht. Über die TREMs bei anderen Säugetieren ist relativ wenig bekannt.

2.2.1 Die TREM-Rezeptor-Familie

Die ersten klonierten Moleküle aus der TREM-Rezeptor-Familie waren TREM-1 und TREM-2 beim Menschen. Diese Rezeptoren wurden aufgrund ihrer hohen Homologie zum *Natural killer protein* NKp44 identifiziert, einem Rezeptor, der nur auf aktivierten NK-Zellen exprimiert wird [7]. Da TREM-1 vor allem auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten / Makrophagen und TREM-2 auf Monozyten / Makrophagen und Dendritischen Zellen (DC) exprimiert wird, wurde für diese Rezeptoren die Bezeichnung TREM – *Triggering Receptors Expressed on Myeloid Cells* eingeführt.

Kurz nach der Entdeckung der TREMs beim Menschen, wurden bei der Maus Homologe zu TREM-1 und TREM-2 identifiziert [8, 9]. Zusätzlich dazu wurde aber noch ein dritter Rezeptor (TREM-3) entdeckt, für den beim Menschen bisher kein Homolog gefunden wurde [10].

Zusätzlich wurden bei Mensch und Maus Rezeptoren gefunden, die als „*TREM-Like Transcripts*“ (TLT) bezeichnet wurden, von denen TLT-1 und TLT-2 am besten charakterisiert sind, während von den potentiellen Genen für TLT-3 und TLT-4 nicht bekannt ist, ob sie für funktionelle Proteine kodieren [11, 12].

2.2.1.1 Allgemeine strukturelle Merkmale und Nomenklatur

Die TLT unterscheiden sich strukturell von TREM-1 und TREM-2 insofern, als letztere die Merkmale aktivierender Ig-ähnlicher-Rezeptoren aufweisen, wie den kurzen zytoplasmatischen Anteil und die positiv geladene transmembrane Region. Mit dieser assoziiert die negativ geladene transmembrane Region des Adaptormoleküls DAP12, über das die Signaltransduktion vermittelt wird. Die TLT besitzen dagegen eine ungeladene transmembrane Region und einen langen zytoplasmatischen Abschnitt mit ITIMs und sind damit potentiell hemmende Rezeptoren.

Alle TREM-Rezeptoren besitzen eine Ig-Domäne vom V-Typ mit der Konsensussequenz Asp-X-Gly-X-Tyr-X-Cys. Diese Ig-Domäne vom V-Typ konnte für TREM-1 und TLT-1 in einer Kristallstrukturanalyse nachgewiesen werden. Somit ist es denkbar, dass der Ligand von TREM-1 und TLT-1 an den drei CDR (*complementarity determining region*)-äquivalenten Bereichen der V-Typ-Ig-Domäne bindet [13-15].

2.2.1.2 Chromosomale Lokalisation

Die TREM-Gene sind in einem Cluster auf Chromosom 6p21.1 beim Menschen und auf Chromosom 17C3 bei der Maus lokalisiert [10, 16] und werden deshalb zu einer Multigen-Familie zusammengefasst. In Abbildung 1 ist die Position der Gene im TREM-Cluster von Mensch und Maus schematisch dargestellt. Von den verschiedenen Mitgliedern dieser Familie wurden bisher vor allem TREM-1, TREM-2, TLT-1 und TLT-2 genauer charakterisiert.

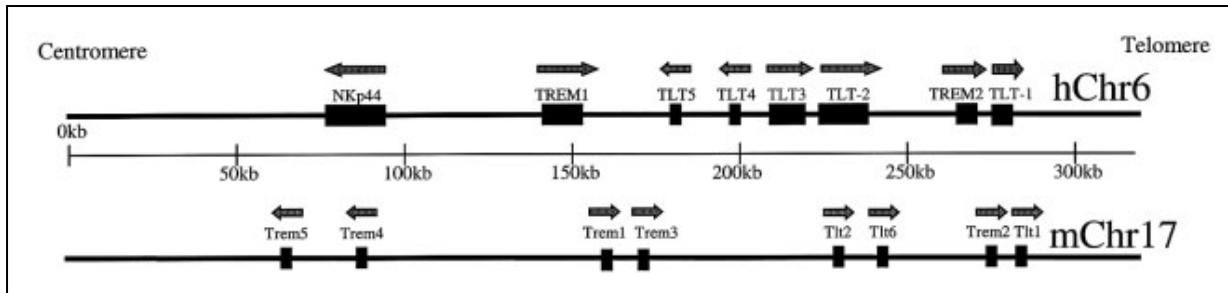


Abbildung 1: Position der Gene im TREM-Cluster auf dem humanen Chromosom 6p21.1 verglichen mit dem TREM-Cluster auf Chromosom 17C3 der Maus. Die Abbildung wurde aus Allcock et al. [16] entnommen.

Im Nachfolgenden sollen die Struktur, Expression und Funktion der TREMs bei Mensch und Maus näher erläutert und ihre Liganden diskutiert werden.

2.2.2 TREM-1

2.2.2.1 Struktur und Expression

TREM-1 ist ein Rezeptor mit einer Ig-Domäne vom V-Typ und den Charakteristika eines aktivierenden Rezeptors, wie ein kurzer zytoplasmatischer Abschnitt und ein positiv geladener transmembraner Bereich, der mit DAP12 als Adaptormolekül interagiert.

TREM-1 wird vor allem auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten / Makrophagen von Mensch und Maus exprimiert.

Die Stimulation von Neutrophilen und Monozyten / Makrophagen mit LPS, Lipoteichonsäure und extrazellulären Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylokokkus aureus* führte zu einer erhöhten Expression von TREM-1 auf der Zelloberfläche, während es bei einer Stimulation mit Bestandteilen von intrazellulären Bakterien wie *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) oder Mycolsäure zu keiner erhöhten Expression in Neutrophilen kam [9, 17].

Neben der transmembranen Form wurde auch eine lösliche Variante von TREM-1 (sTREM-1) beschrieben. Diese lösliche Form von TREM-1 wird nach Stimulation mit LPS oder einem Zellwandbestandteil von *Mycobacterium bovis* BCG von Neutrophilen und Makrophagen sezerniert. Die Herkunft von sTREM-1 genau ist derzeit noch nicht eindeutig geklärt. Einerseits konnte gezeigt werden, dass es sich dabei um eine Splice-Variante handelt, der die transmembrane Region fehlt, weswegen diese für eine lösliche Form des Rezeptors kodiert, die nach LPS-Stimulation vorwiegend exprimiert wird [18, 19]. Diese Theorie konnte zusätzlich dadurch bekräftigt werden, weil es nach Inkubation von Neutrophilen und Monozyten mit Protease-Inhibitoren zu keiner Veränderung in der Produktion von sTREM-1 kam [20]. Zur selben Interpretation führte eine Untersuchung, bei der es nach Behandlung der

Zellen mit Cyclohexamid, einem Inhibitor der Proteinbiosynthese, zu einem kompletten Abbruch der sTREM-1-Produktion kam [21]. Andererseits stellten Gomez-Pina et al. fest, dass es bei der Behandlung LPS-stimulierter humaner Monozyten und Neutrophiler mit einem Metalloproteinase-Inhibitor zu einer erhöhten Stabilität von TREM-1 an der Zelloberfläche und zu einer signifikant niedrigeren Bildung von sTREM-1 kommt [22]. Da diese Forschergruppe außerdem keine alternative Splice-Variante von TREM-1 detektieren konnte, wurde postuliert, dass sTREM-1 durch Abspaltung von TREM-1 von der Zelloberfläche entsteht.

2.2.2.2 Funktion

Kreuzvernetzung von TREM-1 mit einem monoklonalen Antikörper (mAk) führt in Neutrophilen und Monozyten / Makrophagen zu einer Hochregulation von Adhäsionsmolekülen [7], die für die Migration der Zellen aus den Blutgefäßen in den extravasalen Raum notwendig sind. In Monozyten / Makrophagen aber auch zu einer Hochregulation kostimulatorischer Moleküle [7, 23], die für die Ausbildung einer adäquaten adaptiven Immunantwort eine große Rolle spielen. Sowohl Neutrophile als auch Monozyten / Makrophagen produzieren nach Stimulation von TREM-1 IL-8, ein Neutrophile-anlockendes Chemokin, und $\text{TNF}\alpha$, einen potenten pro-inflammatorischen Mediator [7, 23, 24]. In Monozyten führt die Stimulation von TREM-1 zu einer verringerten Produktion von IL-10 [23].

Bouchon et al. [9] untersuchten die Rolle von TREM-1 im septischen Schock genauer, da es nach LPS-Stimulation zu einer erhöhten Expression von TREM-1 kommt und die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und $\text{TNF}\alpha$, als ein Ergebnis der Synergie zwischen TREM-1 und TLR4, steigt. In Mäusen wurde durch LPS-Injektion, Caecalligation und -punktion oder durch intraperitoneale Gabe von *E. coli* ein septischer Schock induziert, in dessen Folge die Mäuse binnen 48 Stunden starben. Wurde den Mäusen eine Stunde vor der Induktion des septischen Schocks TREM-1-Fc-Fusions-Protein injiziert, überlebten etwa 80 %, während in der Kontrollgruppe alle Mäuse starben. 40 % der Mäuse überlebten aber auch dann, wenn ihnen das TREM-1-Fc-Protein erst vier Stunden nach der Induktion des septischen Schocks injiziert wurde. In Blutproben, die auf typische pro-inflammatorische, den septischen Schock verursachende Zytokine hin untersucht wurden, fand man bei Mäusen, denen das TREM-1-Fc-Protein verabreicht wurde, signifikant niedrigere Konzentration an IL-1 β und $\text{TNF}\alpha$. Zusätzlich war bei solchen Mäusen die Anzahl von infiltrierenden Neutrophilen und Makrophagen im Peritoneum erniedrigt, während die Anzahl zirkulierender

Leukozyten unverändert blieb. Diese Daten zeigen die wichtige Rolle von TREM-1 im Sepsis-Geschehen und, dass die Blockade von TREM-1 zu erniedrigten systemischen Konzentrationen von IL-1 β und TNF α und zu einer Reduzierung zellulärer Infiltrate auf Seiten der Entzündung führt.

Die Bestimmung der Expression von TREM-1 auf der Zelloberfläche von Monozyten im Laufe einer Sepsis zeigte einen progressiven Abfall der Expression bei Patienten, die überlebten, wohingegen die Expression bei Patienten, die nicht überlebten, hoch blieb [25]. Nicht nur die Expression membrangebundenen TREM-1 war bei Patienten mit Sepsis erhöht, sondern auch die Konzentrationen an löslichem TREM-1 im Plasma, abhängig vom Schweregrad der Erkrankung [26]. Die Sekretion von sTREM-1 entspricht der Kinetik des immunsuppressiven Zytokins IL-10, was ein Hinweis darauf ist, dass sTREM-1 eine immunmodulatorische Rolle im Sepsisgeschehen spielt. Daneben könnte das Verhältnis sTREM-1 zu TNF α den Übergang von Sepsis zu schwerer Sepsis und von schwerer Sepsis zum septischen Schock festlegen [27, 28].

2.2.2.3 Klinische Relevanz

Gibot et al. waren die ersten, die zeigen konnten, dass die Plasmakonzentrationen von sTREM-1 mit dem Schweregrad der Sepsis oder der bakteriellen Infektion korrelieren [26]. In dieser Studie wurden Plasmakonzentrationen von sTREM-1 von Patienten mit Sepsis, schwerer Sepsis, septischen Schock oder nicht infektiös bedingtem SIRS (*Systemic inflammatory response syndrome*) gemessen, wobei sTREM-1-Konzentrationen von 60ng/ml oder höher einen weit besseren Parameter für die Diagnose eines infektiösen Geschehens darstellten als andere Laborparameter wie z. B. C-reaktives Protein [26, 29]. Die Unterscheidung zwischen Sepsis oder septischer Schock und nicht infektiös bedingtem SIRS ist zwar für die Behandlung von essentieller Bedeutung, aber klinisch nicht zu diagnostizieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Bestimmung der Plasmakonzentration von löslichem TREM-1 bei kritisch erkrankten Patienten dem Kliniker die Möglichkeit gibt, zwischen der Sepsis bzw. dem septischen Schock in Folge einer Infektion und einem nicht infektiös bedingtem SIRS zu unterscheiden.

Daneben wurde TREM-1 noch bei anderen infektiösen und nicht infektiösen Erkrankungen der Hirnhäute, des Pankreas und des Respirationstraktes untersucht.

Bei bakteriellen Meningitiden könnte sTREM-1 als diagnostischer und prognostischer Biomarker eine wichtige Rolle spielen, da Patienten mit bakterieller Meningitis höhere Konzentrationen von sTREM-1 in der Cerebrospinalflüssigkeit haben, als Patienten mit einer

viralen Meningitis. Zusätzlich sind diese sTREM-1-Konzentrationen bei Patienten mit bakterieller Meningitis mit letalem Ausgang höher als bei Patienten, die die Meningitis überlebten [30].

Bei Patienten mit akuter Pankreatitis zeigte eine Studie von Wang et al. eine im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe erhöhte Expression von TREM-1 auf Blutleukozyten und, dass diese Expression mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert [31]. Akute Pankreatitis ist eine selbst-destruktive Entzündung des Pankreas, deren Ausgang bei unzureichender Behandlung letal sein kann. Dies sind die ersten Ergebnisse, die zeigen, dass TREM-1 bei einer nicht bakteriell bedingten Erkrankung hochreguliert wird, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass TREM-1 eine gewisse Rolle für das Auftreten und die Entwicklung akuter Pankreatitiden spielt.

Bei Patienten mit einer Pneumonie, die durch extrazelluläre Bakterien verursacht wurde, und bei Patienten mit Ventilator-assoziiertes Pneumonie (VAP) wurde eine erhöhte Expression von TREM-1 auf Neutrophilen und eine erhöhte Konzentration von sTREM-1 in der Bronchiallavageflüssigkeit gefunden, nicht aber bei Patienten mit Tuberkulose oder Lungenmykosen [32-35]. VAP ist die am häufigsten auftretende nosokomiale Infektion bei Patienten mit längerem Krankenhausaufenthalt und ist mit erhöhter Mortalität assoziiert [36]. Interessanterweise sanken auch bei Patienten mit VAP die Plasmakonzentration von sTREM-1 nach Beginn einer antibiotischen Behandlung [33], so dass diese Ergebnisse einen Hinweis darauf liefern könnten, dass die Bestimmung von sTREM-1 im Plasma von an VAP-erkrankten Patienten für die Intensivierung einer antibiotischen Therapie oder für die Vermeidung einer unnötig langen Therapie herangezogen werden könnte.

Wie oben beschrieben scheint sTREM-1 ein guter diagnostischer und prognostischer Marker für bakterielle Infektionen beim Menschen zu sein [28, 37]. Aus therapeutischer Sicht könnte TREM-1 ein interessanter Kandidat in der Behandlung von septischem Schock, bakteriellen Pneumonien, Ventilator assoziierter Pneumonie, bakterieller Meningitis oder sogar akuter Pankreatitis sein.

2.2.2.4 Ligand

Eine im Jahr 2007 von Haselmayer et al. veröffentlichte Studie zeigt, dass das TREM-1-Fc-Fusions-Protein an der Oberfläche von Blutplättchen bindet, was vermuten lässt, dass dort ein Ligand von TREM-1 exprimiert wird [38]. Dieser wurde aber bisher noch nicht näher charakterisiert.

2.2.2.5 TREM-1 bei anderen Spezies

2.2.2.5.1 Schwein

Ramanathan et al. klonierten eine TREM-1-cDNA aus porcinem Knochenmark, die für ein 238 AS langes Protein kodiert [39]. Nach Stimulation von Knochenmarkszellen mit LPS oder Peptidoglykan kam es zu einer Erhöhung der TREM-1-Expression. Auch oral mit *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infizierte Schweine zeigten 8 bzw. 24 Stunden nach der Infektion eine erhöhte Expression von TREM-1 auf Knochenmarkszellen. 48 Stunden nach der Infektion nahm diese Expression wieder ab.

TREM-1 stellt den bisher einzigen bekannten Vertreter der TREM-Familie beim Schwein dar.

2.2.2.5.2 Rind

Ebenfalls Ramanathan et al. klonierten TREM-1 aus bovinem Knochenmarkszellen mit einer Länge von 1202 bp und einer vorhergesagten Proteinelänge von 232 AS [40]. Vergleichende Analysen zeigten eine 48 – 61%ige Übereinstimmung in der AS-Sequenz mit TREM-1-Proteinen anderer Spezies, wobei das bovine TREM-1 dem porcinem am ähnlichsten ist.

TREM-1 stellt den bisher einzigen bekannten Vertreter der TREM-Familie beim Rind dar.

2.2.3 TREM-2

2.2.3.1 Struktur und Expression

TREM-2 ist ein Rezeptor mit den Charakteristika eines aktivierenden Rezeptors, wie ein kurzer zytoplasmatischer Abschnitt und ein positiv geladener transmembraner Bereich, der mit DAP12 als Adaptormolekül interagiert.

Von TREM-2 wurde eine Splice-Variante beschrieben, die keine transmembrane Region besitzt [41, 42]. Diese lösliche Form des Rezeptors (sTREM-2) konnte in Makrophagenkulturen detektiert werden [41].

TREM-2 wird auf Monozyten / Makrophagen, Dendritischen Zellen (DC), Osteoklasten und Mikroglia exprimiert [41, 43], nicht aber auf Astrozyten [44]. Unklar ist, ob TREM-2 auf Oligodendrozyten exprimiert wird [45, 46] oder nicht [44]. Nach Turnbull et al. ist TREM-2 auf stimulierten murinen Peritonealmakrophagen exprimiert, in anderen primären Zellen von Blut, Leber, Milz, Lunge oder Knochenmark aber kaum detektierbar [47]. Mit M-CSF kultivierte Knochenmarkszellen der Maus differenzieren zu Makrophagen, die TREM-2 auf

ihrer Oberfläche exprimieren [8]. Werden Monozyten mit GM-CSF und IL-4 stimuliert, differenzieren diese zu unreifen DCs, deren TREM-2-Expression deutlich erhöht ist. Bei einer weiteren Entwicklung zu reifen DCs, geht die Expression von TREM-2 aber schlagartig zurück [48]. Nach Stimulation muriner Mikroglia und der TREM-2 exprimierenden murinen Makrophagen-Zelllinie RAW264 mit LPS oder IFN γ wird die Expression von TREM-2 erniedrigt [41, 47].

In Mikroglia und Neuronen scheint TREM-2 am meisten intrazellulär in diskreten Bezirken, die teilweise mit dem Golgi-Apparat zusammenfallen, teils an ihn grenzen, exprimiert zu sein [44]. Diese Beobachtung wurde durch eine Studie von Prada et al. bekräftigt, in der ebenfalls gezeigt wurde dass TREM-2 vor allem intrazellulär lokalisiert zu sein scheint, wobei zwei Bereiche beschrieben wurden: ein Depot im Golgi-Apparat und eins in exozytischen Vesikeln, wobei TREM-2 offenbar von der Zelloberfläche zurückgewonnen wird und die Exozytose der Vesikel vom Aktivierungsstatus der Mikroglia-Zelle reguliert wird [49].

2.2.3.2 Funktion

Die Stimulation von TREM-2 auf murinen Monozyten und Makrophagen führt zur Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) [8]. Stimuliert man TREM-2 auf DC oder Mikroglia führt dies zu einer erhöhten Expression von CCR7 [48, 50]. CCR7 ist ein Chemokinrezeptor, der für die Wanderung der DCs vom peripheren Gewebe hin zum regionären Lymphknoten von essentieller Bedeutung ist. Interessanterweise zeigen DAP12-defiziente Mäuse eine Ansammlung von DCs in der Haut, was auf ein Fehlen der TREM-2-Signaltransduktion zurückzuführen sein könnte. Folglich kommt es auf solchen DCs zu keiner erhöhten Expression von CCR7 und somit zu keiner Wanderung zum regionären Lymphknoten.

TREM-2 ist der erste mit dem Adaptormolekül DAP12 assoziierte Rezeptor, bei dem ein inhibitorischer Effekt als Antwort auf eine TLR-Stimulation nachgewiesen werden konnte. Dies konnte dadurch gezeigt werden, dass TREM-2-defiziente Mäuse nach Stimulation mit TLR-Liganden, wie LPS, CpG oder Zymosan, denselben Phänotyp zeigen wie DAP12-defiziente Mäuse – insbesondere eine verzerrte Zytokin-Produktion –, was annehmen lässt, dass dies durch TREM-2 bedingt ist [47]. Die Transfektion von TREM-2-DAP12 chimären Rezeptoren, nicht aber die Transfektion von TREM-1-DAP12 chimären, führte bei DAP12-defizienten Makrophagen zu TLR-Antworten wie sie in Makrophagen vom Wild-Typ beobachtet werden. Zudem führte ein *Knock down* von TREM-2 mittels siRNA in Wild-Typ-Makrophagen zu einer erweiterten Zytokinantwort auf CpG- und Zymosan-Stimulation [51].

Die Stärke der Bindung eines Liganden an einen an DAP12-gekoppelten Rezeptor ist offenbar für seine Wirkung verantwortlich: so wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Bindung an einem DAP12-abhängigen Rezeptor mit einem Liganden niedriger Affinität zu einer Hemmung der TLR-medierte Antwort führt, während die Stimulation mit einem hoch affinen Liganden zu einem synergistischen Effekt mit der TLR-Antwort führt [52, 53]. Diese Hypothese wurde durch Untersuchungen gestützt, in denen niedrig affine Liganden des Fc α RI eine Hemmung der Phagozytose und IgE-medierte Exozytose induzierten, während hoch affine Liganden zu aktivierenden Signalen führten [54]. Dies könnte den inhibitorischen Effekt von TREM-2 nach einer TLR-Stimulation erklären.

Welche Funktion die lösliche Form von TREM-2 hat, ist unbekannt. Es ist aber anzunehmen, dass sie einen immunmodulatorischen Effekt besitzen könnte, ebenso wie sie eine Auswirkung auf Knochenumbau und Gehirn-Homöostase haben könnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass DAP12-assoziierte Rezeptoren, wie TREM-2, Zellantworten aktivieren und hemmen und auf diese Weise die Immunantwort regulieren könnten, und dass die Hemmung der Zellaktivierung die Hauptfunktion von DAP12 darstellen könnte [53].

2.2.3.3 TREM-2 und Nasu-Hakola-Erkrankung

Mutationen des TREM-2-Gens führen zur Entwicklung einer seltenen rezessiv vererbten Erkrankung, die als Nasu-Hakola-Erkrankung oder auch als „Polyzystische lipomembranöse Osteodysplasie mit sklerosierender Leukoencephalopathie“ (PLOS) bezeichnet wird. Diese Erkrankung wurde unabhängig von einander gleichzeitig von zwei unterschiedlichen Forschergruppen in Finnland und Japan entdeckt [55, 56]. Die Erkrankung ist charakterisiert durch multiple Knochenzysten-ähnliche Läsionen und durch progressive Enzephalopathie, die zu einer schweren Neurodegeneration führt [57, 58]. Der klinische Verlauf der Erkrankung ist in verschiedene Phasen eingeteilt: auf eine bis zu 20 Jahre dauernde latente Phase folgen erste Knochensymptome und frühe neurologische Veränderungen, die im Alter von etwa 40 Jahren zu schweren neurologischen Störungen und massiver Neurodegeneration führen [59, 60]. In einem späteren Stadium zeigen die Patienten Tremor, Gangunsicherheiten und schließlich in Folge der schweren neurologischen Veränderungen tief greifende Demenz und Lähmungen. Oft folgen in der vierten Dekade Infektionen des Respirations- und Urogenitaltraktes [59], und der Tod etwa im Alter von 50 Jahren. Neuropathologische Untersuchungen zeigen eine generalisierte kortikale Atrophie und Substanzverlust der weißen Masse, vor allem im Bereich

des Corpus callosum und der Basalganglien. Allen Patienten gemeinsam ist der merkliche Verlust von Axonen und Myelin [58].

Neben den neurologischen Veränderungen leiden – wie oben erwähnt – die Patienten auch an Knochenzysten-ähnlichen Läsionen, die meist in den Extremitäten lokalisiert sind und mit Triglyceriden gefüllt sind [59]. Der erste Verdacht, dass TREM-2 und DAP12 in die osteoporotischen Veränderungen involviert sein könnten, stammte von einer Untersuchung von Paloneva et al. [61]. DAP12-defiziente und TREM-2-defiziente PBMC zeigen eine beeinträchtigte und verzögerte Differenzierung zu Osteoklasten, die zudem auch eine reduzierte Knochenresorptionskapazität aufweisen [43, 61].

Allerdings stellte sich als zugrunde liegender Defekt bei dieser Erkrankung eine Mutation des DAP12-Gens heraus. Die Finnische Population trägt eine homozygote Deletion des Exons 1-4 des für DAP12 kodierenden Gens [62], die Japanische eine *loss-of-function*-Mutation des DAP12-Gens. Auch wenn diese Mutationen die Ursache für die Erkrankung der meisten Patienten darstellen, gibt es doch einige Patienten, die ein intaktes DAP12-Gen besitzen, und bei denen Mutationen im TREM-2-Gen nachgewiesen werden konnten [63]. Kürzlich wurde eine italienische Familie beschrieben, die aufgrund einer Mutation des TREM-2-Gens, bei der es zur Generierung eines zu frühen Stopcodons kam, eine Nasu-Hakola-Erkrankung entwickelte [64].

Von wissenschaftlichem Interesse ist, dass auch DAP12-defiziente Mäuse an Problemen im Knochenumbau und an Hypomyelinose mit synaptischen Degenerationen leiden.

Bei der Alzheimer'schen Erkrankung und bei der frontotemporalen Lobardegeneration, beides Erkrankungen bei denen Mikroglia sehr aktiv ist, wurde allerdings keine TREM-2-Mutation festgestellt [65]. Die Aktivierung von Mikroglia ist aber auch für andere neurodegenerative Erkrankungen wie für Parkinson, Multiple Sklerose oder AIDS-assoziierte Demenz charakteristisch.

2.2.3.4 Ligand

Die Liganden für TREM-2 sind bisher noch nicht eindeutig identifiziert. Allerdings binden *E. coli* und *Staphylokokkus aureus* spezifisch an TREM-2, wobei anionische Moleküle wie LPS oder Dextransulfat diese Bindung hemmen können. Dies lässt vermuten, dass TREM-2 Pathogene über geladene Kohlenhydrate auf der Pathogenoberfläche erkennt. Das TREM-2-Fc-Fusions-Protein bindet sowohl an Astrozytoma-Zelllinien [66] als auch an aus dem Knochenmark stammenden Makrophagen [51], was annehmen lässt, dass diese Zellen einen spezifischen Liganden für TREM-2 tragen.

2.2.4 TREM-3

Über TREM-3, einen Rezeptor mit einer extrazytoplasmatischen Ig-Domäne vom V-Typ und den Merkmalen aktivierender Ig-ähnlicher Rezeptoren, ist bisher sehr wenig bekannt, da er nur auf murinen Makrophagen exprimiert zu sein scheint [8, 10]. Die Expression von TREM-3 wird nach Stimulation muriner Makrophagen mit LPS erhöht, nach Stimulation mit IFN γ erniedrigt [10]. Kreuzvernetzung von Makrophagen mit einem mAk führt zur Produktion von NO [8], da der Rezeptor mit dem Adaptormolekül DAP12 assoziiert ist [10]. Beim Menschen handelt es sich bei TREM-3 wahrscheinlich um ein Pseudogen.

2.2.5 TLT-1

2.2.5.1 Struktur und Expression

TLT-1 ist ein inhibitorischer Rezeptor in der TREM-Rezeptor-Familie, da es in seinem zytoplasmatischen Abschnitt zwei ITIMs besitzt. Neben der membrangebundenen Form existiert noch eine lösliche Splice-Variante, die in humanem und murinem Serum detektiert werden konnte [14].

TLT-1 wird in α -Granulas von Blutplättchen und Megakaryozyten und auf der Oberfläche von Blutplättchen exprimiert [67, 68]. Nach Aktivierung der Plättchen wird die Expression von TLT-1 in Folge der Verschiebung der α -Granulas zur Blutplättchenoberfläche erhöht und die Freisetzung von löslichem TLT-1 verstärkt [14].

2.2.5.2 Funktion

Barrow et al. [68] konnten zeigen, dass die Kreuzvernetzung von TLT-1 zur Rekrutierung der Phosphatase SHP-2 führt, aber nicht zur Rekrutierung von SHP-1 oder SHIP. In ihren Versuchen kam es im Anschluss an die Kreuzvernetzung zu einer Fc ϵ RI γ -medierten Kalzium-Freisetzung. Diesbezüglich scheint sich TLT-1 nicht wie ein klassischer ITIM-haltiger Rezeptor zu verhalten, bei dem es zu einer Abnahme der Kalzium-Freisetzung kommt. Plättchenaktivierung ist einer der ersten Schritte in der Kaskade von thrombozytären Ereignissen bis hin zur Blutgerinnung. Da die Expression von TLT-1 nach Plättchenaktivierung erhöht ist, liegt die Vermutung nahe, dass TLT-1 einer Rolle in der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase und in der Regulation der Koagulation und des Entzündungsgeschehens nach Verletzungen spielt.

2.2.6 TLT-2

2.2.6.1 Struktur und Expression

TLT-2 assoziiert nicht mit DAP12, zeigt aber auch kein klares Signalmotiv in seiner zytoplasmatischen Region [16].

Während B-Zellen TREM-1, TREM-2 oder TREM-3 nicht exprimieren, findet man TLT-2 auf verschiedenen B-Zell-Subpopulationen unterschiedlich stark exprimiert.

Die Expression von TLT-2 wird durch LPS-Stimulation auf Neutrophilen und Makrophagen hochreguliert, während die Expression auf B-Zellen unverändert bleibt [12].

2.2.6.2 Funktion

Funktionell ist bislang unklar, ob die Stimulation von TLT-2 B-Zellen aktivieren oder hemmen kann. Die Stimulation von B-Zellen der Milz mit löslichem oder mit einem auf eine Platte beschichteten mAk gegen TLT-2 führte weder zu einer Verlängerung der Lebensdauer der Zellen, noch zur Induktion von Proliferation oder erhöhten Expression von Aktivierungsmarkern, wie CD69 oder CD86 [12].

2.2.7 TRAPC

2.2.7.1 Struktur und Expression

Van der Holst [69] klonierte 2007 eine 780 bp-lange murine cDNA, die für einen 259 AS langen Rezeptor namens *Triggering Receptor expressed on Antigen-Presenting Cells* (TRAPC) kodiert, der Ähnlichkeiten mit NKp44 aufweist. Das Gen wurde auf Chromosom 17 der Maus lokalisiert. Der Rezeptor zeigt die Merkmale aktivierender Ig-ähnlicher Rezeptoren, da er eine extrazytoplasmatische Ig-Domäne vom V-Typ, eine transmembrane Region mit einer positiv geladenen AS und einen kurzen zytoplasmatischen Abschnitt ohne bekanntes Signalmotiv besitzt.

TRAPC wird auf der Oberfläche Antigen-präsentierender Zellen, wie Monozyten, Makrophagen und B-Zellen sowie auf DC aus murinem Knochenmark, nicht allerdings auf T-Zellen oder NK-Zellen exprimiert. TRAPC-mRNA konnte in Lymphknoten, Niere, Leber, Lunge, Uterus und Milz detektiert werden, nicht aber im Gehirn.

Nach Stimulation von Makrophagen mit LPS wurde die Expression von TRAPC erhöht.

2.2.7.2 Funktion

TRAPC assoziiert mit dem Adaptormolekül DAP12, über das es nach Kreuzvernetzung von murinen Makrophagen und DCs mit einem mAk zur Aktivierung der Zellen, zur Bildung von NO und zu einer erhöhten Expression von CD40 kommt.

2.2.7.3 Ligand

Mit Hilfe einer TRAPC-huFc-Fusions-Proteins wurde in der Durchflusszytometrie festgestellt, dass der Ligand von TRAPC auf einer Makrophagen-Zelllinie, auf Milzzellen, auf DCs aus dem Knochenmark und auf B-Zellen exprimiert sein muss, wobei die beiden letzteren neben dem Liganden auch den Rezeptor exprimieren.

2.3 TREM beim Huhn

2.3.1 Chromosomale Lokalisation

Viertlböck et al. [1] zeigten 2006, dass der sythenische Locus für die TREMs beim Haushuhn auf Chromosom 26 liegt. Wie auch beim Säuger wird dieser Locus durch die mit den TREM-Genen nicht verwandten Genen für den *Nuclear transcription factor-Y α* (NFYA), der *Forkhead Box P4* (FOXP4) und dem *MyoD family inhibitor* (MDFI) flankiert.

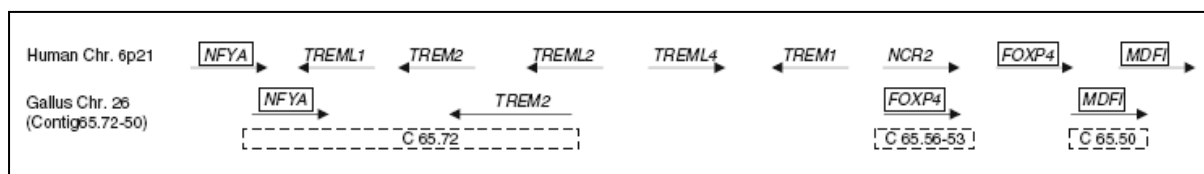


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Gene im TREM-Cluster auf dem humanen Chromosom 6p21.1 verglichen mit dem sythenischen Locus auf Chromosom 26 des Huhns vor Beginn der Untersuchungen von Viertlböck et al. [1] Die Gene für NFYA, FOXP4 und MDFI flankieren die sythenische Region.

Bei dem durch die ENSEMBL-Datenbank vorhergesagten einzelnen TREM-Gen auf Contig 65.72 handelt es sich, wie sich in weiteren Untersuchungen herausstellte, um zwei verschiedene Gene. Daneben wurde auf Contig 65.71 mit Hilfe zweier Primer, die die Lücke zwischen Contig 65.70 und 65.71 schließen sollten, ein dritter Vertreter der TREM-Rezeptor-Familie gefunden.

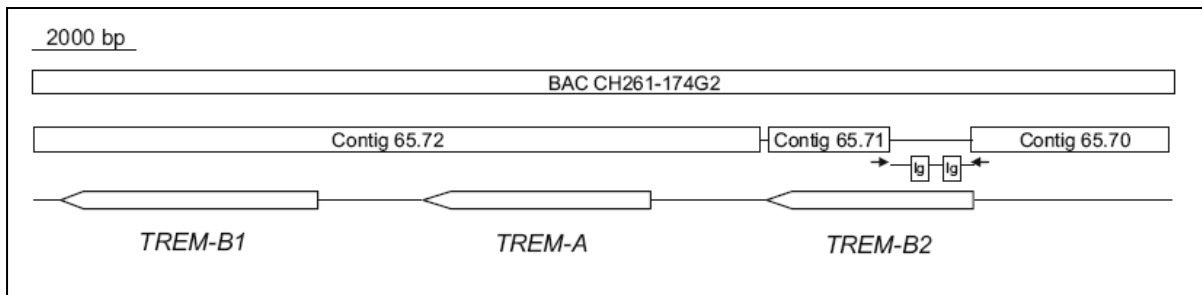


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Lage der verschiedenen TREM-Gene auf Chromosom 26 des Huhnes. Die drei Mitglieder der TREM-Familie liegen in derselben Orientierung auf dem Chromosomenabschnitt. TREM-A und TREM-B1 wurden als TREM-2 vorhergesagt, TREM-B2 konnte erst nach Sequenzierung des Abschnittes zwischen Contig 65.70 und 65.71 identifiziert werden.

Da aber weiterhin Lücken von unbekannter Größe zwischen den für die Rekonstruktion der chromosomalen Region verwendeten, sich nicht überschneidenden Contigs lagen, besteht die Möglichkeit, dass sich dort noch weitere Mitglieder der TREM-Familie befinden, deren Identifizierung erst nach vollständiger Sequenzierung der genomischen DNA möglich ist.

In Abbildung 4 ist die Exon/Intron-Struktur der Mitglieder der TREM-Rezeptor-Familie beim Huhn dargestellt. Diese entspricht der genomischen Organisation von Rezeptoren der Ig-Superfamilie, bei denen die verschiedenen Ig-Domänen auf separaten Exons kodiert werden. Die charakterisierten Rezeptoren erfüllen die gt-ag-Regel und alle Exons der Signalpeptide und der Ig-ähnlichen Domänen sind in Phase 1. Die Exons von Stalk-Region und transmembranem Bereich befinden sich in Phase 1 oder 2, während die zytoplasmatischen Exons in Phase 0 sind. Die Länge, Anzahl und Verteilung der Introns der verschiedenen TREMs beim Huhn variiert stark, was bei den TREMs des Menschen ähnlich ist [16].

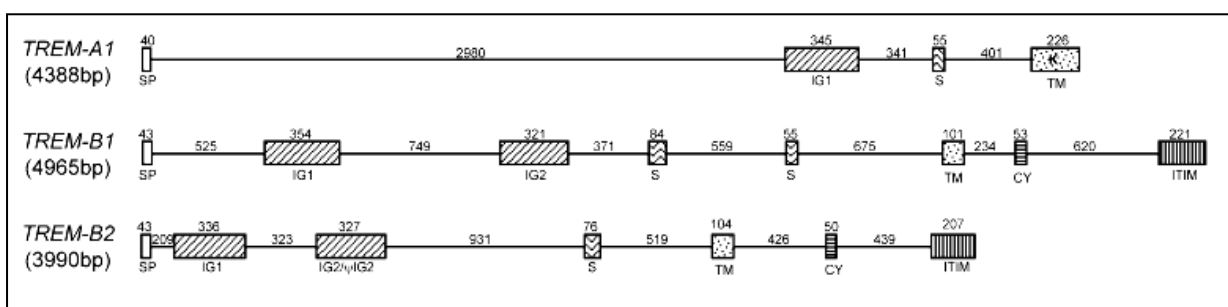


Abbildung 4: Darstellung der Exon/Intron Struktur der Mitglieder der TREMs beim Huhn nach Viertlböck et al. [1]. SP: Signalpeptid, IG: Ig-Domäne, S: Stalk-Region, TM: transmembraner Bereich, CY: zytoplasmatischer Abschnitt. Die genaue Beschreibung der Rezeptoren erfolgt im Text.

2.3.2 Nomenklatur

Die Rezeptoren wurden entsprechend ihrer Homologie zur humanen TREM-Familie ebenfalls als TREM bezeichnet, wobei Rezeptoren, die Merkmale aktivierender Rezeptoren aufwiesen, mit dem Suffix –A und einer Nummer entsprechend ihrer Entdeckung versehen wurden und potentiell inhibitorische Rezeptoren mit dem Suffix –B und einer entsprechenden Nummer.

2.3.3 Struktur

Die TREMs beim Huhn besitzen eine oder zwei Ig-Domänen vom V-Typ. In Abbildung 5 sind die verschiedenen Mitglieder der TREMs beim Huhn schematisch zusammengestellt.

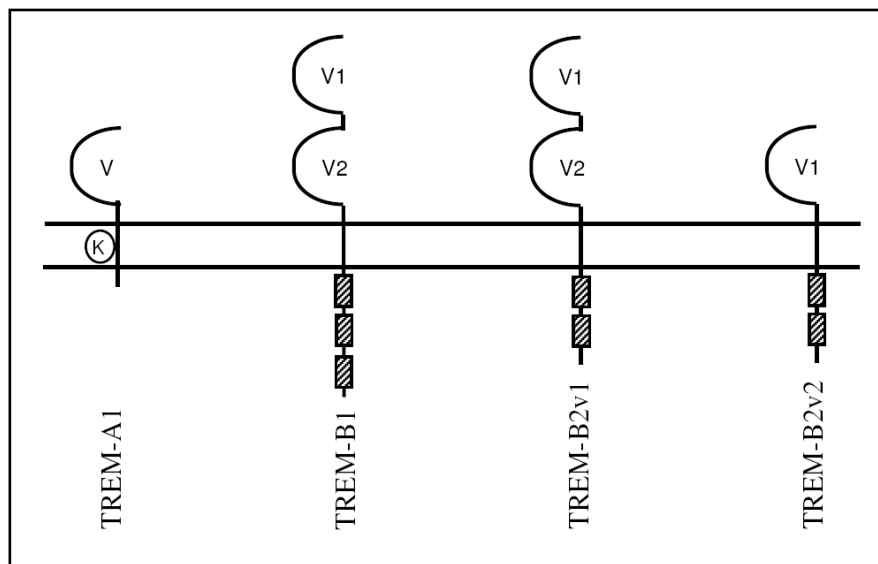


Abbildung 5: Schematische Zusammenstellung der Mitglieder der TREMs mit ihren Ig-Domänen vom V-Typ, und intrazytoplasmatischen ITIMs (gestreift) beim Huhn nach Viertelboeck et al. Im transmembranen Bereich von TREM-A1 ist die positiv geladene AS angedeutet (K).

TREM-A1 zeigt die Merkmale eines aktivierenden Rezeptors mit einer extrazytoplasmatischen Ig-Domäne und der AS Lysin in der transmembranen Region und wird von einem 713 bp-langen Transkript kodiert.

TREM-B1 wird von einem 1233 bp-langen Transkript kodiert. Das Protein besitzt zwei extrazytoplasmatische Ig-Domänen vom V-Typ, wobei in der membran-proximalen Ig-Domäne das normalerweise im F-Strang lokalisierte Cystein, das für die Bildung einer intramolekularen Disulfidbrücke verantwortlich ist, fehlt. Im zytoplasmatischen Abschnitt befinden sich ITIMs, was auf eine Funktion als inhibitorischer Rezeptor schließen lässt.

Für TREM-B2 wurden zwei Transkripte mit einer Länge von 1014 und 1341 bp detektiert. Die lange Variante (TREM-B2v1) kodiert für einen Rezeptor mit zwei Ig-Domänen vom V-Typ, einer transmembranen Region und einen zytoplasmatischen Abschnitt mit zwei ITIMs. Die kürzere Variante (TREM-B2v2) ist im Wesentlichen mit der langen Variante identisch, es fehlt jedoch die membran-proximale Ig-Domäne. Letztere ist wahrscheinlich durch alternatives Splicing entstanden.

2.3.4 Phylogenetische Aspekte

Um die Homologie zu den TREMs beim Säuger nachzuweisen, wurde neben der chromosomalen Analyse eine Stammbaum-Analyse durchgeführt. Dazu wurden die extrazytoplasmatischen Abschnitte von humanem TREM-1, TREM-2 und TLT-1 verwendet. Dabei stellte sich heraus, dass die Homologie zwischen den V-Typ-Ig-Domänen der inhibitorischen Rezeptoren von Mensch und Huhn zwischen 10 und 30 % lag, während die Homologie zwischen der Ig-Domäne des humanen TREM-2 und der des TREM-A1 beim Huhn bei 44 % lag.

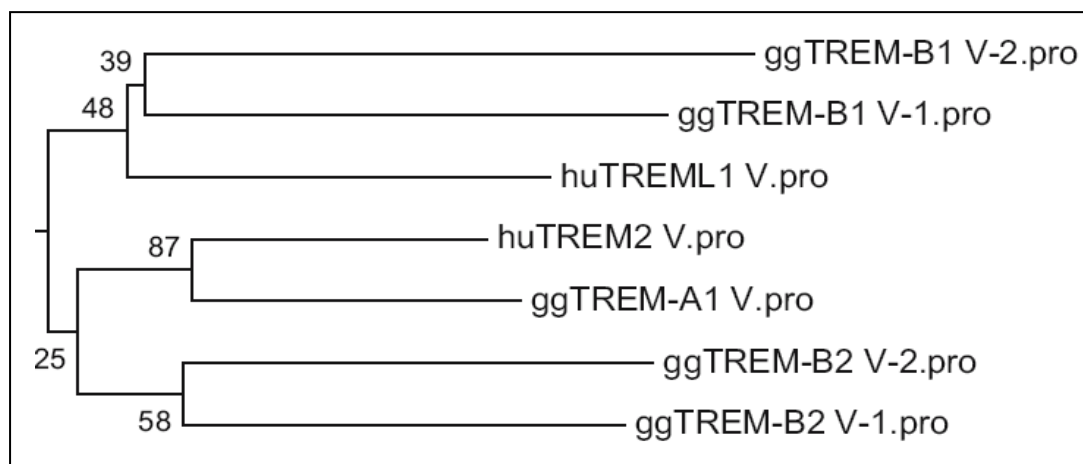


Abbildung 6: Phylogenetischer Vergleich der Hühner-TREM-Familie mit Vertretern der humanen TREM-Familie. Die einzelnen Ig-Domänen wurden mit Hilfe des Clustal W Algorithmus analysiert und mit Hilfe von MEGA 3.1 der Baum erstellt. Entnommen aus Viertlböck et al. [1].

3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die molekularbiologische Charakterisierung der TREMs beim Haushuhn. Diese sollten anhand der AS-Sequenz, der biochemischen Eigenschaften und Gewebeverteilung mit den TREMs beim Säuger verglichen werden. Insbesondere wurden TREM-A1 als potentiell aktivierender Rezeptor und TREM-B1 als Vertreter der potentiell inhibitorischen Rezeptoren genauer charakterisiert.

Dazu wurden im Einzelnen folgende Ziele angestrebt:

- Analyse des BAC-Klons 94J19 auf die Existenz weiterer TREM
- Charakterisierung der Gewebeverteilung aller TREM durch Real-time quantitative PCR
- Herstellung eines spezifischen mAk gegen TREM-A1
- Analyse der Proteinexpression von TREM-A1 durch Färbung mit einem mAk
- Biochemische Analyse der Rezeptorstruktur von TREM-A1 und TREM-B1
- Nachweis phosphorlierter ITIMs und der rekrutierten Signaltransduktionsmoleküle von TREM-B1
- Suche nach Liganden für TREM-A1 und TREM-B1

4 Material und Methoden

4.1 Tiere und Tierhaltung

4.1.1 Hühner

Befruchtete Eier von CB-Hühnern (B12/B12, J. Plachý, Prag) und M11-Hühner (B2/B2, S. Weigend, Mariensee) wurden im Institut für Tierphysiologie bebrütet. Die Tiere wurden im Alter von 6 bis 8 Wochen für die Blut- und Organentnahmen verwendet. Die Hühner wurden in Gruppen in Volieren gehalten und mit handelsüblichem Alleinfutter und Wasser ad libitum versorgt.

4.1.2 Mäuse

Für die Immunisierung zur Produktion eines mAk wurden Balb/c Mäuse im Alter von 2 Monaten verwendet. Die Tiere wurden in Kleingruppen in Macrolonkäfigen gehalten und mit handelsüblichem Alleinfutter und Wasser ad libitum versorgt.

Die Versuche wurden der Regierung von Oberbayern unter der Nummer 55.2-1-54-2531.6-08-06 angezeigt.

4.1.3 Kaninchen

Für die Immunisierung zur Gewinnung polyklonaler Antisera wurden Kaninchen im Alter von etwa einem Jahr verwendet. Die Tiere wurden einzeln in Käfigen gehalten und mit handelsüblichem Alleinfutter und Wasser ad libitum versorgt.

Die Versuche wurden unter der Nummer 55.2-1-54-2531.6-08-06 bei der Regierung von Oberbayern angezeigt.

4.2 Präparation primärer Hühnerleukozyten

4.2.1 Material

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

8,0	g	Natriumchlorid (NaCl) ³
1,45	g	Di-Natriumhydrogenphosphat-di-Hydrat (Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O) ³
0,2	g	Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) ³
0,2	g	Kaliumchlorid (KCl) ³

1 x PBS: ad 1000 ml Aqua dest.;

10 x PBS: ad 100 ml Aqua dest.

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

Heparin-Lösung (500 IU/ml)

1	ml	Heparin-Natrium 20.000 ²⁰
39	ml	RPMI 1640 ⁵

Ficoll-Paque-Lösung ⁵

Trypanblau ⁵

4.2.2 Durchführung

Die Blutentnahme beim Huhn erfolgte mit einer heparinisierten Spitze mit 20G-Kanüle an der rechtsseitigen Vena jugularis. Die peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMC) wurden durch Dichtezentrifugation gewonnen, indem 5 ml Vollblut 1:2 mit PBS verdünnt und mit 10 ml Ficoll-Paque-Lösung unterschichtet wurde. Nach 12-minütiger Zentrifugation bei Raumtemperatur (RT) mit 600 x g wurden die sich in der Interphase befindenden PBMC vorsichtig abgenommen und dreimal mit PBS gewaschen. Die peripheren Blutlymphozyten (PBL) wurden mit Hilfe der sog. „SlowSpeed“ - Zentrifugation gewonnen, indem heparinisiertes Vollblut in einem 15 ml Röhrchen bei RT mit 60 x g 20 min. zentrifugiert wurde und die PBL durch kreisende Bewegungen mit einer Pasteurpipette vorsichtig gelöst, abgesaugt und dreimal mit PBS gewaschen wurden.

Zur Organentnahme wurde das Huhn nach Betäubung durch Blutentzug getötet und daraufhin die Bauchhöhle eröffnet. Alle entnommenen Organe wurden sofort nach Entnahme in 4 °C kaltes PBS eingelegt, sofern sie der Präparation von Zellen aus diesen Organen dienen sollten. Von Geweben, von denen RNA isoliert werden sollte, wurde ein etwa 100 mg schweres Stück in ein Kryoröhrchen überführt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Es wurden die dorsokranial des Muskelmagens gelegene Milz, die dorsal des Enddarms liegende Bursa, die am Übergang der Blinddärme zum Dickdarm liegenden Caecaltonsillen, Stücke des Duodenums und des an der Halsregion subkutan gelegenen Thymus entnommen. Knochenmark wurde aus den an beiden Enden eröffneten Femurknochen gewonnen, indem es mit kaltem PBS mit Hilfe einer Spritze mit 20G-Kanüle herausgespült wurde.

Zur Präparation von Leukozyten aus Milz, Bursa, Thymus, Caecaltonsillen und Knochenmark wurde das Organ mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein Metallsieb mit der Maschenweite 0,75 mm x 0,75 mm gedrückt, die Zellsuspension für 10 min. auf Eis gestellt, um noch vorhandene Gewebestücken sedimentieren zu lassen, und der Überstand bei 4 °C und 225 x g 10 min. zentrifugiert. Das Zellpellet wurde daraufhin in 10 ml PBS resuspendiert, mit 10 ml Ficoll-Paque-Lösung unterschichtet, 12 min. bei 600 x g und RT zentrifugiert, die sich in der Interphase befindenden Leukozyten abgesaugt und dreimal mit PBS gewaschen.

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

4.3 Kultivierung von Zellen

4.3.1 Zellkulturmedien und Stammlösungen

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

Standardmedium

445	ml	RPMI 1640 ¹⁰
50	ml	FCS ⁵
5	ml	Penicillin-Streptomycin-Lösung (100 IE/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) ⁵

HD11-Medium

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

SL3-Medium

445	ml	SF900 II ¹⁰
50	ml	FCS ⁵
5	ml	Penicillin-Streptomycin-Lösung ⁵
0,5	ml	Puromycin (10 mg/ml)

HAT-Medium

445	ml	ISF-1 ⁵
10	ml	Interleukin 6 (IL-6)-haltiger Zellkulturüberstand (aus, mit murinem Il-6 transfizierter Zelllinie, von T. Göbel zur Verfügung gestellt)
10	ml	HAT-Supplement 50 x ⁵ (Endkonzentration: 1 x 10 ⁻⁴ M Hypoxanthin, 4 x 10 ⁻⁷ M Aminopterin, 1,6 x 10 ⁻⁵ M Thymidin)
5	ml	Penicillin-Streptomycin-Lösung ⁵

PBS-EDTA

200	mg	Ethylendiamintetracetic Acid Tetra-Natrium Hydrat (EDTA) (C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₈ Na ₄) ³
-----	----	---

Ad 1000 ml PBS, vor Gebrauch autoklavieren

Einfriermedium (FCS mit 10% DMSO)

9,0	ml	FCS ⁵
1,0	ml	Dimethylsulfoxid (DMSO) ³

Bei -20 °C lagern

Stammlösung G418 (50 mg/ml)

500 mg G418⁵

Ad 10 ml RPMI 1640, steril filtriert bei 4 °C lagern

Stammlösung Puromycin (10 mg/ml)

100 mg Puromycin³

Ad 10 ml Aqua bidest., steril filtriert bei 4 °C lagern

Stammlösung LPS (1 mg/ml)

10 mg Lipopolysaccharid (LPS) aus E.coli, lyophilisiert²⁵

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

Stammlösung IFN γ

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

Stammlösung PMA (1 mg/ml)

1 mg Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)²⁵

Ad 1ml DMSO, in Aliquots von 20 µl bei -20 °C lagern

Stammlösung CaIonophor (1 mg/ml)

1 mg Calcium ionophore II²⁵

Ad 1 ml DMSO, in Aliquots von 100 µl bei -20 °C lagern

Stammlösung ConA (1 mg/ml)

5 mg Concanalinalin A (ConA)²⁵

Ad 5 ml RPMI 1640, in Aliquots von 100 µl bei -20 °C lagern

Stammlösung Kupfersulfat (1 M)

1,6 g Kupfersulfat (CuSO₄)¹⁴

Ad 10 ml Aqua dest., steril filtriert bei 4 °C lagern

4.3.2 Präparation von Thrombozyten und Makrophagen

PBMC, die wie unter Abschnitt 4.2 auf S. 36 beschrieben aus Hühnerblut gewonnen wurden, wurden in Standardmedium auf eine Zelldichte von 1×10^7 Zellen / ml eingestellt und in 6-Lochplatten oder Petrischalen mit 100 mm Durchmesser verteilt. Nach 3 Stunden Kultur bei 40 °C waren am Boden des Kulturgefäßes adhärierende Thrombozyten, nach 48 Stunden Kultivierung adhärent wachsende Makrophagen mikroskopisch erkennbar. Nach Abnahme des Kulturmediums nach 3 bzw. 48 Stunden wurden die Thrombozyten bzw. Makrophagen dreimal mit PBS gewaschen, um Suspensionszellen zu entfernen, und mit frischem Standardmedium überschichtet.

4.3.3 Stimulation primärer Leukozyten

4.3.3.1 Stimulation von Makrophagen mit LPS und IFN γ

Makrophagen wurden durch Zugabe von 1 μ g LPS bzw. 1 μ l rekombinantem Hühner-IFN γ pro ml Standardmedium stimuliert und je nach Bedarf unterschiedlich lange bei 40 °C weiterkultiviert.

4.3.3.2 Stimulation von Leukozyten mit PMA/Calonophor und ConA

Die Leukozyten wurden wie unter Abschnitt 4.2 auf S. 36 beschrieben aus verschiedenen Organen gewonnen. PBMC und Bursaleukozyten wurden in Standardmedium auf eine Zelldichte von 1×10^7 Zellen / ml eingestellt und durch Zugabe von 50 ng PMA pro ml Medium für 24 Stunden bei 40 °C stimuliert. Zur Stimulation von Milzleukozyten mit PMA/Calonophor wurden die Zellen ebenfalls in Standardmedium auf eine Zelldichte von 1×10^7 / ml eingestellt, allerdings durch Zugabe von 10 ng PMA und 0,5 μ g Calonophor pro ml Medium 24 Stunden bei 40 °C stimuliert. Zur Stimulation mit ConA wurden Milzleukozyten mit RPMI 1640 mit 0,5 % FCS und 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung auf eine Zelldichte von 1×10^7 / ml eingestellt, mit 10 μ g ConA / ml Medium stimuliert und für 24 Stunden bei 40 °C kultiviert. Nach der Stimulation waren semiadhärent wachsende, großblasige Zellen (Blasten) mikroskopisch zu erkennen.

4.3.4 Zelllinien

Zelllinie	Spezies	Zell-Phänotyp	Wachstum	Kulturmedium	Referenz	Verwendung
293	Mensch	Embryonale Nierenfibroblasten	Adhärent	Standard	[70]	Stabile Transfektion
293T	Mensch	Embryonale Nierenfibroblasten	Adhärent	Standard	[70]	Transiente Transfektion
BWZ.36	Maus	Thymozyten	Adhärent	Standard	[71]	Immunisierung BWZ-Assay
SP2/0	Maus	Myelomzellen	Suspension	Standard	[72]	Fusion
HD11	Huhn	Makrophagen	Adhärent	HD11	[73]	BWZ-Assay Durchflusszytometrie
BM2	Huhn	Fibroblasten	Adhärent	HD11	[74]	BWZ-Assay
OU2	Huhn	Fibroblasten	Adhärent	HD11	[75]	BWZ-Assay
2D8	Huhn	B-Zellen	Suspension	Standard	[76]	BWZ-Assay
RP9	Huhn	B-Zellen	Suspension	HD11	[77]	BWZ-Assay
DT40	Huhn	B-Zellen	Suspension	HD11	[78]	BWZ-Assay
CU68	Huhn	B-Zellen	Suspension	Standard	[79]	BWZ-Assay
CU24	Huhn	T-Zellen	Suspension	HD11	[79]	BWZ-Assay
HD3	Huhn	Erythrozyten	Suspension	HD11	[80]	BWZ-Assay
LMH	Huhn	Leberfibroblasten	Adhärent	Standard	[81]	BWZ-Assay
UG9	Huhn	T-Zellen	Suspension	Standard	[82]	BWZ-Assay
855-23	Huhn	T-Zellen	Suspension	Standard	Von T. Göbel gestellt	BWZ-Assay
RP1	Huhn	T-Zellen	Suspension	Standard	[77]	BWZ-Assay
SL3	Fruchtfliege	Embryoblasten	Suspension	SL3	[83, 84]	Expression von TREM-A1-huIg

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

4.3.5 Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden gezählt, auf eine Zelldichte von 5×10^6 Zellen / ml Einfriermedium eingestellt und auf Kryoröhrchen verteilt. Diese wurde in eine zur Hälfte mit Isopropanol gefüllte Einfrierbox bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ und etwa $1 \text{ }^\circ\text{C} / \text{min.}$ heruntergekühlt. Bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ können Zellen bis zu einem Jahr gelagert werden, für eine längere Zeit empfiehlt sich eine Lagerung in flüssigem Stickstoff.

4.3.6 Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden im Kryoröhrchen schnellstmöglich in einem 37 °C Wasserbad aufgetaut und mit ca. 50 ml kaltem RPMI gewaschen. Das Zellpellet wurde in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine 25 cm² Zellkulturflasche gegeben.

4.3.7 Passagieren von Zellen

Von adhären wachsenden Zellen wurde das Kulturmedium vollständig abgenommen, einmal mit warmem PBS gewaschen, je nach Größe der Zellkulturflasche mit 3-10 ml 37 °C warmem PBS-EDTA überschichtet und etwa 10 min. im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit PBS durch Zentrifugation gewaschen, gezählt und in der gewünschten Dichte in Kulturmedium resuspendiert. Suspensionszellen wurden gezählt und durch Zentrifugation bzw. Verdünnung mit Kulturmedium auf die gewünschte Dichte eingestellt.

4.4 RNA-Präparation

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

Um eine Degradierung der RNA durch ubiquitär vorkommende RNasen zu verhindern, wurde ausschließlich mit RNase-freiem Einwegmaterial und Handschuhen gearbeitet. Arbeitsoberflächen, Geräte und Gegenstände wurden vor Arbeitsbeginn mit 10 % SDS abgewischt.

4.4.1 Material

TRIitydG® Reagenz³

Bei 4 °C aufbewahren

Chloroform ad analysis¹⁴

Isopropanol³

Wasser (für die Molekularbiologie) ³**75% Ethanol**

75	ml	Ethanol reinst ³
25	ml	Wasser ³

4.4.2 Durchführung

5 x 10⁷ bis 1 x 10⁸ Zellen wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 4 °C mit 225 x g pelletiert und in 1 ml TRIidtyG® mit Hilfe einer auf eine 1ml-Tuberkulinspritze aufgesetzten 20G-Kanüle resuspendiert. In flüssigem Stickstoff schockgefrorene und bei -80 °C gelagerte Gewebestückchen mit einem Gewicht von etwa 100 mg wurden in flüssigem Stickstoff transportiert und mit Hilfe eines Homogenisators sofort nach Entnahme aus dem Stickstoff in 1 ml TRIidtyG® homogenisiert. Nach 30 sec. langem Homogenisieren wurde die Probe auf Eis zwischengekühlt. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurde 200 µl Chloroform hinzugefügt, kurz geschüttelt, 2 min. bei RT inkubiert und dann für 15 min. bei 4 °C mit 12000 x g zentrifugiert, um die Phasentrennung zu erleichtern. Die obere, wässrige, RNA-haltige Schicht wurde in ein neues Röhrchen überführt und die RNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol gefällt. Dafür wurde das Gemisch kurz geschüttelt, 10 min. bei RT inkubiert, 30 min. bei -20 °C gefroren und anschließend 10 min. bei 4 °C mit 12000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt und das Pellet mit 1 ml 75 % Ethanol nochmals für 5 min. bei 4 °C mit 7500 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde nach Abkippen des Ethanols getrocknet und in einem der Größe des Pellets entsprechenden Volumen Wasser (zwischen 15 und 100 µl) gelöst und bei -80 °C gelagert. Die Konzentration wurde photometrisch, die Qualität der RNA im **Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer** nach Herstellerangaben mit dem **Agilent Eukaryote Total RNA Nano-Kit ¹** gemessen. Nur RNA, für die eine „RNA Integrity Number“ (RIN) von 7,5 oder mehr ermittelt wurde, wurde für eine Quantifizierung in der Real-time quantitativen PCR (siehe auch Abschnitt 4.7 auf S. 46) in komplementäre DNA umgeschrieben (siehe Abschnitt 4.5 auf S. 43).

4.5 cDNA-Synthese mittels reverser Transkription

Durch eine rekombinante reverse Transkriptase wurde Gesamt-RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, die dann als Matrize in der Polymerase-Ketten-Reaktion diente.

0,4 µg Gesamt-RNA wurden mit Hilfe des **Quantitect™ Reverse Transkription Kit**¹⁹ in cDNA umgeschrieben. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Reaktion wurde am Ende mit Wasser im Verhältnis 1:2 verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Bei der PCR kommt es durch eine hitzeresistente DNA-Polymerase mit Hilfe spezifischer Primer zur Amplifizierung einer bestimmten cDNA-Sequenz. In einem Thermocycler wird das PCR-Reaktionsgemisch 15 min. auf 96 °C erhitzt, um die Polymerase zu aktivieren. Darauf folgen die Denaturierung der cDNA für 30 sec. bei 96 °C, die Bindung der Primer an die beiden cDNA-Stränge für 30 sec. bei einer für die jeweiligen Primer spezifischen Temperatur und die Elongation für 2 min. bei einer für die Polymerase spezifischen Temperatur, die bei der Hot FIREPol® und Herculase® DNA-Polymerase bei 72 °C liegt. Diese letzten drei Schritte werden 35-mal wiederholt, bevor die Reaktion noch einmal für 10 min. bei der Polymerase-spezifischen Temperatur inkubiert wird. Nach Kühlung auf 4 °C wurde das PCR-Produkt entweder bis zur Weiterverwendung gekühlt aufbewahrt oder zur längeren Lagerung bei -20 °C gefroren.

4.6.1 Material

Hot FIREPol® DNA Polymerase²⁶

10 x PCR Puffer mit 15 mM MgCl₂¹³

Herculase ® Enhanced DNA Polymerase²⁸

Wegen Proof-reading Eigenschaft bei PCR mit anschließender Klonierung in Expressionsvektoren verwendet

10 x Herculase Puffer²⁸

Wasser für die Molekularbiologie³

dNTP Mix¹³

Primer 100 pmol/ μ l¹⁶

Gen bzw. Konstrukt	Primer mit Orientierung	Sequenz	Restriktionsenzym	Temp. (°C)
β -Aktin	17 (s)	TACCACAATGTACCCTGGC		55
β -Aktin	18 (as)	CTCGTCTTGTTTTATGCGC		55
MHC I	742 (s)	AAGGATCCATGGCCCAAGGAGTCTC TAC	BamH I	55
pcDNA3.1/BGH reverse priming site	162 (as)	GGCAACTAGAAGGCACAGTCGAGG		55
TREM-A1-V5	745 (as)	ATGAATTCCTAAGCAGTGTTCTC	EcoR I	55
TREM-A1-zeta-FLAG	793 (as)	ATGAATTCATCAGCTTTAGGAGG	EcoR I	55
TREM-A1-V5 bzw. TREM-A1-zeta-FLAG	807 (s)	ATGAATTCGAGAACATCACTACA	EcoR I	55
TREM-B1-(zeta)-FLAG	1148 (s)	ATGAATTCGCAGGAGAGGACACG	EcoR I	55
TREM-B1-zeta-FLAG	1149 (as)	ATGAATTCAGCATAGGGGGTCCT	EcoR I	55
TREM-B1-FLAG	1228 (as)	ATGAATTCCTATAGGTTGTGTC	EcoR I	55
TREM-B1-COMP-FLAG	1264 (s)	ATGGATCCATGGGCAGTTTTCCA	BamH I	55
TREM-B1-COMP-FLAG	1265 (as)	ATGGATCCAGCATAGGGGGTCCT	BamH I	55
TREM-A1-COMP-FLAG	1268 (s)	ATGGATCCATGGAGAACTCATG	BamH I	55
TREM-A1-COMP-FLAG	1269 (as)	ATGGATCCTGTCAGCACATCCAC	BamH I	55

Tabelle 2: Aufstellung der in der PCR verwendeten Primer.**4.6.2 Durchführung**

Als Mastermix wurden für einen einfachen Ansatz folgende Reagenzien in der angegebenen Reihenfolge gemischt:

2,8	μ l	Wasser
1,5	μ l	10 x Puffer
1,5	μ l	dNTP Mix 2,0 mM, Endkonzentration: 0,2 mM
3,0	μ l	Primer (s), 1:100 in Wasser verdünnt, Endkonzentration: 20 mM
3,0	μ l	Primer (as), 1:100 in Wasser verdünnt, Endkonzentration: 20 mM
0,2	μ l	DNA Polymerase, Endkonzentration: 1 Unit

Dazu wurden 3 μ l der gewünschten cDNA oder 3 μ l Wasser als Negativkontrolle pipettiert. Bei der Verwendung eines Plasmids als Matrize wurde dieses zuvor 1:1000 in Wasser verdünnt. Wie oben beschrieben wurden die verschiedenen Ansätze in einem Thermocycler automatisch aufgeheizt bzw. abgekühlt und anschließend entweder im Agarosegel analysiert oder bei -20 °C aufbewahrt.

4.7 Real-time quantitative PCR (qPCR)

Um eine Aussage darüber treffen zu können, wie viel höher oder niedriger ein bestimmtes Gen in einem Gewebe in Vergleich zu einem anderem Gewebe oder zu einer Kontrolle exprimiert wird, wurde cDNA von verschiedenen Geweben mit Hilfe genspezifischer Primer in der qPCR amplifiziert und in jedem Zyklus die Fluoreszenz des mit doppelsträngiger DNA interkalierenden Farbstoffes SYBR Green gemessen. Von besonderer Wichtigkeit waren dabei sowohl die Qualität der aus dem Gewebe gewonnenen RNA (siehe Abschnitt 4.4 auf S. 42) als auch die Wahl und Etablierung der verwendeten Primer, da SYBR Green auch mit Primerdimeren und unspezifischen Amplifikaten interkaliert.

4.7.1 Primer für die qPCR

4.7.1.1 Primerdesign

Das Design der Primer erfolgte mit Hilfe des Programms **Primer Express 3.0**⁴ (siehe Abschnitt 4.26.4 auf S. 86), wobei zur Verwendung in der qPCR spezielle Anforderungen an die Beschaffenheit der Primer gestellt wurden. Die Primerpaare sollen demnach dieselbe Bindungstemperatur aufweisen, etwa eine Länge von 18-25 Basen besitzen und möglichst keine Dimere mit sich selbst oder mit dem jeweils zweiten Primer bilden. Die Primer sollen außerdem so gewählt werden, dass das Amplifikat eine Länge zwischen 100 und 200 bp besitzt. Mit Hilfe des Programmes NCBI Blast (siehe Abschnitt 4.26.5 auf S. 86) wurden die Primer mit in den Datenbanken vorhandenen Einträgen abgeglichen, um möglichst ein allein für das gesuchte Gen spezifisches Primerpaar zu erhalten. Die Synthese der Primer wurde von der Firma MWG, Ebersberg, durchgeführt.

4.7.1.2 Etablierung der Primer für die qPCR

Die Primer wurden vor ihrem Einsatz in der qPCR in einer PCR mit der Hot FIREPol® Polymerase auf Hühner-cDNA getestet und in einem 2%igem Agarosegel analysiert. War nur eine distinkte Bande in der zu erwartenden Größe zu erkennen, wurde von diesem PCR-Produkt eine log₁₀-Verdünnungsreihe über 9 Stufen beginnend mit einer Verdünnung von 1:10 erstellt. Von dieser Verdünnungsreihe wurden je 3,3 µl der letzten 7 Stufen als Matrize für einen Testlauf in der qPCR eingesetzt, in deren Anschluss eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt wurde (siehe Abschnitt 4.7.2 auf S. 49). War auch hier nur ein spezifisches Amplifikat und die Bildung von Primerdimeren nur in der Abwesenheit eines Templates zu

erkennen, wurde das PCR-Produkt durch die Firma GATC, Konstanz, sequenziert (siehe Abschnitt 4.13 auf S. 58).

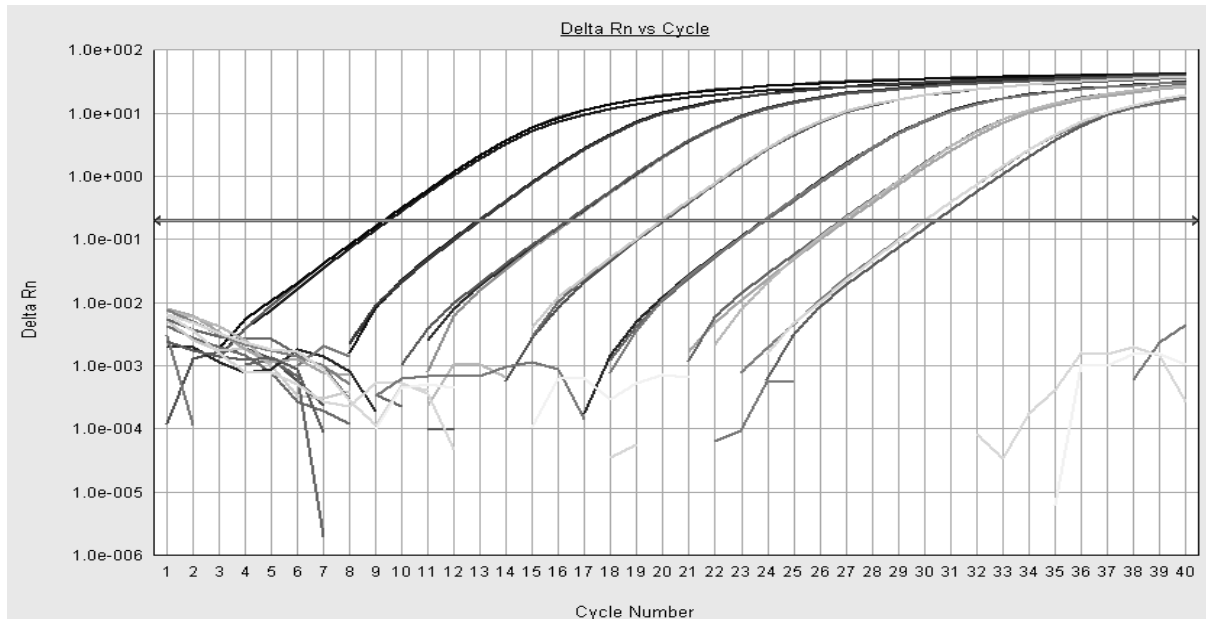


Abbildung 7: Beispiel für eine Standardkurve. Die 7 letzten Stufen des über 10 Stufen log₁₀-verdünnten PCR-Produktes wurden als Matrice in der qPCR eingesetzt. Als „Cycle threshold“ (Ct)-Wert wird die Anzahl der PCR-Zyklen bezeichnet, bei der die jeweilige Amplifikationskurve die horizontale Basislinie schneidet (siehe Abschnitt 4.7.3 auf S. 50). Die Proben wurden als Triplikate pipettiert.

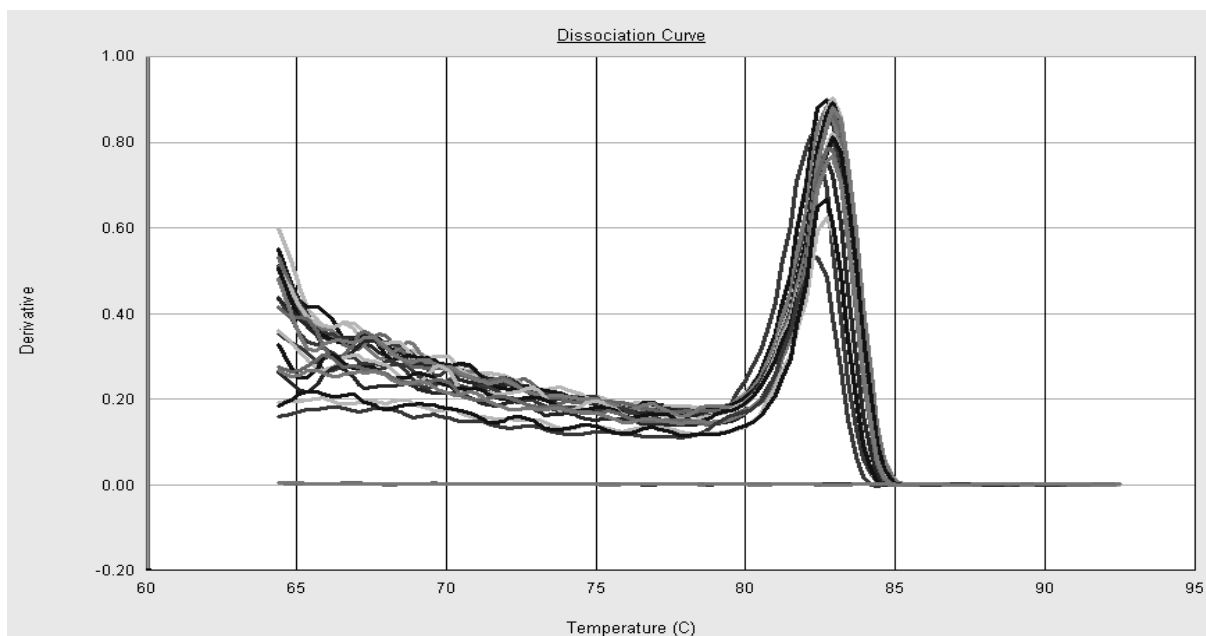


Abbildung 8: Schmelzkurvenanalyse des PCR-Produktes aus Abbildung 7. Die Analyse zeigt, dass nur ein einziges Amplifikat gebildet wurde, dessen Schmelztemperatur bei etwa 82,5 °C liegt. Die Primer bilden weder Primerdimere noch ein anderes Amplifikat.

4.7.1.3 Bestimmung der Effizienz der Primerpaare

Die Effizienz eines Primerpaares gibt an, wie oft eine Matrize im Laufe eines PCR-Zyklus amplifiziert wird. Im Optimalfall - der selten erreicht wird - kommt es zu einer Verdopplung der gewünschten Sequenz. Meist kommt es aber nur zu einer 1,7 – 1,9-fachen Amplifizierung. Zur Ermittlung der Effizienz wurden die „Cycle threshold“ (Ct)-Werte (siehe Abschnitt 4.7.3 auf S. 50) der Log10-Verdünnungsreihe in einer Standardgeraden aufgetragen, und rechnerisch daraus die Steigung dieser Geraden mit der Gleichung

$$y = mx + t$$

(mit m als Steigung der Geraden und t als Y-Achsenabschnitt) ermittelt. Die Effizienz E des Primerpaares errechnet sich dann mit Hilfe der Gleichung:

$$E = 10^{|1/m|}$$

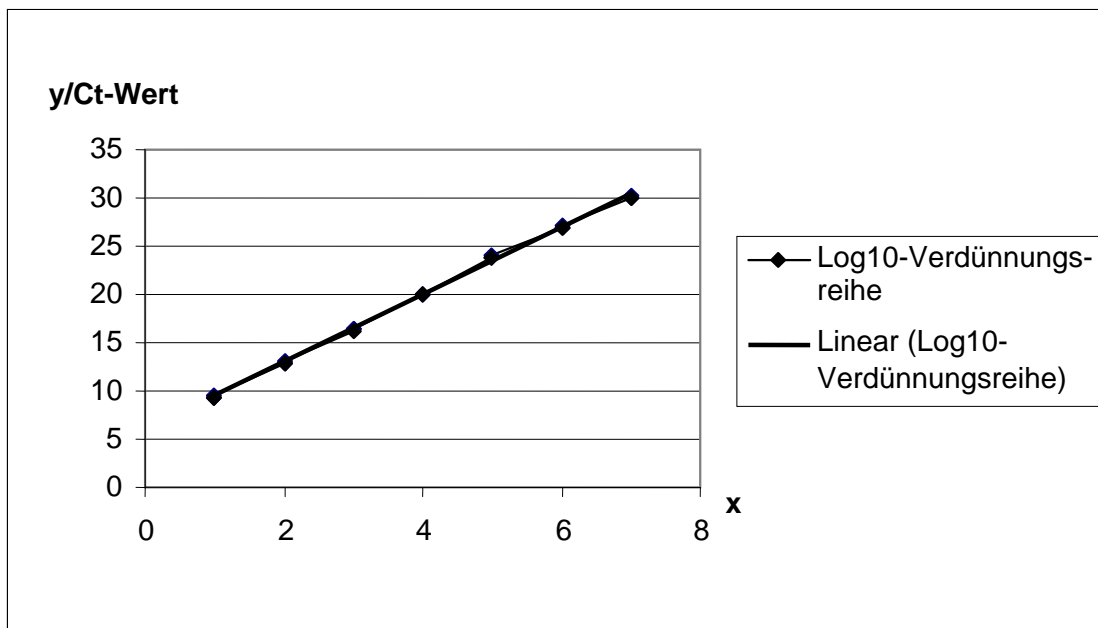


Abbildung 9: Ermittlung der Effizienz eines Primerpaares. Auf der y-Achse ist der Ct-Wert aufgetragen, auf der x-Achse die Verdünnungsstufe des eingesetzten PCR-Produktes, wobei das PCR-Produkt $1:10^{x+2}$ verdünnt eingesetzt worden ist. Daraus wurde die Geradengleichung $y = 3,4963x + 5,9405$ mit einem Korrelationskoeffizienten $R^2 = 0,9989$ errechnet. Für die Effizienz des Primerpaares ließ sich $E = 1,932$ ermitteln.

4.7.2 Durchführung der qPCR

Im Wesentlichen ist das Protokoll der qPCR dem der herkömmlichen PCR sehr ähnlich. Die Aktivierung der DNA-Polymerase erfolgt 15 min. bei 95 °C. Die beiden folgenden Schritte aus cDNA-Denaturierung für 30 sec. bei 95 °C und Primer-Anlagerung und Elongation für eine Minute bei für alle Primer gleichen Temperatur von 59 °C werden 40-mal wiederholt. Während der Phase der Primer-Anlagerung und Elongation erfolgt die Messung der Fluoreszenz bei 500 nm, da SYBR® Green mit doppelsträngiger DNA interkaliert. Im Anschluss daran erfolgt eine Schmelzkurvenanalyse, bei der es zu einer schrittweisen Erhöhung der Temperatur von 57 °C auf 95 °C kommt, um bei der für das Amplifikat spezifischen Denaturierungstemperatur die Freisetzung von SYBR® Green detektieren zu können. Auf diese Weise können Kontaminationen und unspezifische Amplifikate detektiert werden.

4.7.2.1 Material

2 x Power SYBR® Green PCR Master Mix ⁴

Wasser für die Molekularbiologie ³

Primer 100 pmol/µl ¹⁶

Gen	Primer mit Orientierung	Sequenz	Temp. (°C)	Effizienz
TREM-A1 transmembran	858 (s)	AGGCGACTCAGGAAGCAGGA	59	1,88
TREM-A1 transmembran	891 (as)	CAGCTTTAGGAGGGATGCTG	59	1,88
TREM-A1 Ig-Domäne	1138 (s)	TCCATCAGCGACAACATCCA	59	1,932
TREM-A1 Ig-Domäne	1139 (as)	CCCCCAGGTAGTTAGTTTTGCA	59	1,932
TREM-B1	1060 (s)	ATTGGTCCTAACCGTGCACTGTA	59	1,82
TREM-B1	1061 (as)	ATGTGCCAGAATCCTCTTTTCG	59	1,82
TREM-B2	1233 (s)	TGAGAGTCACCCTCCTGTTGCT	59	2,0
TREM-B2	1031 (as)	CTCGTTTTCAGGCTGTGTTGTG	59	2,0
18S rRNA	870 (s)	CATGTCTAAGTACACACGGGCGGTA	59	1,80
18S rRNA	871 (as)	GGCGCTCGTCGGCATGTATTA	59	1,80

Tabelle 3: Aufstellung der in der qPCR verwendeten Primer. Die genaue Lokalisation der Primer ist aus **Abbildung 14** und **Abbildung 15** auf S. 89f. ersichtlich.

4.7.2.2 Durchführung

Aus den oben erwähnten Reagenzien wurde ein Mastermix auf Eis pipettiert, in dem etwa 10 % Pipettierverlust einkalkuliert wurde, dessen Ansatz für 3 Triplikate von je 25 μ l sich wie folgt zusammensetzte:

4,95 μ l	Primer (s), 1:20 in Wasser verdünnt, Endkonzentration: 0,3 mM
4,95 μ l	Primer (as), 1:20 in Wasser verdünnt, Endkonzentration: 0,3 mM
28,05 μ l	Wasser
41,25 μ l	2 x <i>Power</i> SYBR® Green PCR Master Mix

Dazu wurden 3,3 μ l cDNA bzw. Wasser für die Negativkontrolle gegeben, das Gemisch auf 3 Dellen einer **96-Well Optical Research Plate**⁴ zu je 25 μ l verteilt und im **ABI 7300 Real Time PCR System** entsprechend der oben angegebenen Temperaturfolge aufgeheizt bzw. abgekühlt.

4.7.3 Auswertung

Ziel der Auswertung war es, eine Aussage darüber treffen zu können, um wie viel höher oder niedriger ein Gen in einem Gewebe im Vergleich zu einem Referenzgewebe exprimiert wird.

Die mit Hilfe der **ABI 7300 System Sequence Detection Software 1.3.1.**⁴ ermittelten Ct-Werte stellen die Schnittpunkte zwischen der Amplifikationskurve eines bestimmten Genes in einem Gewebe mit der manuell festgelegten Basislinie dar, wobei die Basislinie möglichst so gewählt wurde, dass sie die Amplifikationskurven am Beginn der exponentiellen Phase schneidet.

Im Programm Microsoft Excel wurde aus den Ct-Werten der in Triplikaten pipettierten Probe der Mittelwert (MW) gebildet, und von diesem der Mittelwert der Ct-Werte des Referenzgens („Housekeeping Gen“) desselben Gewebes abgezogen. Das Referenzgen sollte beim Einsatz einer konstanten Menge cDNA in verschiedenen Geweben in etwa gleich hoch exprimiert sein. Am besten schien dafür 18S rRNA geeignet zu sein. Der durch Subtraktion der beiden Mittelwerte erhaltene, auf das Referenzgen normalisierte Wert wurde als Δ CT bezeichnet (Normalisierung).

$$\Delta Ct_{\text{Gen X/Gewebe A}} = MW (Ct_{\text{Gen X/Gewebe A}}) - MW (Ct_{18S \text{ rRNA/Gewebe A}})$$

Der ΔCt -Wert des Referenzgewebes wurde vom ΔCt -Wert des mit diesem zu vergleichenden Gewebes abgezogen (Kalibrierung). Bei der Darstellung der Gewebeverteilung wurde als Referenzgewebe das Gewebe mit dem höchsten ΔCt -Wert gewählt, da in diesem folglich das bestimmte Gen am wenigsten exprimiert wurde. Der dadurch erhaltene Wert wurde als $\Delta\Delta Ct$ -Wert bezeichnet.

$$\Delta\Delta Ct_{\text{Gen X/Gewebe A}} = \Delta Ct_{\text{Gen X/Gewebe A}} - \Delta Ct_{\text{Gen X/Referenzgewebe}}$$

Um wie viel höher oder niedriger ein Gen in einem Gewebe im Vergleich zum Referenzgewebe exprimiert wird, lässt sich unter der Berücksichtigung der Effizienz E des für das bestimmte Gen spezifischen Primerpaares mit folgender Gleichung errechnen:

$$\text{Expression n} = E^{-\Delta\Delta Ct (\text{Gen X/Gewebe A})}$$

Gen X ist im Vergleich zum Referenzgewebe in Gewebe A n-fach exprimiert.

4.8 Agarosegelelektrophorese

4.8.1 Material

EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8,0)

186,1 g	EDTA Di-Natrium Dihydrat ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \times 2H_2O$) ³
20,0 g	Natriumhydroxid (NaOH) ³

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

0,5 x TBE Puffer

54,0 g	Tris(hydroxymethyl)aminomethan ³
27,5 g	Borsäure ³
20,0 ml	EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8,0)

Ad 10 l Aqua dest., bei RT lagern

1 % Agarose

0,5 g Agarose¹⁸
50 ml 0,5 x TBE Puffer

Vor Gebrauch ansetzen

6 x Loading Dye Solution (Ladepuffer)¹³**GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus¹³****GeneRuler™ 50bp DNA Ladder¹³****GeneRuler™ DNA Ladder Mix¹³****Stammlösung Ethidiumbromid**

10 mg Ethidiumbromid²⁵

Ad 1 ml Aqua dest., bei 4 °C aufbewahren. Zum Gebrauch 1:1000 in Aqua dest. verdünnen

4.8.2 Durchführung

Die 1 % Agarose wurde durch Erhitzen in einer Mikrowelle verflüssigt und anschließend in einer Elektrophoresekammer mit Probenaschenkamm gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde der Kamm gezogen und das Gel mit 0,5 x TBE überschichtet. Zu 1 µl 6 x Loading Dye Solution mit den Farbstoffen Bromphenolblau und Xylen Cyanol FF wurden 5 µl des PCR-Produktes pipettiert und in die Vertiefungen des Agarosegels gegeben. Die im Ladepuffer enthaltenen Farbstoffe waren Marker dafür, wie weit die Proben während der elektrophoretischen Auftrennung nach Anlegen einer konstanten Spannung von 120 V gewandert sind. War das Gemisch ausreichend weit aufgetrennt, wurde das Gel 30 min. in einer Ethidiumbromid-Gebrauchslösung unter Schwenken gefärbt und anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

4.9 Restriktionsenzymverdau und Gelaufreinigung

Restriktionsenzyme sind rekombinant hergestellte Endonukleasen, die bestimmte Nukleotidsequenzen (sog. Palindrome) erkennen und an diesen Stellen den DNA Strang schneiden. Werden verschiedene Vektoren bzw. über Agarosegele aufgereinigte PCR-Produkte mit dem gleichen Enzym geschnitten, können diese durch Ligation in unterschiedlicher Kombination wieder miteinander verbunden werden.

4.9.1 Material

Restriktionsenzym¹³

10 x Puffer (enzymspezifisch)¹³

Wasser (für die Molekularbiologie)³

4.9.2 Durchführung

Zum Beispiel Verdau eines Vektors zur Vorbereitung auf eine Ligation:

4,0	µg	Vektor
2,0	µl	10 x Puffer (enzymspezifisch)
1,0	µl	Restriktionsenzym
Ad 20 µl Wasser		

Der Ansatz wurde für zwölf Stunden bei der für das jeweilige Enzym spezifischen Temperatur inkubiert, auf ein Agarosegel aufgetragen, mit Ethidiumbromid gefärbt und die DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht, wie in Abschnitt 4.8 auf S. 51 beschrieben. Mit Hilfe eines Skapells wurde das Fragment in der gewünschten Länge herausgeschnitten, die DNA mit dem **DNA Isolation® Kit**³ nach Herstellerangaben aufgereinigt und die DNA-Konzentration photometrisch gemessen.

4.10 Ligation in Vektoren

4.10.1 Vektoren

Die Vektoren für die Ligation lagen bereits vor, wie in Abbildung 10 bis Abbildung 12 (Seite 54 - 56) beschrieben.

4.10.1.1 FLAG- bzw. V5-Konstrukte

Zur Erstellung eines FLAG- bzw. V5-markierten Konstrukts in voller Länge wurden der in Abbildung 10 dargestellte Vektor und das mit den in Tabelle 4 angegebenen Primern hergestellten PCR-Produkt, das mit dem angegebenen Restriktionsenzym geschnitten wurden, verwendet. Die Durchführung ist in Abschnitt 4.11 auf S. 57 beschrieben.

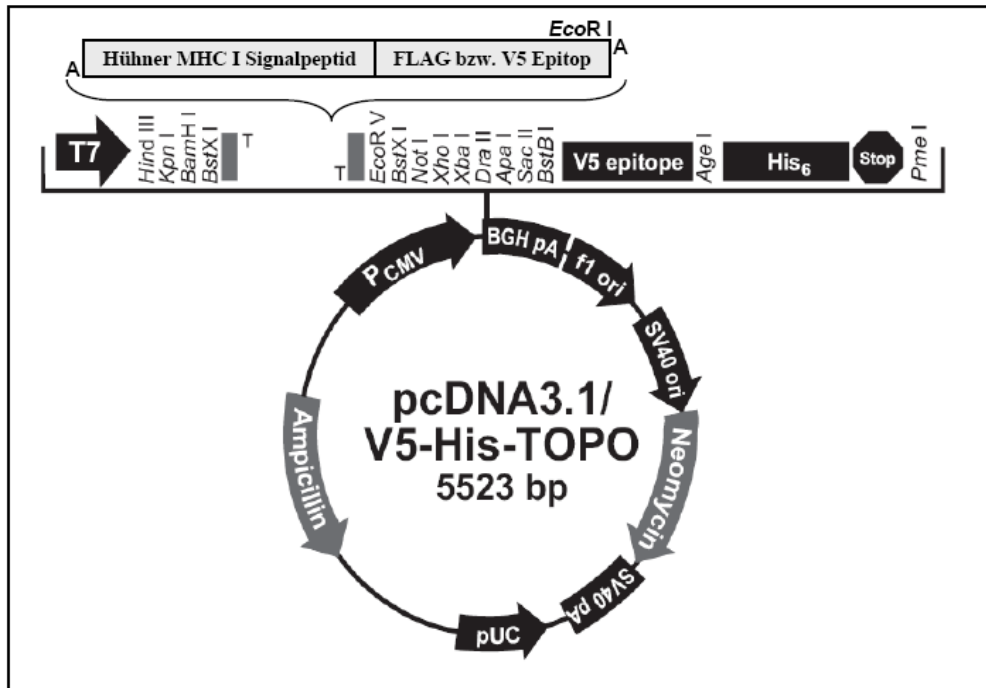


Abbildung 10: modifizierter pcDNA3.4/V5-His©TOPO® Vektor mit der Sequenz für das Signalpeptid von Hühner MHC I und für ein N-terminal lokalisiertes FLAG- bzw. V5-Epitop. Der dient zur Expression von TREM-A1 mit einem am extrazytoplasmatischen Ende lokalisiertes V5-Epitop, bzw. von TREM-B1 mit einem FLAG-Epitop. Der Vektor führt in Prokaryoten zu Ampicillin-, in Eukaryoten zu Neomycin-Resistenz.

Rezeptor	Primerkombination für V5- bzw. FLAG-Konstrukt	Restriktionsenzym
TREM-A1	745 / 807	EcoR I
TREM-B1	1148 / 1228	EcoR I

Tabelle 4: Auflistung der für die Herstellung der V5- bzw. FLAG-markierten Konstrukte verwendeten Primerkombinationen und Restriktionsenzyme. Die Sequenzen dieser Primer sind in **Tabelle 2** auf S. 45 aufgeführt. Die genaue Lokalisation ist in **Abbildung 14** und **Abbildung 15** auf S. 89f. zu sehen.

4.10.1.2 FLAG-zeta-Konstrukte für BWZ.36-Zellen

Zur Erstellung der FLAG-zeta-Konstrukte wurden der in Abbildung 11 dargestellte Vektor und die mit den in Tabelle 5 angegebenen Primern hergestellten PCR-Produkte, die mit dem angegebenen Restriktionsenzym geschnitten wurden, verwendet. Die Durchführung ist in Abschnitt 4.11 auf S. 57 beschrieben.

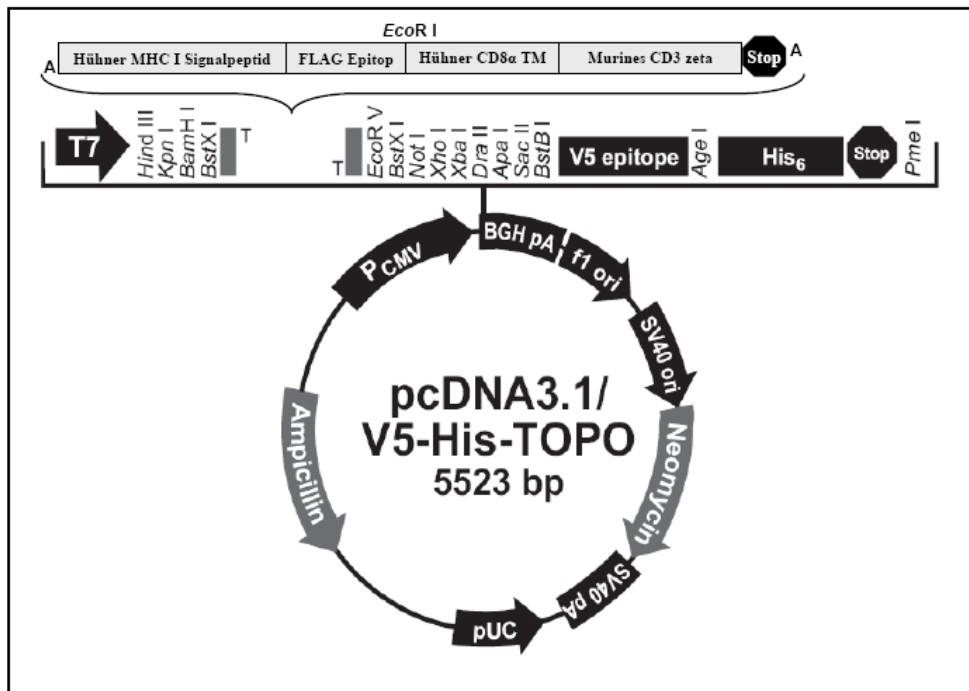


Abbildung 11: modifizierter pcDNA3.4/V5-His©TOPO® Vektor mit der Sequenz für das Signalpeptid von Hühner MHC I, für ein N-terminal lokalisiertes FLAG- bzw. V5-Epitop, für die transmembrane Region des Hühner-CD8α und des zytoplasmatischen murinen CD3ζ. Der dient zur Expression der Ig-Domänen von TREM-A1 und -B1 mit einem am extrazytoplasmatischen Ende lokalisierten FLAG-Epitop in BWZ.36-Zellen. Der Vektor führt in Prokaryoten zu Ampicillin-, in Eukaryoten zu Neomycin-Resistenz.

Rezeptor	Primerkombinationen für FLAG-zeta-Konstrukte	Restriktionsenzym
TREM-A1	793 / 807	EcoR I
TREM-B1	1148 / 1149	EcoR I

Tabelle 5: Auflistung der für die Herstellung der FLAG-zeta-Konstrukte verwendeten Primerkombinationen und Restriktionsenzyme. Die Sequenzen dieser Primer sind in **Tabelle 2** auf S. 45 aufgeführt. Die genaue Lokalisation ist in **Abbildung 14** und **Abbildung 15** auf S. 89f. zu sehen.

4.10.1.3 COMP-FLAG-Konstrukte für 293-Zellen

Zur Erstellung der *cartilage oligomeric matrix protein* (COMP)-FLAG-Konstrukte wurden der in Abbildung 12 dargestellte Vektor und die mit den in Tabelle 6 angegebenen Primern hergestellten PCR-Produkte, die mit dem angegebenen Restriktionsenzym geschnitten wurden, verwendet. Die Durchführung ist in Abschnitt 4.11 auf S. 57 beschrieben.

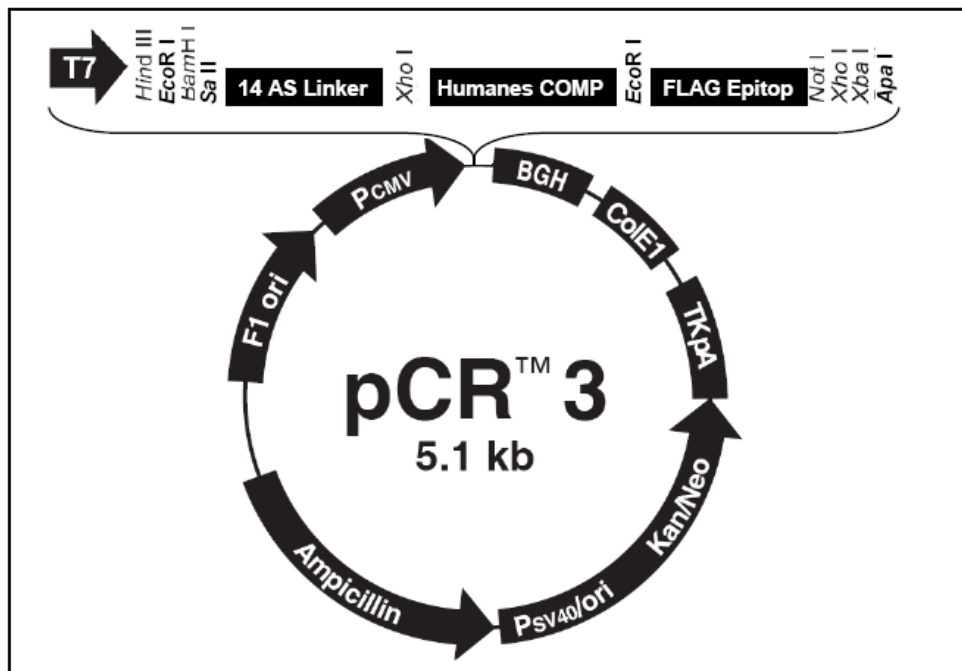


Abbildung 12: modifizierter pCRTM 3 Vektor, von Dr. Pascal Schneider, freundlicherweise zur Verfügung gestellt [85]. Der Vektor dient zur Expression von löslichen, in den Überstand sezernierten, pentameren Konstrukten aus dem extrazytoplasmatischen Bereichen von TREM-A1 bzw. TREM-B1 und dem humanem COMP-FLAG, mit einem C-terminalem FLAG-Epitop.

Rezeptor	Primerkombinationen für COMP-FLAG-Konstrukte	Restriktionsenzym
TREM-A1	1268 / 1269	BamH I
TREM-B1	1264 / 1265	BamH I

Tabelle 6: Auflistung der für die Herstellung der COMP-FLAG-Konstrukte verwendeten Primerkombinationen und Restriktionsenzyme. Die Sequenzen dieser Primer sind in **Tabelle 2** auf S. 45 aufgeführt. Die genaue Lokalisation ist in **Abbildung 14** und **Abbildung 15** auf S. 89f. zu sehen.

4.10.2 Material

T4 DNA Ligase¹³

5 x Rapid DNA Ligation Buffer¹³

Vektor

Insert

4.11 Durchführung

Die Ligation des Vektors mit dem Insert, beide mit demselben Enzym geschnitten, erfolgte nach folgendem Protokoll: Zu 50 ng des Vektors wurde die dreifache Molmenge an Insert pipettiert, dazu 4 µl 5 x Rapid DNA Ligation Buffer und 1 µl T4 DNA Ligase, der Ansatz auf 20 µl mit Wasser aufgefüllt und für 5 min. bei RT inkubiert. Das Ligationsprodukt wurde anschließend, wie in Abschnitt 4.12 aus S. 57 beschrieben, in chemokompetente TOP 10 E. coli transformiert, diese mit PCR getestet, vermehrt und das Plasmid aufgereinigt.

4.12 Transformation von chemokompetenten TOP 10 E. coli und Plasmidaufreinigung

4.12.1 Material

chemokompetente TOP 10 E. coli

SOC-Medium

LB-Agar

25 g LB-Pulvermedium³

15 g LB-Agar-Pulver³

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

LB-Medium

25 g LB-Pulvermedium³

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

Ampicillin 50 mg/ml

500 mg Ampicillin³

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

4.12.2 Durchführung

Zur Transformation in chemokompetente TOP 10 E. coli wurden 4 µl des Produktes einer TA-Klonierung oder einer Ligation zu den Bakterien gegeben und dieser Ansatz 30 min. auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte mittels Hitzeschock, wobei der Ansatz 30 sec. in ein 42 °C warmes Wasserbad gehalten wurde und anschließend eine Minute auf Eis gekühlt wurde. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurden die Bakterien eine Stunde bei 37 °C mit 200 rpm geschüttelt. Bis zu 150 µl des Gemisches wurden auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin als Selektionsantibiotikum ausplattiert und diese Platten 18 Stunden bei 37 °C bebrütet. Die entstandenen Kolonien wurde am nächsten Tag durch PCR getestet und die positiven Kolonien über Nacht in 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin vermehrt. Das Plasmid wurde mit dem **NucleoSpin® Plasmid Kit**¹² nach Anleitung des Herstellers aufgereingt, die DNA-Konzentration photometrisch gemessen und das Plasmid zur Sequenzanalyse, zum Restriktionsenzymverdau oder als Matrize für die PCR weiterverwendet.

4.13 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde von der Firma GATC, Konstanz durchgeführt. Die gewünschten Plasmide bzw. PCR-Produkte wurden in einer Konzentration von 200 ng/µl verschickt. Die Sequenzdaten konnten 3 Tage später über das Internet unter www.my-gatc.de heruntergeladen werden.

4.14 Transfektion eukaryotischer Zellen

293, 293T und 2D8-Zellen wurden mit Hilfe eines kationischen liposomalen Transfektionsreagenz transfiziert. Bei dieser Methode bindet die positiv geladene Oberfläche von polykationischen Liposomen sowohl negativ geladene DNA-Moleküle, als auch die negativ geladene Zelloberfläche. Der Liposomen/Polynucleotid-Komplex wird in die Zelle aufgenommen und das Gen exprimiert.

Zur Transfektion von BWZ.36-Zellen wurde die Elektroporation verwendet. Dabei wird die Zellmembran durch einen elektrischen Impuls kurzfristig permeabilisiert, wodurch das an die Zelle angelagerte Plasmid in die Zelle gelangt.

4.14.1 Transfektion von 293T- und 293-Zellen

293T-Zellen wurden für die transiente Expression von FLAG- oder V5-markierten Konstrukten verwendet, 293-Zellen für die stabile Expression des löslichen TREM-A1-COMP-FLAG-Konstruktes verwendet.

4.14.1.1 Material

Metafectene^{TM 6}

RPMI 1640¹⁰

Selektionsmedium

18	ml	RPMI 1640 ¹⁰
2	ml	FCS ⁵
320	µl	Stammlösung G418, siehe Abschnitt 4.3.1 auf S. 37, Endkonzentration: 800 µg/ml

4.14.1.2 Durchführung

$4,3 \times 10^5$ Zellen wurden in 500 µl Standardmedium in eine Delle einer 24-Lochplatte gesät und einige Stunden bei 37 °C inkubiert, um die Zellen adhären zu lassen. In einem sterilen Reagiergefäß wurden 0,7 µg Plasmid in 30 µl RPMI 1640 gelöst und in einem zweiten Röhrchen 2,5 µl Metafectene in 27,5 µl RPMI 1640 gegeben. Beide Ansätze wurden miteinander vermischt, 15 min. bei RT inkubiert und dann tropfenweise unter Schwenken der 24-Lochplatte auf die adhären Zellen pipettiert. Nach 24 bis 48 Stunden Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen analysiert.

Zur stabilen Expression in 293-Zellen wurden diese nach 24 Stunden durch Pipettieren gelöst, 20 µl in 20 ml Selektionsmedium überführt und auf eine 96-Flachlochplatte mit 200 µl / Delle verteilt. Nach etwa einer Woche waren erste stabile Klone zu erkennen und deren Zellkulturüberstand im COMP-FLAG-ELISA (siehe Abschnitt 4.19.5 auf S. 73) getestet.

4.14.2 Stabile Transfektion von 2D8-Zellen

2D8-Zellen wurden für die stabile Expression des TREMB1-FLAG-Konstruktes verwendet.

4.14.2.1 Material

Metafectene ProTM 6

RPMI 1640¹⁰

Selektionsmedium siehe Abschnitt 4.14.1.1 auf S. 59

4.14.2.2 Durchführung

$4,0 \times 10^5$ Zellen wurden in 500 μ l Standardmedium in eine Delle einer 24-Lochplatte gesät und einige Stunden bei 37 °C inkubiert. In einem sterilen Reagiergefäß wurden 0,5 μ g Plasmid in 25 μ l RPMI 1640 gelöst und in einem zweiten Röhrchen 1 μ l Metafectene ProTM in 24 μ l RPMI 1640 gegeben. Beide Ansätze wurden miteinander vermischt, 15 min. bei RT inkubiert und dann tropfenweise unter Schwenken der 24-Lochplatte auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden nach 24 Stunden durch Pipettieren gelöst, die 500 μ l in 20 ml Selektionsmedium überführt und auf eine sterile 96-Flachlochplatte mit 200 μ l/Delle verteilt. Nach etwa 2 Wochen waren erste stabile Klone zu erkennen, die mittels Durchflusszytometrie getestet (siehe Abschnitt 4.20 auf S. 73) wurden.

4.14.3 Stabile Transfektion von BWZ.36-Zellen

BWZ.36-Zellen wurden für die stabile Expression der TREM-A1- und TREMB1-zeta-FLAG-Konstrukte verwendet.

4.14.3.1 Material

1 x PBS siehe Abschnitt 4.2.1 auf S. 36

Standardmedium siehe Abschnitt 4.2.1 auf S. 36

PBS-EDTA siehe Abschnitt 4.2.1 auf S. 36

Selektionsmedium Abschnitt 4.14.1.1 auf S. 59

4.14.3.2 Durchführung

Zur Elektroporation wurden 3×10^6 BWZ.36-Zellen für 10 min. bei 4 °C mit 225 x g zentrifugiert, in 400 µl PBS resuspendiert und mit 25 µg Plasmid in eine Küvette überführt. Die Zellen wurden 10 min. auf Eis inkubiert, anschließend mit Hilfe eines Elektroporators mit einer Spannung von 200 V und einer Kapazität von 950 µF für 40 msec. elektroporiert und daraufhin sofort für 5 min. auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden komplett in ein 25 cm² Zellkulturgefäß mit 10 ml Standardmedium überführt und bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS-EDTA gelöst, für 10 min bei 4 °C mit 225 x g zentrifugiert und das Pellet in 20 ml Selektionsmedium resuspendiert. Die Zellen wurden auf eine sterile 96-Flachlochplatte mit 200 µl/Delle verteilt. Nach etwa 2 Wochen waren erste stabile Klone zu erkennen, die mittels Durchflusszytometrie (siehe Abschnitt 4.20 auf S. 73) getestet wurden.

4.15 BWZ-Reporterassay

Der BWZ-Reporterassay wurde verwendet, um Liganden für bekannte Rezeptoren zu finden. BWZ.36-Zellen exprimieren stabil ein Plasmid für das LacZ-Gen unter dem NFAT-Promotor. Kommt es zur Bindung eines Liganden an stabil mit einem Rezeptor-zeta-FLAG-Konstrukt transfizierte BWZ.36-Zellen, führt dies zur Phosphorylierung und Aktivierung der intrazytoplasmatischen ITAMs im murinen CD3ζ und in deren Folge zu einer Aktivierung des NFAT-Promotors. Die daraufhin gebildete β-Galaktosidase kann nach Lyse der Zellen detektiert werden, indem man als Substrat das gelbe Chlorphenolrot-β-D-Galactopyranosid zu dem Lysat gibt. Dieses wird durch die frei gewordene β-Galaktosidase zu Galaktose und Chlorphenolrot umgewandelt, so dass der Farbumschlag von gelb nach rot im Plattenphotometer bei 575 nm gemessen werden kann.

4.15.1 Material

Standardmedium siehe Abschnitt 4.2.1 auf S. 36

1 x PBS siehe Abschnitt 4.2.1 auf S. 36

Anti-FLAG M2® Monoclonal Antibody²⁵ auf 10 µg/ml in PBS verdünnt

Tris-HCl-Lösung (0,5 M pH 7,4)

6,05 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan³

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

Lysepuffer

25 ml Tris-HCl 0,5 M pH 7,4

25 µl Nonidet P40 (NP-40)³

250 µl EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8,0) siehe Abschnitt 4.8.1 auf S. 51

Ad 50 ml Aqua dest., bei RT lagern.

Puffer A

523,175 mg MOPS³

584,400 mg Natriumchlorid (NaCl)³

0,100 ml MgCl₂-Lösung (1 M)

Ad 100 ml Aqua dest., bei RT lagern.

25 x CPRG

100 mg Chlorophenolrot-β-D-Galactopyranosid (CPRG)²⁵

3,3 ml Puffer A

Bei -20 °C lagern, kurz vor Gebrauch im Dunkeln auftauen.

1 x CPRG

1 ml 25 x CPRG

24 ml Puffer A

Kurz vor Gebrauch ansetzen.

4.15.2 Durchführung

3 x 10⁵ stabil transfizierte BWZ.36-Zellen wurden in 500 µl Standardmedium in je eine Delle einer 24-Lochplatte verteilt, wobei die Dellen für die Negativ- und die Positivkontrolle mit 500 µl Standardmedium auf 1 ml Gesamtvolumen aufgefüllt wurden. Die Delle für die Positivkontrolle wurde zuvor 4 Stunden bei 37 °C mit 200 µl eines α-FLAG mAk in einer Konzentration 10 µg/ml in PBS beschichtet. Die Zellen, die auf das Vorhandensein eines

spezifischen Liganden hin untersucht werden sollten, wurden ebenfalls in 500 μl Standardmedium zu den BWZ.36-Zellen gegeben und für 24 Stunden bei 37 °C zusammen kultiviert. Wenn es sich um Zelllinien handelte, wurden 3×10^5 Zellen / Delle eingesät, von primären Zellen waren es jeweils 3×10^6 Zellen.

Am nächsten Tag wurden die Überstände verworfen und die Zellen vorsichtig mit 500 μl PBS gewaschen. Zur Bestimmung der β -Galaktosidase wurden die Zellen mit 50 μl Lysepuffer / Delle durch zweimaliges Einfrieren und Auftauen lysiert und das Lysat komplett in je ein 1,5 ml Röhrchen überführt und für 5 min. bei 4 °C mit 12000 x g zentrifugiert.

In eine 96-Flachlochplatte wurden nun von jedem Ansatz vorsichtig Duplikate zu je 20 μl Lysat pipettiert, ohne die pelletierte Zelldebris mit aufzunehmen. Nach Zugabe von 130 μl 1 x CPRG / Kavität wurde die Platte bei 37 °C inkubiert und nach 10 min, 2, 3, 4 und 18 Stunden im Plattenphotometer bei 575 nm gemessen.

4.16 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie wurde verwendet, um lösliches Protein, das von stabil transfizierten Zellen in den Zellkulturüberstand sezerniert wurde, aufzureinigen. Diese Methode basiert auf einer spezifischen und reversiblen Adsorption eines Moleküls an einen individuellen, matrixgebundenen Liganden.

4.16.1 Aufreinigung von TREM-A1-huIg

Das TREM-A1-huIg-Konstrukt ist ein chimäres Protein aus der extrazytoplasmatischen Ig-Domäne von TREM-A1 und dem CH₂- und CH₃-Bereich der konstanten Region des humanen Ig-Moleküls. Dieses Konstrukt wurde stabil in SL3-Zellen transfiziert. Die Aufreinigung dieses löslichen Proteins erfolgte mit Hilfe einer Protein-G-Säule.

4.16.1.1 Material

SL3-Medium siehe Abschnitt 4.3.1 auf S. 37

Stammlösung Kupfersulfat siehe Abschnitt 4.3.1 auf S. 37

Protein G Sepharose 4 Fast Flow ²

Dialysierschlauch, VISKING, 14 kDa cut off²⁵**Startpuffer**

1,424 g Di-Natriumhydrogenphosphat-di-hydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)³
auf 400ml Aqua dest. auffüllen

0,936 g Natrium-di-hydrogenphosphat-mono-hydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1\text{H}_2\text{O}$)³
auf 300ml Aqua dest. auffüllen

soviel NaH_2PO_4 Lösung in die Na_2HPO_4 Lösung geben, bis pH 7,0 erreicht, bei 4 °C lagern

Elutionspuffer (pH 2,5)

3,75 g Glycin³

Ad 500 ml Aqua dest., mit HCl auf pH 2,5 einstellen, bei 4 °C lagern

Trislösung (1 M)

1,211 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan³

Ad 10 ml Aqua dest., auf pH 8,0 einstellen, bei RT lagern

Guanidinhydrochlorid (6 M)

57,32 g Guanidinhydrochlorid³

Ad 100 ml Aqua dest., bei RT lagern

Dialysepuffer (pH 7,8)

1,65 g Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)³

29,03 g Di-Natriumhydrogenphosphat-di-hydrat($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)³

45,00 g Natriumchlorid (NaCl)³

Ad 5 l Aqua dest., vor Gebrauch ansetzen.

20%iger unvergällter Ethanol³**4.16.1.2 Durchführung**

SL3-Zellen, die stabil mit einem TREM-A1-huIg-Konstrukt in einem pRmHa-3 Puromycin Resistenz-Vektor transfiziert wurden, wurden freundlicherweise von Dr. Birgit Viertlböck zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden bei RT in SL3-Medium kultiviert, langsam von dem serumhaltigen Medium auf serumfreies SL3-Medium (ohne FCS) umgestellt und solange

passagiert, bis die Zellen in 175 cm² Zellkulturgefäßen mit insgesamt etwa 600 ml Medium ca. 90 % Konfluenz erreicht hatten. Darauf wurde durch Zugabe von 1 µl Kupfersulfat-Stammlösung pro ml Medium die Produktion des löslichen TREM-A1-huIg-Konstrukts induziert. Nach drei Tagen wurde der serumfreie Zellkulturüberstand abgenommen und für 10 min. mit 716 x g zentrifugiert

Zur Aufreinigung des löslichen TREM-A1-huIg wurde eine Protein G Sepharose Säule verwendet, die zwischen einer peristaltischen Pumpe, deren Laufgeschwindigkeit auf 1 ml/min. eingestellt wurde, und der Monitor UV-1 Einheit angeschlossen und mit mindestens 30 ml Startpuffer äquilibriert wurde. Der Zellkulturüberstand wurde dazu 1:2 mit Startpuffer verdünnt auf die Säule aufgetragen und anschließend noch solange Startpuffer auf die Säule gegeben, bis die Extinktion bei 280 nm zur Basislinie zurückgekehrt war. TREM-A1-huIg wurde mit Hilfe des Elutionspuffer wieder von der Säule gelöst und das Eluat sofort mit 1 M Trislösung auf pH 7,0 eingestellt. Das so aufgereinigte Protein wurde in einem Dialysierschlauch überführt, dreimal mit 5 l Dialysepuffer umgepuffert und die Konzentration im **BC-Protein-Assay**³⁰ nach Anleitung des Herstellers bestimmt.

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

4.16.2 Aufreinigung von TREM-A1-COMP-FLAG

Das TREM-A1-COMP-FLAG-Konstrukt ist ein chimäres Protein aus der extrazytoplasmatischen Ig-Domäne von TREM-A1 und dem humanem COMP, das mit einem FLAG-Epitop markiert ist. Die COMP-Domänen lagern sich zu Pentameren zusammen. Dieses Konstrukt wurde stabil in 293-Zellen transfiziert. Die Aufreinigung dieses löslichen Proteins erfolgte mit Hilfe einer Anti-FLAG-Säule.

4.16.2.1 Material

Standardmedium siehe Abschnitt 4.3.1 auf S. 37

Ultrafiltration Membran, 30 kDa cut off¹⁵

Anti-FLAG-Säule 4 ml⁷

Anti-FLAG M2 Agarose²⁵**Dialysierschlauch, VISKING, 14 kDa cut off**²⁵**TBS (pH 7,4)**

7,88 g Tris-Hydrochlorid³

8,77 g Natriumchlorid (NaCl)³

Ad 1000 ml Aqua dest., auf pH 7,4 einstellen, bei 4 °C lagern

Elutionspuffer (pH 3,5)

3,75 g Glycin³

Ad 500 ml Aqua dest., mit HCl auf pH 3,5 einstellen, bei 4 °C lagern

Trislösung (1 M) siehe Abschnitt 4.16.1.1 auf S. 63

Dialysepuffer (pH 7,8) siehe Abschnitt 4.16.1.1 auf S. 63

10 % Natriumazid

10 g Natriumazid (NaN₃)³

Ad 100 ml PBS, bei RT lagern

50% Glycerin-TBS

50 ml Glycerin³

50 ml TBS

0,2 ml 10 % Natriumazid

Vor Gebrauch ansetzen

4.16.2.2 Durchführung

293-Zellen, die stabil mit dem TREM-A1-COMP-FLAG-Konstrukt transfiziert waren und dieses als lösliches Protein in den Zellkulturüberstand abgaben, wurden solange in Standardmedium expandiert, bis ca. 900 ml Überstand vorhanden war. Dieser wurde für 10 min. bei 4 °C mit 225 x g zentrifugiert und im COMP-FLAG-ELISA (siehe Abschnitt 4.19.5

auf S. 73) getestet. Die positiven Überstände wurden gepoolt, in einer Rührzelle über der Ultrafiltrationsmembran bei 4 °C ankonzentriert und anschließend sterilfiltriert.

Das Konzentrat wurde über eine Anti-FLAG-Säule aufgereingt, an der das lösliche COMP-FLAG-Konstrukt binden konnte. Diese Säule wurde zuvor zweimal mit 4 ml TBS gespült, dann mit 500 µl Anti-FLAG-M2 Agarose beladen, mit dreimal 4 ml Elutionspuffer (pH 3,5) äquilibriert und fünfmal mit 4 ml TBS gewaschen. Danach wurde das Konzentrat auf die Säule gegeben und diese anschließend 15-mal mit 4 ml TBS gewaschen. TREM-A1-COMP-FLAG wurde durch Zugabe von dreimal 1 ml Elutionspuffer in maximal 20 min. wieder von der Agarose gelöst und das Eluat sofort mit jeweils 20 µl Trislösung neutralisiert.

Das so aufgereinigte Protein wurde in je einem Dialysierschlauch überführt, dreimal mit 5 l Dialysepuffer umgepuffert und die Konzentration im **BC-Protein-Assay**³⁰ nach Anleitung des Herstellers bestimmt.

Um die Säule zu regenerieren, wurde sie nach der Elution erst dreimal mit 4 ml TBS gewaschen, dann dreimal mit Elutionspuffer für maximal 20 min. und zuletzt fünfmal mit 4 ml TBS. Die letzten 10 Waschschrte und die Aufbewahrung bei 4 °C erfolgten mit jeweils 4 ml 50% Glycerin-TBS.

4.17 Herstellung polyklonaler Antiseren

4.17.1 Material

Aufgereinigtes TREM-A1-huIg aus SL3 siehe Abschnitt 4.16.1 auf S. 63

Freund'sches komplettes Adjuvanz (FCA)²⁵

Freund'sches inkomplettes Adjuvanz (FIA)²⁵

4.17.2 Durchführung

Zur Gewinnung eines polyklonalen Antiserums wurde ein Kaninchen nach Blutentnahme zur Gewinnung eines Präimmuserums (Kontrollserum) mit TREM-A1-huIg immunisiert. Dazu wurde bei der Erstimmunisierung 500 µl TREM-A1-huIg mit 500 µl FCA emulgiert und je zur Hälfte subkutan und intramuskulär injiziert. Bei den folgenden zwei Immunisierungen im Abstand von je vier Wochen wurde FIA anstelle FCA verwendet.

Etwa drei Wochen nach der dritten Immunisierung wurde im Abstand von zwei bis vier Wochen 20-40 ml Blut aus der mittleren Ohrarterie zur Serumgewinnung entnommen. Das Vollblut wurde zur Gerinnung zwei Stunden bei 37 °C inkubiert und das Serum nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4 °C mit 3000 x g abgenommen. Dieses wurde nochmals 10 min. bei 4 °C und 800 x g zentrifugiert und in Aliquots von je 500 µl bei -20 °C gelagert.

4.18 Herstellung monoklonaler Antikörper

Zur Herstellung eines spezifischen mAk werden B-Lymphozyten aus der Milz einer mit dem Antigen immunisierten Maus mit Myelomzellen, die einen Enzymdefekt besitzen, vereinigt (Fusion) und auf diejenigen Hybridomzellen selektiert, die den spezifischen Antikörper produzieren (Screening).

4.18.1 Immunisierung

Zur Immunisierung wurden stabil mit einem TREM-A1-FLAG-zeta-Konstrukt transfizierte BWZ.36-Zellen (siehe Abschnitt 4.14.3 auf S. 60) gezählt und 1×10^7 Zellen in 200 µl PBS resuspendiert. Diese wurden mit Hilfe einer 1ml-Tuberkulinspritze mit 22G-Kanüle intraperitoneal in eine Balb/c-Maus viermal im Abstand von drei Wochen gespritzt. Drei Tage vor der Fusion erfolgte die letzte Immunisierung.

4.18.2 Fusion

Myelomzellen können mit Lymphozyten fusioniert werden, indem man ihnen im engen Kontakt zueinander durch Polyethylenglycol Wasser entzieht und sich daraufhin die Zellmembranen vereinigen.

SP2/0-Zellen fehlt das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT), das zum Wachstum im HAT-Medium notwendig ist. Lymphozyten besitzen keinen solchen Enzymdefekt, sterben aber nach einiger Zeit in Kultur ab, da sie nicht proliferieren können. Die einzigen in HAT-Medium lebensfähigen Zellen sind die Hybridome.

4.18.2.1 Material

RPMI 1640⁵

1 x PBS siehe Abschnitt 4.2.1 auf S. 36

Polyethylenglycol 1500 (PEG)²¹

HAT-Medium siehe Abschnitt 4.3.1 auf S. 37

4.18.2.2 Durchführung

Die Maus wurde drei Tage nach der letzten Immunisierung durch zervikale Dislokation getötet, die Bauchhöhle eröffnet und die Milz steril entnommen. Diese wurde mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein Metallsieb mit der Maschenweite 0,75 mm x 0,75 mm gedrückt und die Zellsuspension bei RT mit 225 x g 10 min. zentrifugiert. SP2/0-Zellen aus sechs 175 cm² Zellkulturflaschen wurden ebenso zentrifugiert, beide Zellpellets jeweils in 10 ml RT warmen RPMI 1640 resuspendiert und gezählt. Milzzellen und SP2/0-Zellen wurden im Verhältnis 1:3 in einem Röhrchen wie oben beschrieben zentrifugiert, der Überstand vollständig abgenommen und das Pellet vorsichtig in der verbleibenden Flüssigkeit gelöst. Unter Schwenken wurde 1,5 ml 37 °C warmes PEG innerhalb einer Minute hinzugefügt und diese Zellsuspension eine Minute bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Es folgte die Zugabe von 37 °C warmen RPMI 1640 nach folgendem Schema: 1 ml innerhalb von 30 sec., 3 ml in 30 sec. und 16 ml in 60 sec. Die Zellsuspension wurde bei RT mit 225 x g 5 min. zentrifugiert, anschließend 5 min, bei 37 °C ins Wasserbad gestellt und dann erst der Überstand komplett abgenommen. Das Zellpellet wurde in 50 ml 37 °C warmen HAT-Medium resuspendiert, gezählt, auf $1,25 \times 10^6$ Zellen pro ml HAT-Medium verdünnt und auf 20 sterile 96-Flachlochplatten verteilt. Die ersten Hybridome waren nach ca. 1 Woche zu erkennen.

4.18.3 Selektion auf bestimmte Hybridome (Screening)

Die in den Hybridom-Überständen enthaltenen Antikörper wurden zum einen in einem Screening-ELISA, wie er in Abschnitt 4.19.4 auf S. 73 beschrieben ist, getestet, zum andern aber auch mit Hilfe der Durchflusszytometrie (siehe Abschnitt 4.20 auf S. 73) auf der stabil mit TREM-A1-zeta-FLAG transfizierten BWZ.36-Zelllinie und auf untransfizierten BWZ.36-Zellen. Die positiv getesteten Klone wurden im HT-Medium (siehe Abschnitt 4.3.1 auf S. 37)

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

4.18.4 Isotypenbestimmung

Die spezifischen mAk wurden durch Immunphänotypisierung (siehe Abschnitt 4.20 auf S. 73) der stabil mit TREM-A1-zeta-FLAG transfizierten BWZ.36-Zelllinie auf ihre Immunglobulin-Subklasse (IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ und IgM) hin untersucht. Dafür wurden fünf verschiedene Kavitäten mit dem gleichen primären Antikörper gefärbt und als sekundäre Antikörper die verschiedenen Isotyp-spezifischen FITC-markierten Konjugate verwendet. Nur bei dem richtigen Isotyp-spezifischen sekundären Antikörper konnte die Bindung der primären mAk detektiert werden.

4.19 ELISA

4.19.1 Material

Beschichtungspuffer pH 9,6

3,11 g Dinatriumcarbonat (Na₂CO₃)³

6,00 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃)³

Ad 1000 ml A. bidest., bei 4 °C lagern

PBS-T (0,05 % Tween20)

0,5 ml Tween20³

Ad 1000 ml PBS, bei RT lagern

5 % Magermilchpulverlösung

5 g Magermilchpulver³

Ad 100 ml PBS-T, vor Gebrauch herstellen

2 % BSA-PBS-Lösung

2 g Bovines Serumalbumin (BSA)³

Ad 100 ml PBS (steril), vor Gebrauch herstellen

TMB Puffer

8,2	g	Na-Acetat (CH_3COONa) ³
3,15	g	Zitronensäure-Monohydrat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{xH}_2\text{O}$) ³

Ad 1000 ml A. bidest., bei 4 °C lagern

TMB Stammlösung

6	mg	3,3';5,5'Tetramethylbenzidin (TMB) ³
---	----	---

Ad 1 ml DMSO, lichtgeschützt bei RT lagern

TMB Gebrauchslösung

332	µl	TMB Stammlösung
10	ml	TMB Puffer, 37 °C
3,3	µl	30 % H_2O_2 ³

In der aufgeführten Reihenfolge vermischen und sofort verwenden

1 M Schwefelsäure

472	ml	A. dest.
28	ml	H_2SO_4 96 % ³

Bei RT aufbewahren

Aufgereinigtes TREM-A1-huIg aus SL3 siehe Abschnitt 4.16.1 auf S. 63

Aufgereinigtes TREM-A1-COMP-FLAG aus 293 siehe Abschnitt 4.16.2 auf S. 65

Aufgereinigtes CD200-A-COMP-FLAG aus 293, freundlicherweise von Dr. B. Viertböck als Negativkontrolle zur Verfügung gestellt

Antikörper:

Goat-anti-rabbit-IgG(H+L)-HRP¹¹ 1:10000 in PBS-T verdünnen

Goat-anti-mouse-IgG(H+L)-HRP¹¹ 1:10000 in PBS-T verdünnen

Anti-FLAG M2® Monoclonal Antibody²⁵ auf 1 µg/ml in Beschichtungspuffer verdünnt

Anti-FLAG M2® Monoclonal Antibody-POD Conjugate²⁵ 1:5000 in PBS-T verdünnen

4.19.2 Durchführung

Je nach Aufbau des ELISA musste das Protokoll entsprechend geändert werden. Deswegen soll an dieser Stelle nur das allgemeine Vorgehen erläutert werden. Spezielle Abweichungen davon sind in den folgenden Abschnitten dargestellt.

Eine NUNC-Maxisorp® Polystyren 96-Lochplatte wurde mit 100 µl eines in Beschichtungspuffer verdünnten Antigens bzw. Antikörpers pro Kavität bei 4 °C über Nacht beschichtet. Die Platte wurde dreimal mit PBS-T gewaschen und die noch freien Bindungsstellen 60 min. bei 37 °C mit 200 µl Blockierlösung pro Delle (5%ige Magermilchpulverlösung bzw. 2%-BSA-PBS) geblockt. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS-T erfolgte je nach Aufbau des ELISA eine oder zwei Inkubationen für jeweils 90 min. bei 37 °C mit je nach Blockierlösung entweder in 5%iger Magermilchpulverlösung bzw. in 1%-BSA-PBS verdünntem Antigen oder Antikörper, mit einem Volumen von 100 µl/Delle. Nach dem Waschen der Platte wurde der speziespezifische, Peroxidase-markierte sekundäre Antikörper je nach Blockierlösung entweder in 5%iger Magermilchpulverlösung oder in 1%-BSA-PBS verdünnt mit 50 µl / Kavität für 90 min. bei 37 °C inkubiert. Die Platte wurde wiederum gewaschen und mit 100 µl TMB-Gebrauchslösung / Kavität für ca. 10 min. im Dunkeln bei RT inkubiert. Der dabei entstandene Farbumschlag wurde durch Zugabe von 50 µl 1 M Schwefelsäure / Kavität abgestoppt und Plattenphotometer bei 450 nm gemessen.

4.19.3 ELISA mit dem Kaninchenserum

Zum Test des Kaninchensersums bzw. zum Nachweis der Konformation von TREM-A1-COMP-FLAG wurde eine 96-Lochplatte mit 200 µl/Delle einer Lösung aus 1 µg TREM-A1-huIg, TREM-A1-Peptid bzw. TREM-A1-COMP-FLAG pro ml Beschichtungspuffer über Nacht bei 4 °C beschichtet. Nach Blockieren freier Bindungsstellen mit 5 %iger Magermilchpulverlösung mit 200 µl/Delle für 1 Stunde bei 37 °C, wurde Kaninchenserum ab einer Verdünnungsstufe von 1:50 bzw. 1:25 in Blockierlösung über 11 Stufen log₂ titriert und mit 100 µl / Kavität 90 min. bei 37 °C inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde goat-anti-rabbit-IgG(H+L)-HRP in einer Verdünnung von 1:10000 in Blockierlösung mit 50 µl/Delle für 90 min. bei 37 °C verwendet. Der ELISA wurde wie oben beschrieben für etwa 10 min. entwickelt.

4.19.4 ELISA zur Selektion bestimmter Hybridome

Um aus den bei der Fusion gewachsenen Hybridomen denjenigen Klon zu finden, der spezifisch Antikörper gegen TREM-A1 bildet, wurde eine 96-Lochplatte mit 200 µl/Delle und 1 µg TREM-A1-huIg/ml Beschichtungspuffer über Nacht bei 4 °C beschichtet. Die freien Bindungsstellen wurden mit 200 µl 2 % BSA-PBS pro Kavität für eine Stunde bei 37 °C blockiert und als primärer Antikörper 100 µl steril abgenommener Zellkultur-Überstand der Hybridome für 90 min. bei 37 °C eingesetzt. Als sekundärer Antikörper wurde goat-anti-mouse-IgG(H+L)-HRP in einer Verdünnung von 1:10000 in 1 % BSA-PBS verwendet und der ELISA wie oben beschrieben für etwa 10 min. entwickelt.

4.19.5 ELISA zum Nachweis von COMP-FLAG-Konstrukten

Um diejenigen Kone stabil transfizierter 293-Zellen zu finden, die ein lösliches FLAG-markiertes COMP-Konstrukt bilden, wurden eine 96-Lochplatte mit 200 µl/Delle und 1 µg Anti-FLAG M2® Monoclonal Antibody pro ml Beschichtungspuffer über Nacht bei 4 °C beschichtet. Die freien Bindungsstellen wurden mit 200 µl 5 % Magermilchpulverlösung /Kavität für eine Stunde bei 37 °C blockiert und daraufhin 100 µl steril abgenommener Zellkultur-Überstand für 90 min. bei 37 °C eingesetzt. Anti-FLAG M2®-POD-Conjugate wurde in einer Verdünnung von 1:5000 in PBS-T als sekundärer Antikörper mit 50 µl/Delle für 90 min. bei 37 °C verwendet. Die Platte wurde mit 100 µl TMB-Gebrauchslösung/Delle für 60 min. bei RT im Dunkeln inkubiert und die Reaktion wie oben beschrieben abgestoppt.

4.20 Durchflusszytometrie

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

Phycoerythrin (PE, FL-2-Kanal) emittierte Licht gibt an, welche Antigene auf der Zelloberfläche vorhanden sind.

4.20.1 Material

Fluo-Puffer (1 % BSA, 0,01 % NaN₃)

10 g Bovines Serumalbumin (BSA) ³

1 ml 10 % Natriumazid, siehe Abschnitt 4.16.2.1 auf S. 65

Ad 1000 ml PBS, bei 4 °C lagern

Aufgereinigtes TREM-A1-huIg aus SL3 siehe Abschnitt 4.16.1 auf S. 63, auf 35 µg/ml in Fluo-Puffer verdünnt

Aufgereinigtes TREM-A1-COMP-FLAG aus 293 siehe Abschnitt 4.16.2 auf S. 65, auf 35 µg/ml in Fluo-Puffer verdünnt

Aufgereinigtes CHIR-B2-huIg, freundlicherweise von Dr. B. Viertböck als Negativkontrolle zur Verfügung gestellt, auf 35 µg/ml in Fluo-Puffer verdünnt

Primäre Antikörper

Goat-anti-human-Ig(H+L)-BIOT ²⁷, 1:1000 in Fluo-Puffer verdünnt

Anti-FLAG-M2® Monoclonal Antibody ²⁵, IgG₁, auf 3 µg/ml in Fluo-Puffer verdünnt

Ku11, IgG₁, Zellkulturüberstand [86]

Direktkonjugierte Antikörper ²⁷

Anti-CD3-FITC 1:20

Anti-Bu1-FITC 1:100

Jeweils in der angegebenen Verdünnung mit Fluo-Puffer verdünnen

Sekundäre Antikörper ²⁷

Goat-anti-mouse-Ig(H+L)-FITC 1:50

Goat-anti-mouse-IgG₁-FITC 1:50

Goat-anti-mouse-IgG_{2a}-FITC 1:50

Goat-anti-mouse-IgG_{2b}-FITC 1:50

Goat-anti-mouse-IgM-FITC 1:50

Goat-anti-mouse-Ig(H+L)-PE 1:300

Goat-anti-mouse-IgM-PE 1:300

Streptavidin-FITC 1:50

Jeweils in der angegebenen Verdünnung mit Fluo-Puffer verdünnen

4.20.2 Durchführung

In die Vertiefung einer 96-Rundlochplatte wurden 5×10^5 Zellen pipettiert, diese durch Zentrifugation bei $716 \times g$ pelletiert und bei einer Einfachfärbung 30 min. mit $50 \mu\text{l}$ des gewünschten primären Antikörpers auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit $200 \mu\text{l}$ Fluo-Puffer durch Zentrifugation bei $716 \times g$ gewaschen und mit $30 \mu\text{l}$ verdünntem sekundären Antikörper für 30 min. im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach erneutem Waschen der Zellen wurden diese zusammen mit $200 \mu\text{l}$ Fluo-Puffer in geeignete Proben-Röhrchen überführt, im FACScan gemessen und anschließend mit dem Computerprogramm **CellQuest™** analysiert.

Sollten zwei verschiedene Oberflächenantigene gleichzeitig angefärbt werden (Doppelfärbung), wurden beide primären Antikörper, beide isotypenspezifischen sekundären Antikörper bzw. ein isotypenspezifischer Antikörper mit einem direktkonjugierten Antikörper jeweils zusammen inkubiert.

Zum Nachweis der Bindung von TREM-A1 an seinen Liganden, wurden die Zellen zusätzlich 30 min. mit $30 \mu\text{l}$ des verdünnten chimären Rezeptor-Konstruktes auf Eis inkubiert und anschließend mit $200 \mu\text{l}$ Fluo-Puffer durch Zentrifugation bei $716 \times g$ gewaschen. Das COMP-FLAG-Konstrukt wurde mit anti-FLAG-M2® und Goat-anti-mouse-Ig(H+L)-FITC, das hulg-Konstrukt mit Goat-anti-human-Ig(H+L)-BIOT und Streptavidin-FITC detektiert.

4.21 Zellyse

Zur Gewinnung der Gesamtproteinfraktion aus Zellen wurden diese mit einem Detergenz (Triton-X-100) lysiert, zentrifugiert und der proteinhaltige Überstand weiterverwendet.

4.21.1 Material

5 M NaCl-Lösung

29,22 g Natriumchlorid (NaCl) ³

Ad 100 ml Aqua bidest., bei RT lagern

2 x Lysestammlösung

10	ml	0,5 M Trislösung (pH 7,4), siehe Abschnitt 4.15.1 auf S. 61
3	ml	5 M NaCl-Lösung
1	ml	EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8,0), siehe Abschnitt 4.8.1 auf S. 51
1	ml	10 % Natriumazid

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

10 % Triton-X-100

5	ml	Triton-X-100 ²⁴
---	----	----------------------------

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

25 x Complete (Proteaseinhibitor)

1	Tablette Complete ²¹
---	---------------------------------

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

Lysepuffer (1 ml)

500	µl	2 x Lysestammlösung
100	µl	10% Triton
40	µl	25 x Complete
360	µl	A. bidest.

4.21.2 Durchführung

$5 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ Zellen wurden 10 min. bei 4 °C mit 225 x g zentrifugiert und das Pellet in 1 ml Lysepuffer resuspendiert. Nach 45-minütiger Inkubation auf Eis und 30 min. Zentrifugation bei 4 °C mit 16000 x g wurde der Überstand in ein neues Röhrchen überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.22 Immunpräzipitation

Mit Hilfe der Immunpräzipitation konnte ein bestimmtes Protein aus dem Zelllysat aufgereinigt werden, indem Gesamtlysat mit Protein-G-Agarosekügelchen, die den für dieses Protein spezifischen Antikörper gebunden haben, für mehrere Stunden inkubiert und dieses Protein dann ausgewaschen wurde.

4.22.1 Material

Anti-Flag M2® Agarose Affinity Gel ²⁵

Agarose-mAk-Gemisch

500	µl	PBS (siehe Abschnitt 4.2.1 auf S. 36)
50	µl	Protein-G-Agarose ²¹
1,5	µg	aufgereinigter mAk

Kurz vor Gebrauch ansetzen.

Waschpuffer

500	µl	2 x Lysestammlösung (siehe Abschnitt 4.21.1 auf S. 75)
100	µl	10 % Triton-X-100 (siehe Abschnitt 4.21.1 auf S. 75)
400	µl	Aqua bidest.

Kurz vor Gebrauch ansetzen.

6 x Probenpuffer

7	ml	4 x TrisCl / SDS Puffer pH 6,8
3	ml	Glycerol ³
1	g	SDS ³
1,2	mg	Bromphenolblau ²⁵

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

1 x Probenpuffer

100	µl	6 x Probenpuffer
500	µl	Aqua bidest.

Bei -20 °C aufbewahren.

4.22.2 Durchführung

Bei Verwendung des Agarose-mAk-Gemisches wurde dieses etwa 4 - 5 Stunden bei 4 °C in einem 1,5 ml Röhrchen rotiert und anschließend mit 1 ml Waschpuffer, durch kurzzeitige Zentrifugation bis 16000 x g und vorsichtiges Absaugen des Überstandes mit einer Wasserstrahlpumpe, gewaschen. 1 ml Zelllysat (siehe Abschnitt 4.21 auf S. 75) wurde dazupipettiert und mit Rotation bei 4 °C über Nacht inkubiert.

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

Nach dreimaligem Waschen der Agarosekügelchen mit jeweils 1 ml Waschpuffer wurden diese zusammen mit 100 µl 1 x SDS-Probenpuffer 5 min. bei 99 °C gekocht, um die Bindung zwischen Protein, Antikörper und Agarose zu zerstören. Das Gemisch wurde kurz zentrifugiert und das nun im Überstand enthaltene Protein in ein neues Röhrchen überführt und bei -20 °C aufbewahrt.

4.23 Deglykosilierung von Proteinen

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

4.23.1 Material

PNGase F ¹⁷

10 x G7 Puffer ¹⁷

10 % Nonidet P-40 (NP-40) ¹⁷

1 x Denaturierungspuffer

10	µl	10 x Denaturierungspuffer ¹⁷
90	µl	Aqua bidest.

Vor Gebrauch ansetzen

3 x SDS-Probenpuffer

100	µl	6 x SDS-Probenpuffer, siehe Abschnitt 4.22.1 auf S. 77
100	µl	Aqua bidest.

Bei -20 °C aufbewahren

4.23.2 Durchführung

Das zu deglykosilierende Protein wurde durch Immunpräzipitation (siehe Abschnitt 4.22 auf S. 76) aufgereinigt und statt in 100 µl 1 x SDS-Probenpuffer in 100 µl 1 x Denaturierungspuffer aufgenommen und für 10 min. bei 99 °C gekocht. Nach kurzer

Zentrifugation bis 16000 x g wurden 10 µl des Überstandes mit 1,6 µl G7 Puffer, 1,6 µl 10 % NP-40 und 2,8 µl PNGase F vermischt. Außerdem wurde ein Kontrollansatz ohne das Enzym hergestellt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurden 8 µl 3 x SDS-Probenpuffer dazugegeben, dies für 5 min. bei 95 °C gekocht und in einem Western Blot analysiert.

4.24 Western Blot

Der Western Blot diente zum Nachweis eines bestimmten Proteins in einer Probe mit Hilfe eines spezifischen, an das Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörpers und zur Bestimmung seines relativen Molekulargewichtes durch Vergleich mit einem ebenfalls im SDS-Page aufgetrennten biotinilierten Marker, der durch an Streptavidin gekoppelte Peroxidase nachgewiesen wurde.

4.24.1 SDS-PAGE

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

4.24.1.1 Material

4 x TrisCl/SDS Puffer pH 8,8

91	g	Tris(hydroxymethyl)aminomethan ³
2	g	SDS ³

Ad 300 ml A. dest., mit HCl auf pH 8,8 einstellen, über Nacht bei 4 °C aufbewahren, am nächsten Tag nochmal mit HCl auf pH 8,8 einstellen und mit ad 500 µl mit A. dest. auffüllen.

4 x TrisCl/SDS Puffer pH 6,8

6,05 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan³
 0,4 g SDS³

Ad 100 ml A. dest., mit HCl auf pH 6,8 einstellen, bei 4 °C aufbewahren

10 % APS

0,1 g Ammoniumpersulfat (APS)³

Ad 1 ml A. bidest., bei -20 °C lagern

Trenngel

Prozent des Trenngels	8 %	10 %	12%	15 %
A. bidest.	4,84 ml	4,2 ml	3,5 ml	5,0 ml
4 x TrisCl/SDS Puffer pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid-Lösung ²⁴	2,66 ml	3,3 ml	4,0 ml	2,5 ml
10 % APS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) ³	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl

In der aufgeführten Reihenfolge vermischen und sofort gießen

Sammelgel

3,085 ml A. bidest.
 1,25 ml 4 x TrisCl/SDS Puffer pH 8,8
 665 µl 30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid-Lösung²⁴
 25 µl 10 % APS
 7,5 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)³

In der aufgeführten Reihenfolge vermischen und sofort gießen

10 x Elektrophoresepuffer

30,2 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan³
 144 g Glycin³
 10 g SDS³

Ad 1000 ml Aqua dest., bei 4 °C aufbewahren, zum Gebrauch 1:10 mit Aqua dest. verdünnen.

Isobutanol¹⁴

β -Mercaptoethanol⁷

Prestained Protein Ladder, ~10-180 kDa¹³

Biotinylated Protein Ladder⁸

4.24.1.2 Durchführung

Das Trenngel wurde in eine Biorad mini Protean II Gießkammer eingefüllt und mit Isobutanol überschichtet, das nach Polymerisation des Gels bei RT durch Auswaschen mit Aqua dest. entfernt wurde. Auf das Trenngel wurde daraufhin das 4%ige Sammelgel gegossen und ein 10er Probenkamm eingesetzt. Das polymerisierte Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingespannt und mit 1 x Elektrophoresepuffer überschichtet. Sollten die Proben reduzierend aufgetragen werden, wurden je 10 μ l Probe 0,5 μ l β -Mercaptoethanol hinzugefügt. Die Proben wurden 5 min. bei 95 °C gekocht und anschließend in die Geltaschen eingefüllt. Als Marker wurden 7,5 μ l Prestained Protein Ladder und 4,5 μ l biotinierter Marker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte 15 min. bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA zum Sammeln der Proben im Sammelgel, die Auftrennung der Proben im Trenngel bei einer konstanten Stromstärke von 50 mA.

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

Der Transfer der im SDS-Page aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte im Semi-Dry-Elektroblotter.

4.24.2.1 Material

Anodenpuffer I, 0,3 M, pH 10,4

36,33 g Tris³
200 ml Methanol, reinst³

Ad 1000 ml Aqua bidest.

Anodenpuffer II, 25 mM, pH 10,4

3,03 g Tris³
200 ml Methanol, reinst³

Ad 1000 ml Aqua bidest.

Kathodenpuffer, pH 9,4

3,03	g	Tris ³
5,25	g	ϵ -Aminocapronsäure ²⁵
200	ml	Methanol, reinst ³

Ad 1000 ml Aqua bidest.

5% Magermilchpulverlösung siehe Abschnitt 4.19.1 auf S. 70

Nitrozellulosemembran Porengröße 0,2 μm ²³

Filterpapier¹²

4.24.2.2 Durchführung

Der Blot zwischen den Platten wurde folgendermaßen aufgebaut: Auf die mit Aqua dest. benetzte Platte wurden 4 Lagen in Anodenpuffer I getränktes Filterpapier, darauf 2 Lagen in Anodenpuffer II getränktes Filterpapier, die mit Aqua dest. benetzte Nitrozellulosemembran, das SDS-Gel und zuletzt 4 Lagen mit Kathodenpuffer getränktes Filterpapier, wobei alles auf die Größe des Geles zugeschnitten wurde. Nach Aufsetzen der oberen, ebenfalls mit Aqua dest. benetzten Elektrodenplatte wurde 90 min. lang eine konstante Stromstärke von 0,8 mA/cm² Nitrozellulose (45 mA/Gel) angelegt. Nach Beendigung des Blottens wurde die Nitrozellulosemembran über Nacht bei 4 °C in 5 %iger Magermilchpulverlösung inkubiert.

4.24.3 Proteindetektion durch spezifische Antikörper

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

4.24.3.1 Material

PBS-T siehe Abschnitt 4.19.1 auf S. 70

Antikörper:

Anti-Rabbit-IgG(H+L)-HRP¹¹ 1:20000 in PBS-T verdünnen

Anti-FLAG M2® Monoclonal Antibody-POD Conjugate²⁵ 1:20000 in PBS-T verdünnen

Anti-PTyr HRP²⁹ 1:5000 in PBS-T verdünnen

Anti-SHP-1 (Rabbit-Anti-SHP-1)²⁹ 1:400 in PBS-T verdünnen

Anti-SHP-2 (Rabbit-Anti-SHP-2)²² 1:200 in PBS-T verdünnen

Anti-V5-HRP²⁷ 1:20000 in PBS-T verdünnen

SA-HRP²⁵ 1:10000 in PBS-T verdünnen

Tris-HCl-Lösung (0,1 M pH 8,6)

1,211 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan³

Ad 60 ml Aqua bidest., pH 8,6 mit HCl einstellen, auf 100 ml Aqua bidest. auffüllen, bei 4 °C lagern

Lösung A

200 ml Tris-HCl-Lösung (0,1 M, pH 8,6)

50 mg Luminol²⁵

Bei 4 °C lagern

Lösung B

11 mg para-Hydroxycoumarinsäure²⁵

10 ml DMSO³

Dunkel bei RT lagern

ECL-Entwicklerlösung

4 ml Lösung A

1,2 µl 30 % H₂O₂³

400 µl Lösung B

Reagenzien in der angegebenen Reihenfolge pipettieren und sofort verwenden

SUPER-2000G (Röntgenfilm)⁹**Kodak BioMax MR (Röntgenkassette)**²

4.24.3.2 Durchführung

Die in 5%iger Magermilchpulverlösung blockierte Nitrozellulosemembran wurde 15 min in PBS-T gewaschen und anschließend für 1 Stunde mit dem primären Antikörper in den angegebenen Verdünnung inkubiert. Der überschüssige Antikörper wurde durch Waschen (1 x 15 min. und 5 x 5 min.) entfernt, anschließend die Membran 1 Stunde mit dem sekundären Antikörper (Anti-Rabbit-IgG(H+L)-HRP) in der angegebenen Verdünnung inkubiert und wiederholt nach angegebenem Schema gewaschen. Bei direkt an HRP gekoppelten primären Antikörpern war kein sekundärer Antikörper notwendig. Zuletzt wurde die Membran 5 min. mit der ECL-Entwicklerlösung inkubiert und entwickelt.

4.25 Pervanadatbehandlung stabil transfizierter 2D8-Zellen

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

4.25.1 Material

Standardmedium siehe Abschnitt 4.3.1 auf S. 37

Orthovanadat 0,1 M

0,184 g Orthovanadat²⁵

Ad 10 ml Aqua bidest., vor Gebrauch herstellen

Natriumfluorid 0,5 M

2,1 g Natriumfluorid (NaF)¹⁴

Ad 100 ml Aqua bidest., bei RT lagern.

Aktivierte Stammlösung

100	µl	Orthovanadat 0,1 M
900	µl	Wasser ³
1,7	µl	30 % H ₂ O ₂ ³

Nach Herstellung 15 min. bei RT aktivieren, sofort verwenden.

PBS mit Phosphataseinhibitoren

50	ml	PBS, siehe Abschnitt 4.2.1 auf S. 36
40	µl	EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8,0), siehe Abschnitt 4.8.1 auf S. 51
200	µl	Orthovanadat 0,1 M

Lysepuffer

1000	µl	2 x Lysestammlösung, siehe Abschnitt 4.21.1 auf S. 75
200	µl	10 % Triton-X-100, siehe Abschnitt 4.21.1 auf S. 75
80	µl	25 x Complete, siehe Abschnitt 4.21.1 auf S. 75
40	µl	Natriumfluorid 0,5 M
8	µl	EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8,0), siehe Abschnitt 4.8.1 auf S. 51
20	µl	Orthovanadat 0,1 M
652	µl	Aqua bidest.

Vor Gebrauch herstellen.

4.25.2 Durchführung

Stabil transfizierte 2D8-Zellen (siehe Abschnitt 4.14.2 auf S. 60) wurden mit 37 °C warmen Standardmedium auf eine Zelldichte von 1×10^7 / ml eingestellt und 15 ml davon gleichmäßig auf 3 Röhrchen verteilt. Pro Ansatz wurden 50 µl aktivierte Stammlösung dazupipettiert und dieser 0, 5 bzw. 15 min. bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde sofort danach durch Zugabe von PBS mit Phosphataseinhibitoren gestoppt, die Zellen 10 min. bei 4 °C mit 225 x g zentrifugiert und jeder Ansatz in 600 µl Lysepuffer, wie in Abschnitt 4.21 auf S. 75 beschrieben, lysiert. Nach Immunpräzipitation wurden die Zellproteine im Western Blot analysiert.

4.26 Computerprogramme zur Auswertung von Sequenzen

4.26.1 Lasergene 7 Software

Die Programme EditSeqTM, SeqBuilderTM und MegAlignTM wurden zur Analyse von DNA- und AS-Sequenzen verwendet.

4.26.2 New GENSCAN

Das Programm ist im Internet unter <http://genes.mit.edu/GENSCAN.html> frei verfügbar und wurde dazu verwendet, genomische DNA nach Abschnitten zu durchsuchen, die für ein Protein kodieren könnten.

4.26.3 Simple Modular Architecture Research Tool (SMART)

Das Programm, das im Internet unter <http://smart.embl-heidelberg.de> frei verfügbar ist, wurde verwendet, um die von New GENSCAN vorhergesagten Proteine auf ihre Tertiärstruktur hin zu untersuchen, wobei vor allem Proteine mit Ig-ähnlichen Domänen von Interesse waren.

4.26.4 Primer Express® 3.0

Das Programm **ABI Primer Express® Software for Real Time PCR 3.0** wurde verwendet, um für ein bestimmtes Gen Primer zu finden, die in der qPCR eingesetzt werden könnten (siehe Abschnitt 4.7.1.1 auf S. 46), da an diese besondere Anforderungen gestellt wurden: so sollten alle Primer eine einheitliche Bindungstemperatur von 59 °C besitzen, etwa eine Länge von 18 - 25 Basen haben, ein Amplifikat in der Länge von etwa 100 – 200 bp produzieren und in der Sekundärstruktur weder Haarnadelstrukturen noch Dimere mit sich selbst oder dem jeweiligen Primerpartner bilden.

4.26.5 NCBI Nucleotide Blast

Das Programm ist unter <http://ncbi.nlm.nih.gov/blast> frei verfügbar. Es wurde verwendet, um Primer für die qPCR (siehe Abschnitt 4.7.1.1 auf S. 46) mit den in dieser Datenbank vorhandenen DNA-Sequenzen beim Huhn zu vergleichen. Nur Primer, die spezifisch auf dem gewünschten Gen binden, wurden weiter für den Einsatz in der qPCR getestet.

5 Ergebnisse

5.1 Identifizierung zusätzlicher TREMs beim Huhn

5.1.1 BAC (Bacterial Artificial Chromosome)-Analyse

Da der chromosomale Locus, auf dem die Gene für die TREM-Rezeptor-Familie zu finden sind, bisher nur lückenhaft sequenziert war, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit ein nun verfügbarer BAC-Klon dazu verwendet, um die Existenz noch weitere Mitglieder der TREM-Familie als die bisher bekannten TREM-A1, TREM-B1 und TREM-B2 (v1 und v2) herauszufinden.

Dafür wurde die genomische DNA-Sequenz des BAC-Klons mit Hilfe des Programms New GENSCAN auf Abschnitte durchsucht, die für Proteine kodieren könnten. Die vorhergesagten Proteine wurden dann mit Hilfe des Programms SMART auf ihre vorhergesagte Struktur hin untersucht.

In dem von NFYA und FOXP4 flankierten Bereich wurden keine neuen Mitglieder der TREM-Rezeptor-Familie gefunden. Allerdings wurde eine weitere Variante von TREM-B2 entdeckt, die sich dadurch auszeichnet, dass sie vier extrazytoplasmatische Ig-Domänen besitzt, wobei zwei Ig-Domänen jeweils identisch zueinander sind.

5.1.2 Klonierung einer neuen Variante von TREM-B2

Um herauszufinden, ob es sich bei den vier Ig-Domänen um eine Verdopplung der beiden bereits charakterisierten Ig-Domänen von TREM-B2v1 handelt, und ob es sich um ein Artefakt der Datenbank handelt, wurde die neue Variante kloniert und sequenziert.

Mit einer Herculase-PCR wurde auf cDNA von OU-2 ein Amplifikat mit einer Länge von 2000 bp detektiert und dieses in den Vektor pcDNA3.1/V5-His kloniert. Das Amplifikat wurde vollständig sequenziert und die einzelnen Sequenzdaten miteinander kombiniert.

Ein Vergleich der genomischen Exon- / Intron-Struktur mit mRNA ergab, dass die Exons für die beiden Ig-Domänen von TREM-B2v1 doppelt vorkommen. Diese neue Variante wird im Folgenden als TREM-B2 Variante 3 (TREM-B2v3) bezeichnet. In

Abbildung 13 ist die Proteinsequenz von TREM-B2v3 dargestellt und die Duplikation der beiden ersten Ig-Domänen gekennzeichnet.

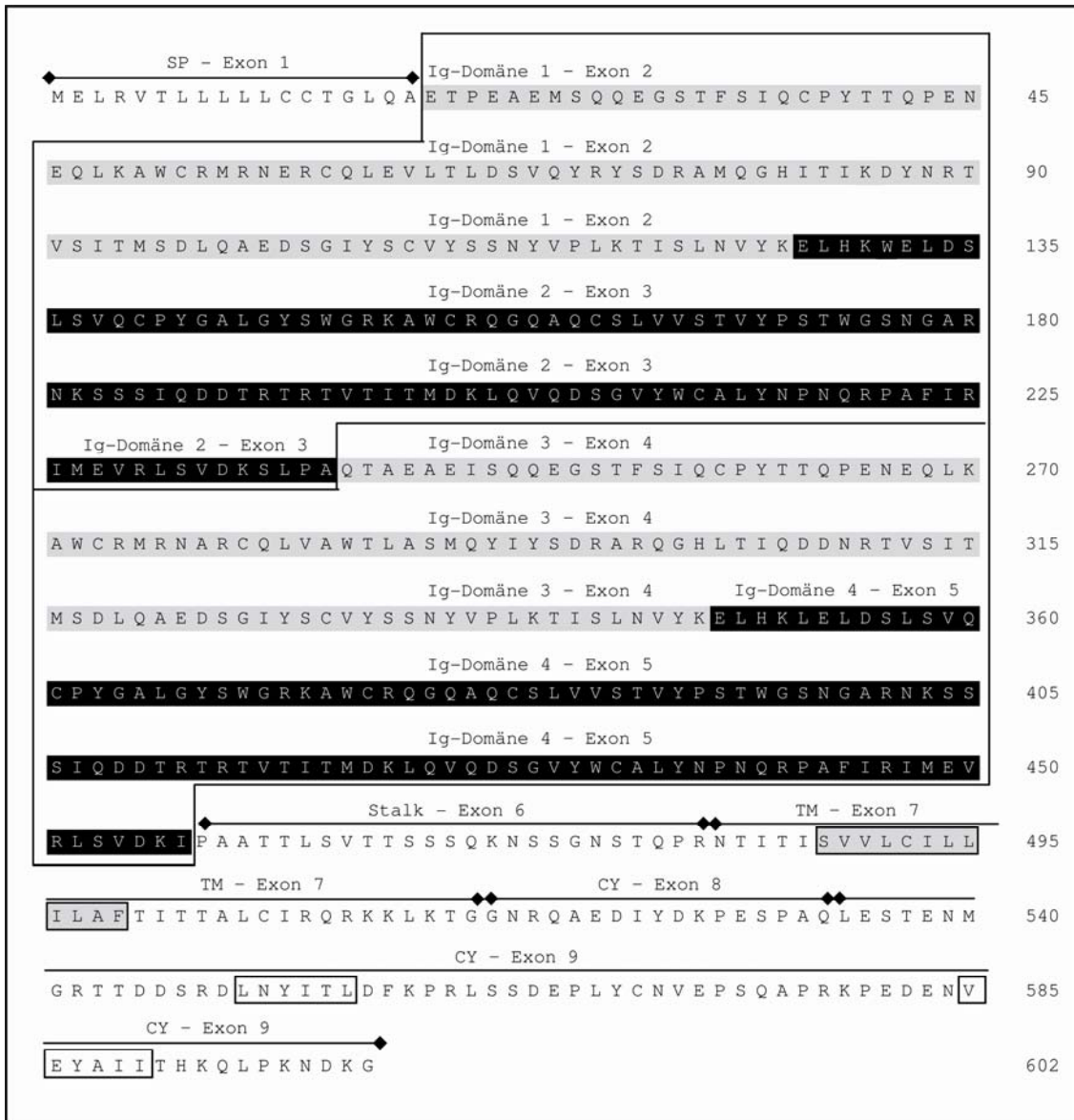


Abbildung 13: Darstellung der AS-Sequenz von TREM-B2v3 mit Angabe der Exon-Struktur. Folgende Strukturmerkmale wurden herausgehoben: Signalpeptid (SP), die vier Ig-Domänen vom V-Typ, die Stalk-Region, der transmembrane Bereich (TM) mit der vorhergesagten transmembranen Domäne (grau hinterlegte Box) und der zyttoplasmatische Abschnitt (CY) mit den ITIMs (Box). Zur Verdeutlichung der Verdopplung der beiden ersten Ig-Domänen wurden der Abschnitt für die erste und die entsprechende dritte Ig-Domäne grau, die zweite und die entsprechende vierte schwarz hinterlegt.

5.1.3 Zusammenfassung aller TREMs beim Huhn

Abbildung 14 und Abbildung 15 zeigen die DNA- und AS-Sequenz TREM-A1 und TREM-B1 und zusätzlich die Lage der für weitere Analysen verwendeten Primer.

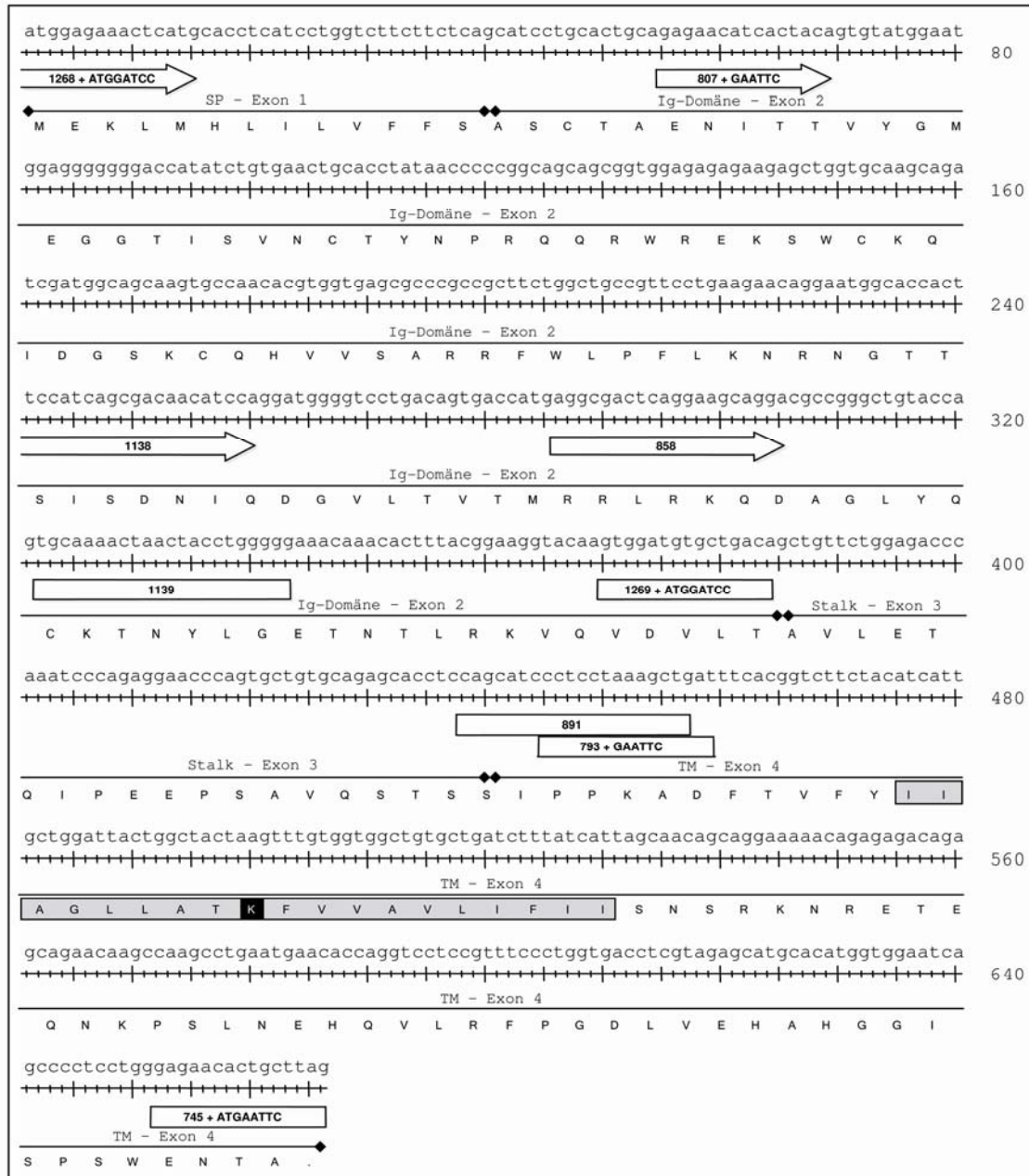


Abbildung 14: DNA-Karte von TREM-A1 mit Angabe des jeweils kodierten Bereichs. Außerdem sind alle sense (Pfeil) und antisense (Rechteck) Primer, die zur Erstellung der verschiedenen Konstrukte und als Primer für die qPCR verwendet wurden, vermerkt. Die Strukturmerkmale sind wie in **Abbildung 13** gekennzeichnet. In der transmembranen Domäne (grau hinterlegte Box) wurde die positiv geladene AS (Lysin) schwarz markiert.

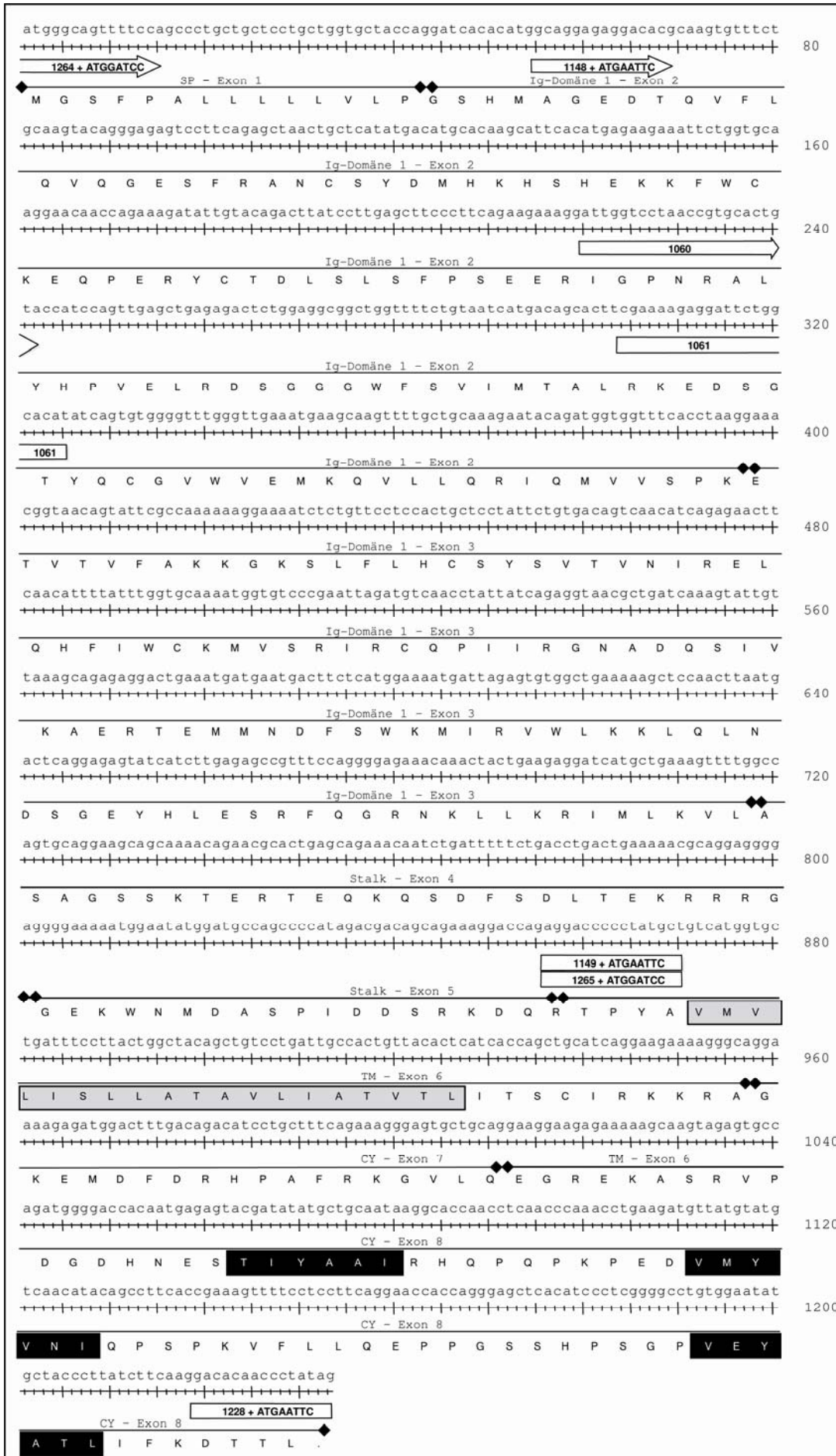


Abbildung 15 (siehe vorgehende Seite): DNA-Karte von TREM-B1 mit Angabe des jeweils kodierten Bereichs. Außerdem sind alle sense (Pfeil) und antisense (Box) Primer, die zur Erstellung der verschiedenen Konstrukte und als Primer für die qPCR verwendet wurden, vermerkt. Die Darstellung der Strukturmerkmale erfolgte wie in **Abbildung 13** beschrieben, wobei die ITIMs im zytoplasmatischen Bereich zur besseren Unterscheidung von den antisense Primern mit schwarz hinterlegten Boxen markiert wurden.

Abbildung 16 zeigt schematisch alle Mitglieder der TREMs beim Huhn inklusive der neu gefundenen dritten Splice-Variante von TREM-B2 mit den vier Ig-Domänen vom V-Typ.

5.2 Analyse des Expressionsmusters mit Hilfe der Real-time quantitativen PCR

Um das Expressionsmuster von TREM-A1, TREM-B1 und TREM-B2 zu ermitteln, wurde aus der Gesamt-RNA verschiedener, in Abbildung 17 bis Abbildung 23 aufgeführten Geweben und Zellpopulationen cDNA präpariert und mit Hilfe der qPCR mit den in Tabelle 3 auf S. 49 aufgeführten Primern analysiert. Zur besseren Veranschaulichung wurde die Lage der verschiedenen Primer in Abbildung 16 schematisch dargestellt. Die genaue Lage der Primer von TREM-A1 und TREM-B1 ist auch aus Abbildung 14 und Abbildung 15 auf S. 89f. ersichtlich.

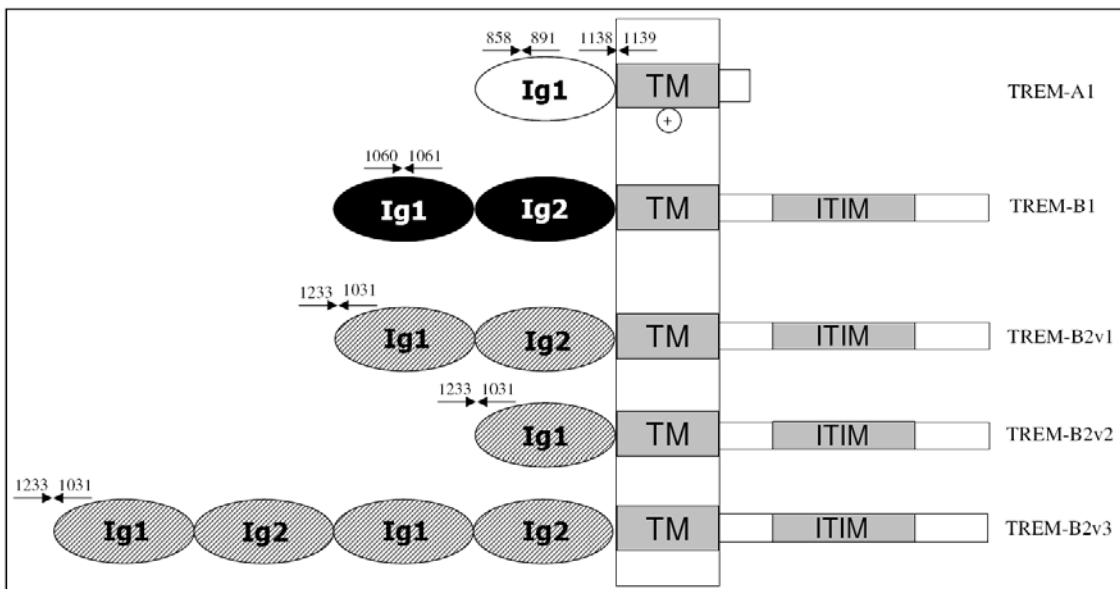


Abbildung 16: Lage der Primer für die qPCR in einer schematischen Darstellung der verschiedenen Mitglieder TREMs mit den drei Splice-Varianten von TREM-B2. Dargestellt sind jeweils die verschiedenen Ig-Domänen (Ig1 und Ig2), der transmembrane Bereich (TM) sowie der zytoplasmatische Abschnitt mit den ITIMs. Die Pfeile markieren die Lage der Primer, die für die qPCR eingesetzt wurden:

→ für den Sense-Primer, ← für den Antisense-Primer. Die Sequenz der jeweiligen Primer ist in **Tabelle 3** auf S. 49 aufgeführt.

Der Primer 1233 für die drei Varianten von TREM-B2 bindet im Signalpeptid, während 1031 in der ersten Ig-Domäne liegt. Die Normalisierung der ermittelten Ct-Werte erfolgte auf das „Housekeeping Gen“ 18S rRNA, die Kalibrierung der ΔC_t -Werte auf den ΔC_t -Wert des Lebergewebes, wie in Abschnitt 4.7.3 auf S. 50 erläutert. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

5.2.1 Gewebeverteilung von TREM-A1

Mit Hilfe eines Primerpaares (858 / 891), das den Bereich zwischen der Ig-Domäne von TREM-A1 und seiner transmembranen Region in der PCR amplifizierte, wurde die Gewebeverteilung der membranständigen Form von TREM-A1 ermittelt. Wie Abbildung 17 zeigt, wurde diese vor allem in Makrophagen, Knochenmark, Gehirn und Bursa detektiert.

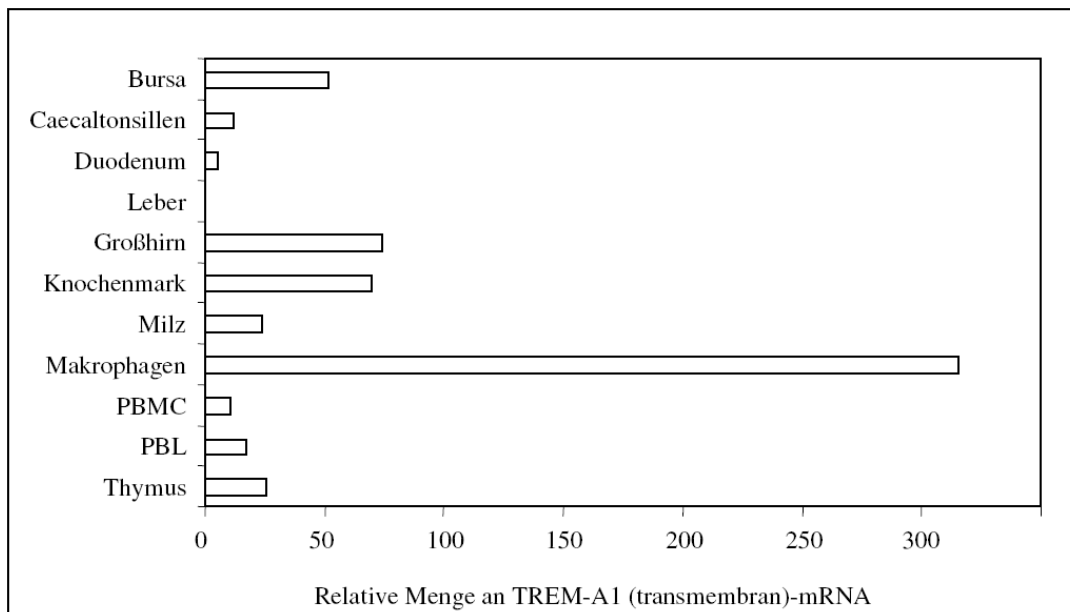


Abbildung 17: Gewebeverteilung der mRNA von membranständigem TREM-A1 ($E^{-\Delta\Delta C_t}$). Die Normalisierung der Daten erfolgte auf 18S rRNA, die Kalibrierung auf die Expression in der Leber.

5.2.2 Gewebeverteilung der Ig-Domäne von TREM-A1

Mit Hilfe eines Primerpaares (1138 / 1139), das allein einen Bereich der Ig-Domäne in der PCR amplifizierte, wurde festgestellt, dass in PBMC die mRNA der Ig-Domäne von

TREM-A1 im Vergleich zur mRNA der transmembranen Form von TREM-A1 viel höher exprimiert wird (siehe Abbildung 18 auf S. 93). Diese höhere Expression konnte aber weder in PBL, noch in Makrophagen festgestellt werden. Bei dieser Form könnte es sich um eine Splice-Variante von TREM-A1 handeln, die nur die Ig-Domäne besitzt, nicht aber den transmembranen Abschnitt.

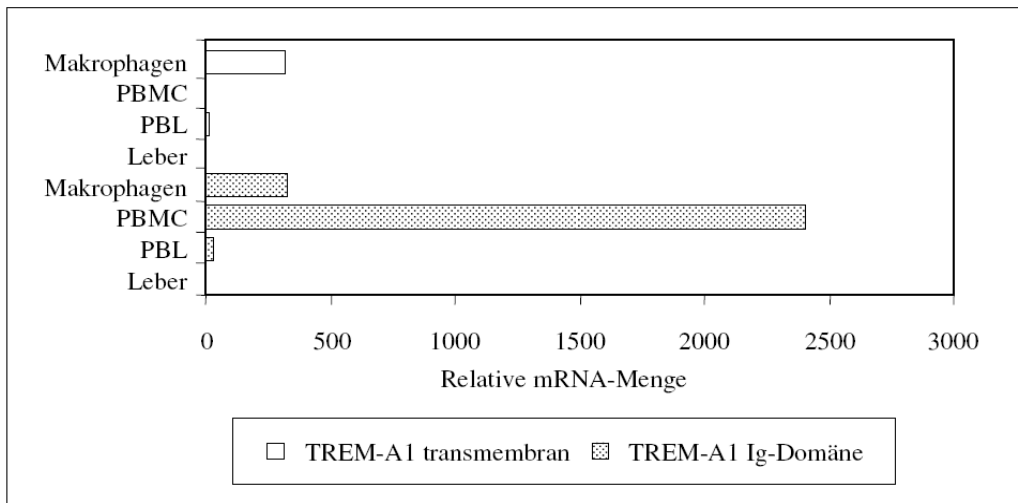


Abbildung 18: Gewebeverteilung der mRNA von membranständigem TREM-A1 verglichen mit der mRNA der Ig-Domäne von TREM-A1 ($E^{-\Delta\Delta C_t}$). Die Normalisierung der Daten erfolgte auf 18S rRNA, die Kalibrierung auf die Expression in der Leber.

Nach Gewinnung von mRNA aus Thrombozyten konnte mit Hilfe der qPCR gezeigt werden, dass die in den PBMC erhöhte Expression der Ig-Domäne von TREM-A1 von Thrombozyten gebildet wird (siehe Abbildung 19).

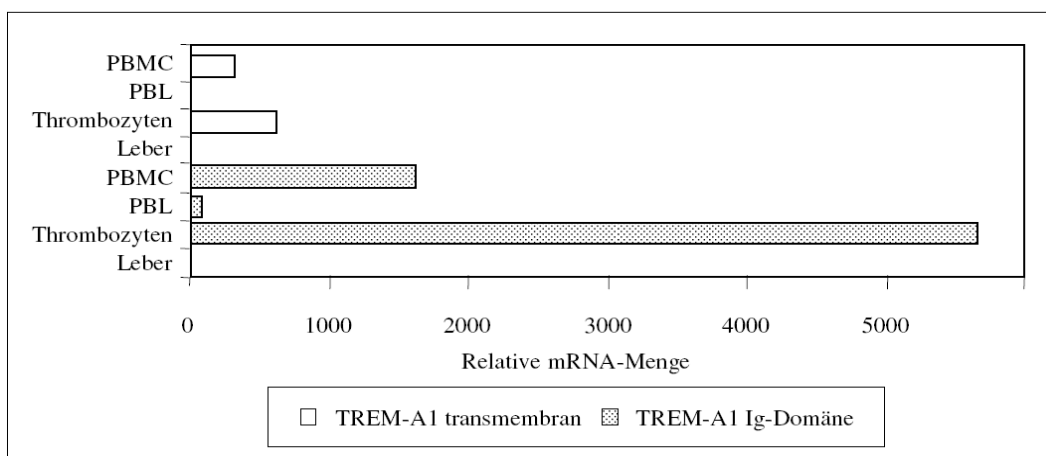


Abbildung 19: Gewebeverteilung der mRNA von membranständigem TREM-A1 verglichen mit der mRNA der Ig-Domäne von TREM-A1 ($E^{-\Delta\Delta C_t}$). Die Normalisierung der Daten erfolgte auf 18S rRNA, die Kalibrierung auf die Expression in der Leber.

5.2.3 Gewebeverteilung von TREM-B1

Zur Ermittlung der Gewebeverteilung von TREM-B1 wurde ein Primerpaar (1060 / 1061) eingesetzt, das einen Bereich innerhalb der mRNA der membran-distalen Ig-Domäne amplifiziert. Wie Abbildung 20 zeigt, wurde diese vor allem in PBMC, in geringerer Menge aber auch in Knochenmark, Milz und PBL exprimiert.

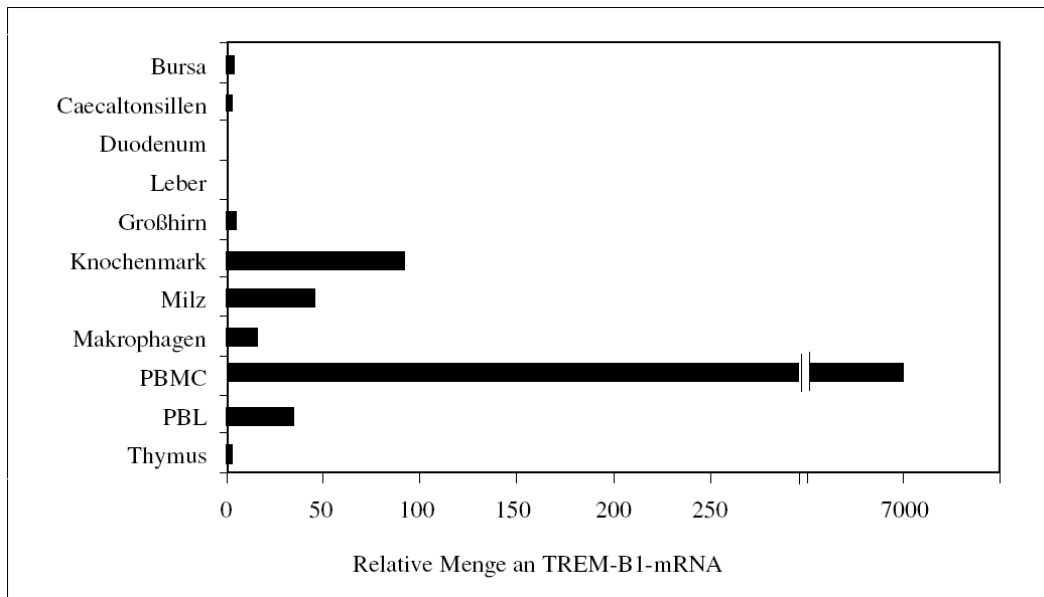


Abbildung 20: Gewebeverteilung der mRNA von TREM-B1 ($E^{-\Delta\Delta C_t}$). Die Normalisierung der Daten erfolgte auf 18S rRNA, die Kalibrierung auf die Expression in der Leber.

Da auch hier die erhöhte Expression von TREM-B1 in PBMC im Wesentlichen nicht aus PBL oder Makrophagen stammt, wurde auch hier anhand von mRNA aus Thrombozyten mit Hilfe der qPCR gezeigt, dass die Ig-Domäne von TREM-B1 vor allem von Thrombozyten gebildet wird (siehe Abbildung 21).

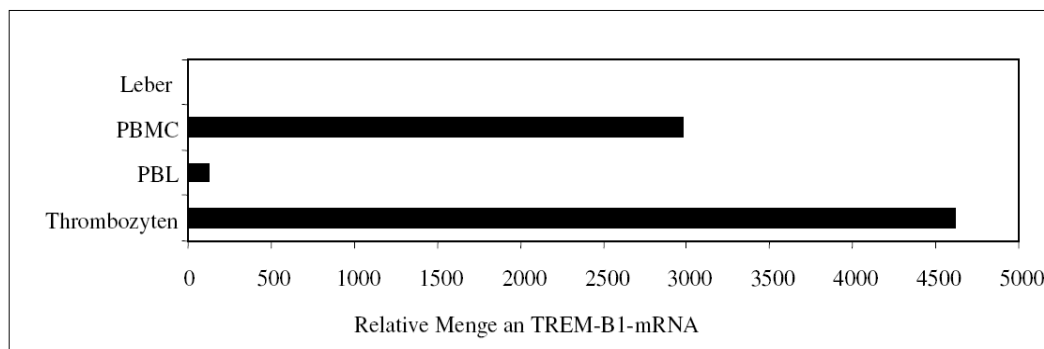


Abbildung 21: Gewebeverteilung der mRNA von TREM-B1 ($E^{-\Delta\Delta C_t}$). Die Normalisierung der Daten erfolgte auf 18S rRNA, die Kalibrierung auf die Expression in der Leber.

5.2.4 Gewebeverteilung von TREM-B2

Für die Ermittlung der Gewebeverteilung von TREM-B2 wurde ein Primerpaar (1233 / 1031) gewählt, das den Bereich zwischen Signalpeptid und der ersten Ig-Domäne umspannt, da auf diese Weise die mRNA aller drei Splice-Varianten von TREM-B2 gleichzeitig detektiert werden konnte. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die drei Varianten von TREM-B2 vor allem in PBMC exprimiert werden, dabei sowohl in Makrophagen als auch in PBL. Daneben wurden die drei Varianten auch in Knochenmark, Milz und Caecaltonsillen detektiert.

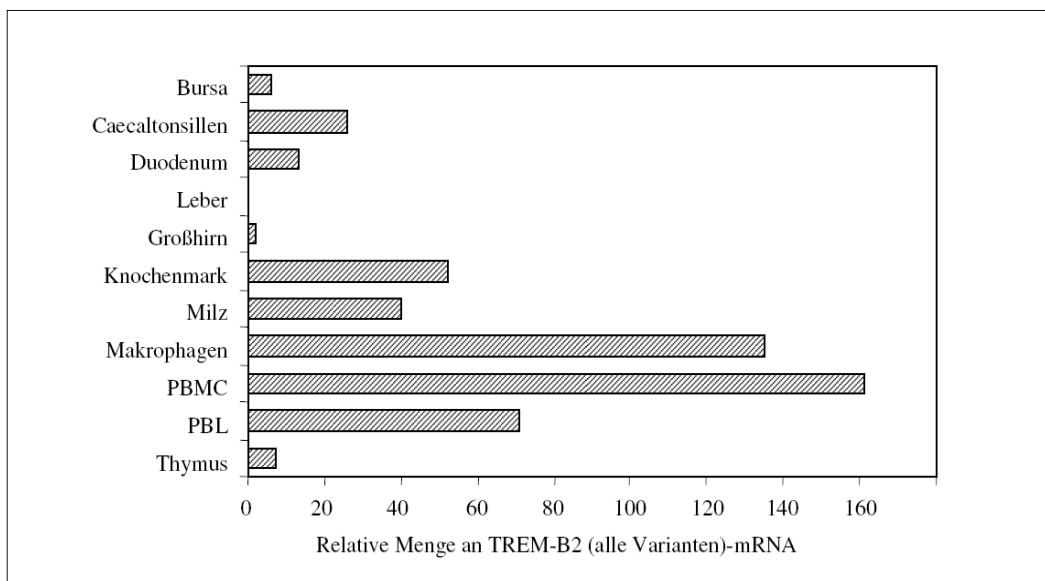


Abbildung 22: Gewebeverteilung der mRNA aller Varianten von TREM-B2 ($E^{-\Delta\Delta C_t}$). Die Normalisierung der Daten erfolgte auf 18S rRNA, die Kalibrierung auf die Expression in der Leber.

5.2.5 Expression der TREMs auf stimulierten Makrophagen

Die Expression aller Mitglieder der TREM-Rezeptor-Familie in Makrophagen nach 6-stündiger Stimulation mit LPS, APEC LPS, bakterieller DNA und $IFN\gamma$ wurde mit den in Tabelle 3 auf S. 49 aufgeführten Primern in der qPCR analysiert.

Wie Abbildung 23 auf S. 96 zeigt, wird die mRNA von TREM-A1, TREM-B1 und TREM-B2 nach Stimulation im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle deutlich niedriger exprimiert.

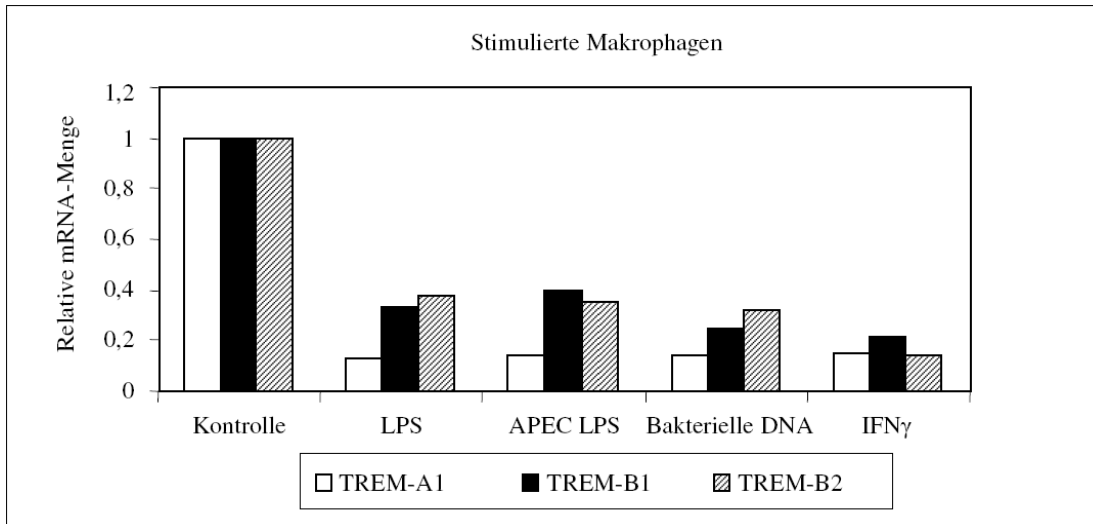


Abbildung 23: Darstellung der mRNA-Expression von TREM-A1, TREM-B1 und TREM-B2 ($E^{-\Delta\Delta C_t}$) nach Stimulation mit LPS, APEC LPS, bakterieller DNA und IFN γ für 6 Stunden. Die Normalisierung der Daten erfolgte auf 18S rRNA, die Kalibrierung auf die Expression in unstimulierten Makrophagen (Kontrolle).

5.3 Analyse des Expressionsmusters von TREM-A1 mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der qPCR konnten nur Aussagen über die Expression auf Transkriptionsebene der verschiedenen Rezeptoren gemacht werden. Für die Analyse der Proteinexpression und weitere funktionelle Studien wurde für einen ausgewählten Vertreter, TREM-A1, ein spezifischer mAk hergestellt. Mit diesem konnte auf unterschiedlichen Geweben das Expressionsmuster von TREM-A1 identifiziert werden.

5.3.1 Herstellung eines spezifischen mAk gegen TREM-A1

Zur Herstellung eines spezifischen mAk gegen TREM-A1 wurden Balb/c Mäuse mit BWZ.36-Zellen immunisiert, die stabil ein TREM-A1-zeta-FLAG-Konstrukt exprimieren. Nach der Fusion wurden die Hybridomüberstände mit Hilfe eines ELISA getestet, der mit dem aus SL3 aufgereinigten TREM-A1-huIg-Fusions-Protein beschichtet war. Die Überstände der im ELISA positiv getesteten Klone wurden daraufhin in der Durchflusszytometrie auf den TREM-A1-zeta-FLAG-BWZ.36-Zellen getestet und von den positiven Klonen, die Isotypen bestimmt. Die beiden in ELISA und Durchflusszytometrie positiven mAk 14C9 und 17H3 sind IgM-Antikörper. Die Ergebnisse aus der Durchflusszytometrie sind in Abbildung 24 dargestellt.

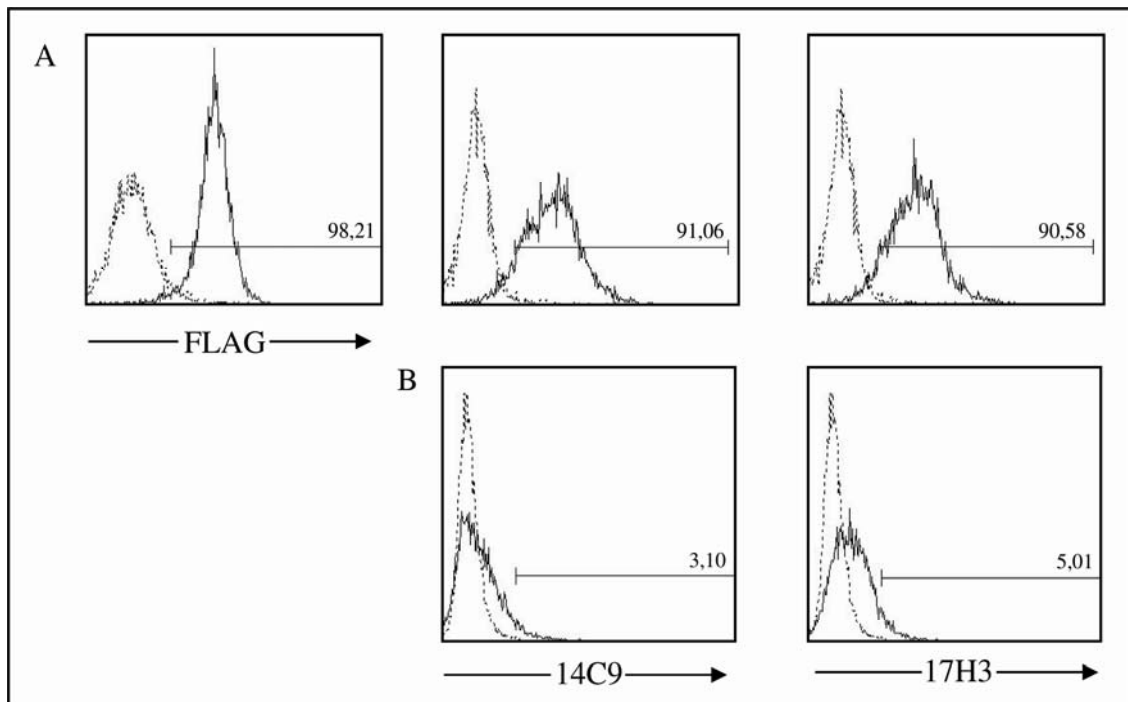


Abbildung 24: Immunphänotypisierungen, die zur Herstellung des mAk 14C9 durchgeführt wurden. Als Kontrolle (gestrichelt) wurde nur mit dem sekundären Antikörper gefärbt. Reihe A zeigt die Färbung von BWZ-36-Zellen, die stabil mit dem TREM-A1-zeta-Konstrukt transfiziert wurden, mit Anti-FLAG (links) zur Expressionskontrolle, und den beiden mAk 14C9 (Mitte) und 17H3 (rechts). In Reihe B sind die Färbungen untransfizierter BWZ.36-Zellen mit den jeweiligen mAk als Negativkontrolle zu sehen.

5.3.2 Immunphänotypisierungen mit dem spezifischen mAk gegen TREM-A1

5.3.2.1 Einfachfärbungen

Um festzustellen, in welchen Organen TREM-A1 auf der Zelloberfläche exprimiert wird, wurden die Leukozyten der in Abbildung 25 aufgeführten Organe präpariert und mit dem mAk 14C9 und 17H3 gefärbt. Da die Färbungen mit 17H3 zu denselben Ergebnissen führten, sind auf S. 98 die Ergebnisse der Färbungen mit 14C9 dargestellt. TREM-A1 konnte auf etwa der Hälfte der B-Zellen in der Bursa und auf etwa 10 % der T-Zellen im Thymus detektiert werden. Die TREM-A1-positiven Zellarten von PBMC, Knochenmark, Milz und Caecaltonsillen wurden in Doppelfärbungen genauer analysiert.

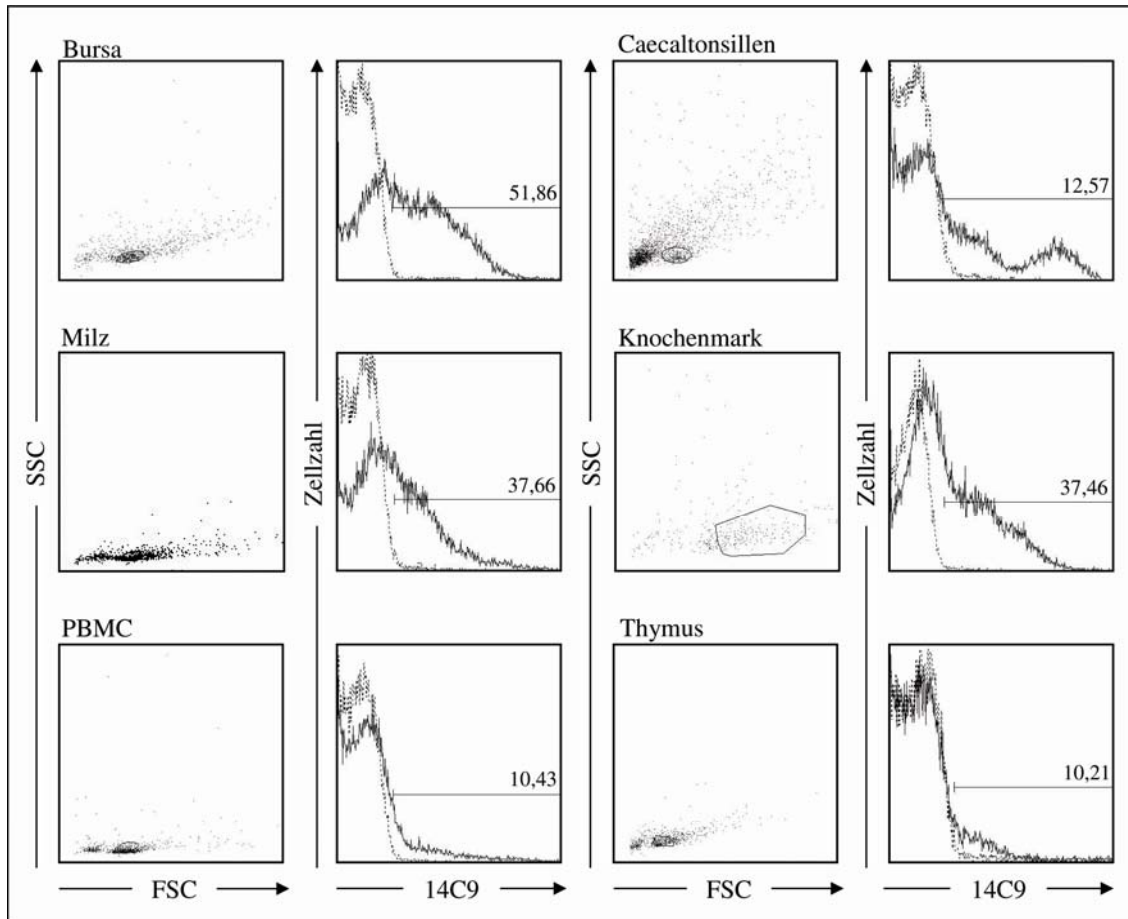


Abbildung 25: Darstellung der in der Durchflusszytometrie mit Anti-TREM-A1 (14C9) getesteten primären Zellen. In der ersten und dritten Spalte von links sind die ausgewählten Leukozyten im Streulicht dargestellt, in der zweiten und vierten Spalte von links die entsprechenden Einfachfärbungen mit 14C9 mit Angabe der TREM-A1-positiven Zellen in % der Gesamtleukozyten. Die Negativkontrollen sind gestrichelt markiert.

5.3.2.2 Doppelfärbungen

Die nach Einfachfärbung positiven primären Zellen wurden zur eindeutigen Identifizierung der Zellart doppelgefärbt. Dabei war TREM-A1 sowohl auf etwa der Hälfte der B-Zellen von Knochenmark und Milz und auf etwas weniger als einem Drittel der B-Zellen aus PBMC und Caecaltonsillen als auch auf einer Subpopulation der T-Zellen zu detektieren (siehe Abbildung 26 auf S. 99).

Daneben befindet sich TREM-A1, wie in Abbildung 27 auf S. 100 gezeigt ist, vor allem auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen von PBMC und Knochenmark. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse von sechs unabhängigen Versuchen.

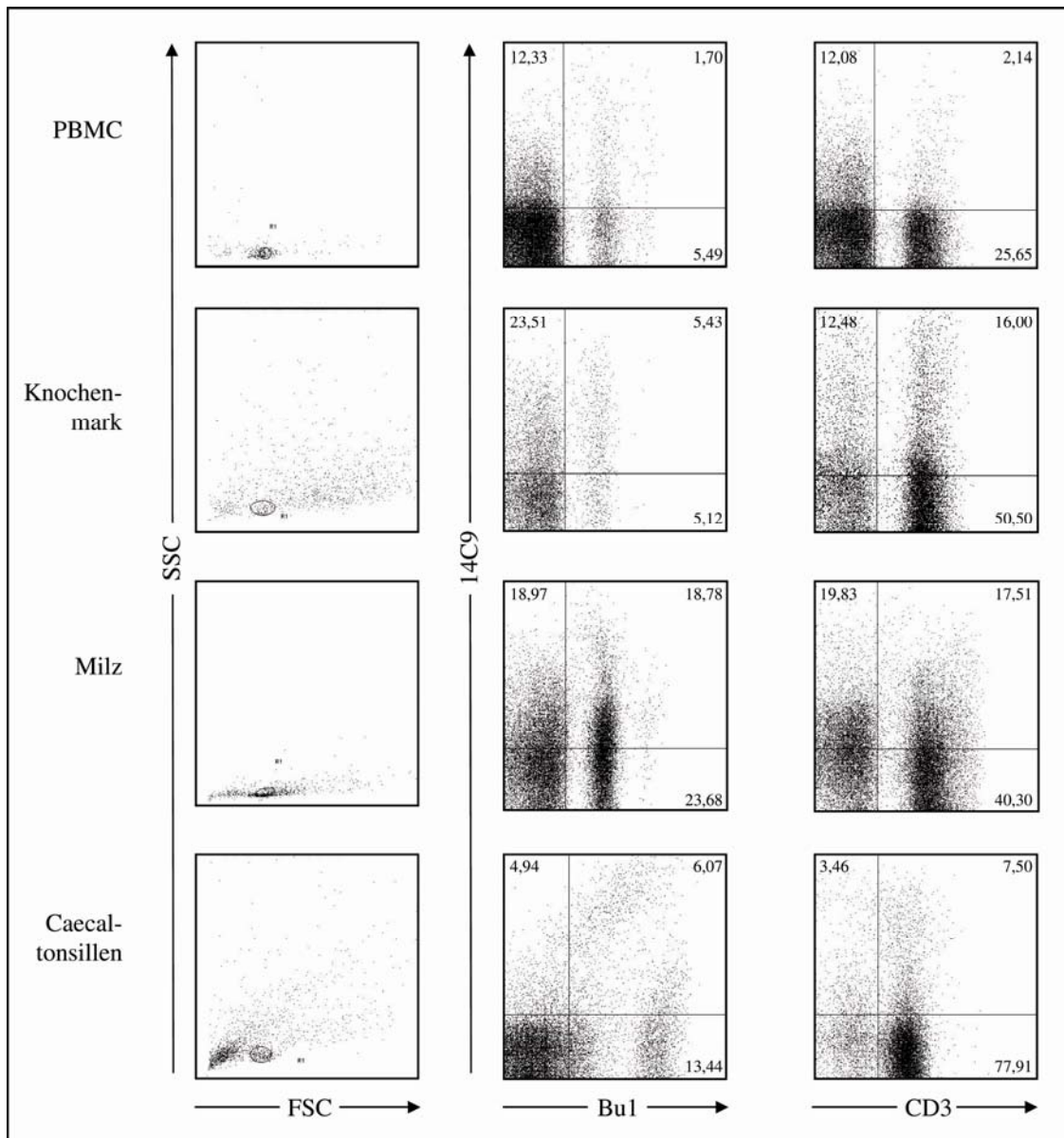


Abbildung 26: Darstellung der Doppelfärbungen mit Anti-TREM-A1 (14C9) und B-Zell-spezifischen Anti-Bu1 (mittlere Spalte) und T-Zell-spezifischen anti-CD3 Antikörpern (rechte Spalte). Die linke Spalte zeigt die im Streulicht dargestellten ausgewählten Lymphozyten. TREM-A1 konnte auf Subpopulationen von B- und T-Zellen detektiert werden.

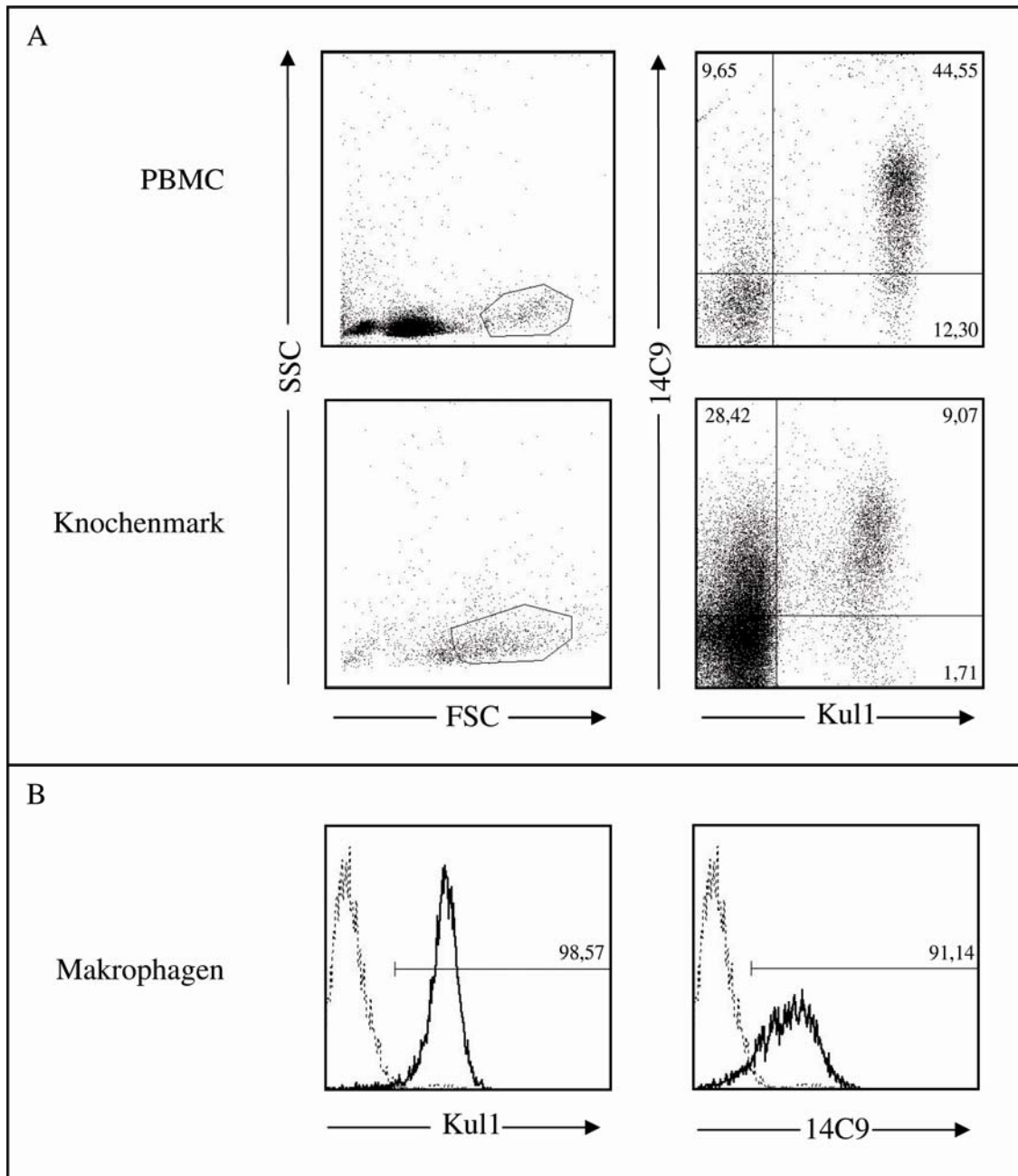


Abbildung 27: A: Doppelfärbung mit Anti-TREM-A1 (14C9) und dem für Monozyten und Makrophagen spezifischen Antikörper Kul1. Die linke Spalte zeigt die im Streulicht dargestellten ausgewählten Leukozyten. Die Gates wurden vor allem auf Monozyten gelegt.

B: Einfachfärbungen von Makrophagen mit Kul1 (links) und 14C9 (rechts). Die Negativkontrollen sind gestrichelt dargestellt.

5.4 Biochemische Analyse von TREM-A1 und TREM-B1

Zur biochemischen Analyse von TREM-A1 und TREM-B1 wurden transient bzw. stabil transfizierte Zelllinien im Western Blot analysiert.

5.4.1 Western Blot Analyse von TREM-A1

293T-Zellen, die transient mit dem TREM-A1-V5-Konstrukt transfiziert wurden, wurden lysiert, mit dem Anti-V5-mAk immunpräzipitiert und TREM-A1-V5 unter reduzierenden bzw. nicht reduzierenden Bedingungen und nach Deglykosylierung im Western Blot mit Anti-V5-HRP detektiert.

Das relative Molekulargewicht (M_R) von TREM-A1 lag nach Deglykosylierung bei ca. 25 kDa und unter reduzierenden bzw. nicht reduzierenden Bedingungen bei 35 bzw. 45 kDa. TREM-A1 wurde als unterschiedlich stark glykosyliertes Monomer exprimiert (siehe Abbildung 28).

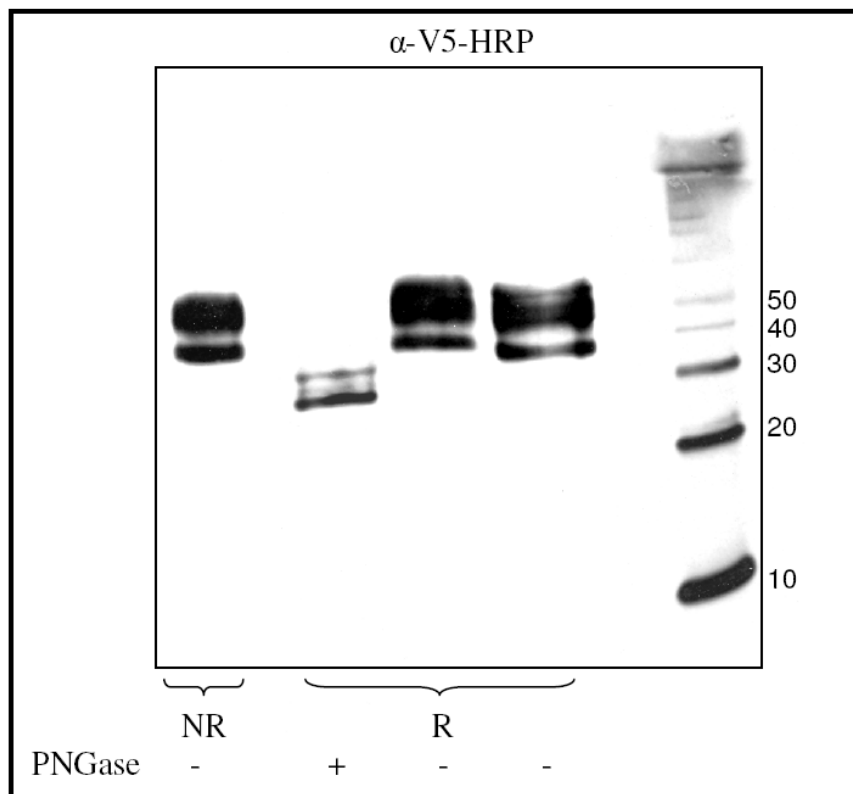


Abbildung 28: Im Western Blot aufgetragenes α -V5-Immupräzipitat von Lysat aus transient mit dem TREM-A1-V5-Konstrukt transfizierten 293T-Zellen. Das M_R von TREM-A1 lag nach Deglykosylierung (R + PNGase) bei ca. 25 kDa, nicht deglykosyliert unter reduzierenden (R - PNGase) und nicht reduzierenden (NR - PNGase) Bedingungen bei ca. 35 und 45 kDa.

5.4.2 Western Blot Analyse von TREM-B1

2D8-Zellen, die stabil ein TREM-B1-FLAG-Konstrukt exprimieren, wurden lysiert, mit dem Anti-FLAG-mAk immunpräzipitiert und TREM-B1-FLAG unter reduzierenden bzw. nicht reduzierenden Bedingungen und nach Deglykosilierung im Western Blot mit Anti-FLAG-HRP detektiert.

Wie Abbildung 29 zeigt, lag das M_R von TREM-B1 nach Deglykosilierung bei ca. 47 kDa und unter reduzierenden bzw. nicht reduzierenden Bedingungen bei etwa 55 kDa. TREM-B1 wurde als glykosiliertes Monomer exprimiert.

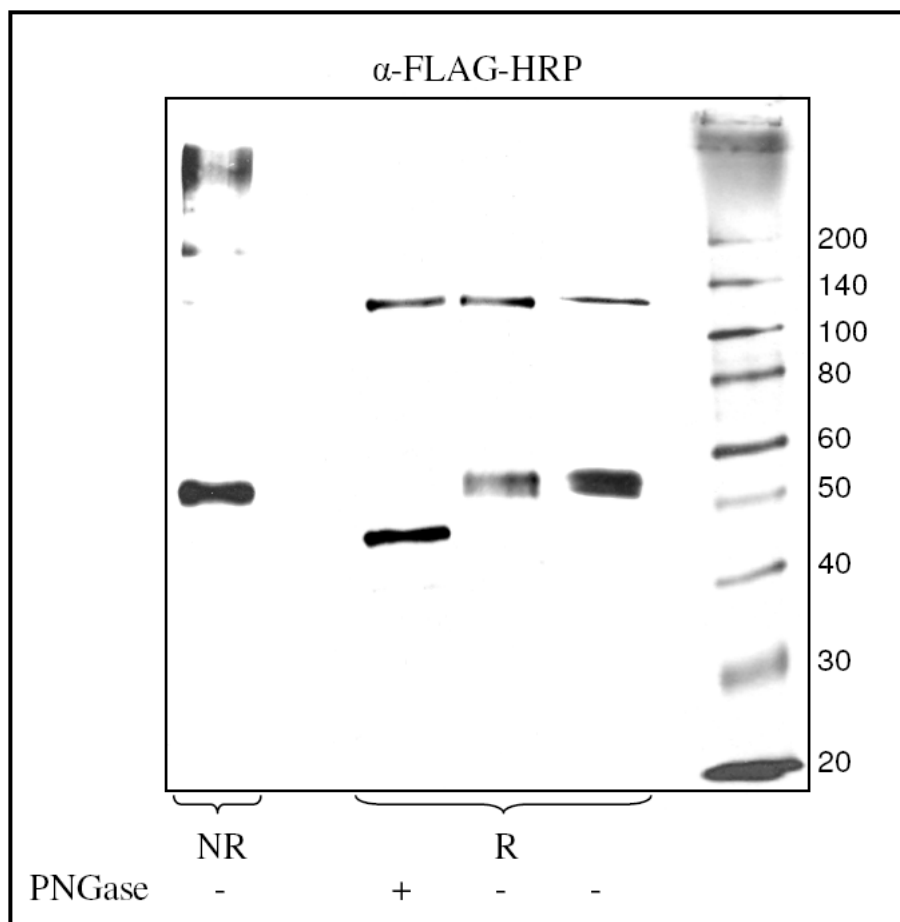


Abbildung 29: Im Western Blot aufgetragenes α -FLAG-Immünpräzipitat von Lysat aus stabil mit dem TREM-B1-FLAG-Konstrukt transfizierten 2D8-Zellen. Das M_R von TREM-B1 lag nach Deglykosilierung (R + PNGase) bei ca. 47 kDa, nicht deglykosiliert unter reduzierenden (R - PNGase) und nicht reduzierenden (NR - PNGase) Bedingungen bei ca. 55 kDa. Die unspezifische Färbung des α -FLAG-Antikörpers mit Immünpräzipitat von untransfizierten 2D8-Zellen führt zu einer Bande in einer Höhe von etwa 130 kDa [87].

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

Die stabil transfizierten TREM-B1-FLAG-2D8-Zellen wurden 0, 5 bzw. 15 min. lang mit Pervanadat behandelt, Anti-FLAG Immunpräzipitate hergestellt und diese anschließend im Western Blot mit unterschiedlichen spezifischen mAk analysiert. Es konnte dadurch nachgewiesen werden, dass die ITIMs im zytoplasmatischen Teil des Rezeptors nach Aktivierung zunehmend phosphoryliert werden und es zu einer Rekrutierung der Protein-Tyrosin-Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 kam (siehe Abbildung 30).

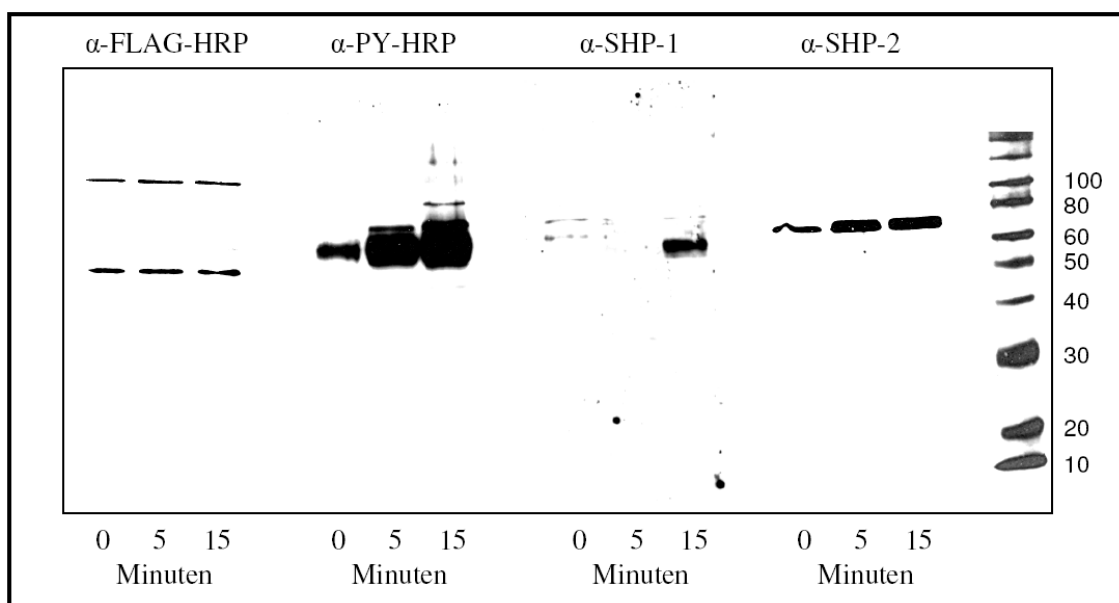


Abbildung 30: Im Western Blot aufgetragene α -FLAG-Immunpräzipitate von Lysat aus stabil mit dem TREM-B1-FLAG-Konstrukt transfizierten 2D8-Zellen, die unterschiedlich lange mit Pervanadat behandelt wurden. Die aufgetragenen Immunpräzipitate wurden mit den am oberen Bildrand aufgeführten Antikörpern detektiert. Die Färbung mit α -FLAG diente als Ladekontrolle, wobei die unspezifische Färbung des α -FLAG-Antikörpers mit Immunpräzipitat von untransfizierten 2D8-Zellen zu einer Bande in einer Höhe von etwa 130 kDa führt [87].

5.6 Ligandensuche mit Hilfe des BWZ.36-Reporterassays

Zur Detektion eines Liganden für TREM-A1 und TREM-B1 wurden BWZ.36-Zellen, die stabil ein TREM-A1- bzw. B1-zeta-FLAG-Konstrukt exprimieren, zum einen zusammen mit unstimulierten und mit PMA bzw. ConA stimulierten primären Leukozyten aus Bursa, Milz und PBMC, zum andern mit verschiedenen Hühnerzelllinien kultiviert. Nach Lyse der Zellen wurde die nach Bindung eines Liganden an den Rezeptor gebildete β -Galaktosidase detektiert. Von zehn

unabhängigen Versuchen wurde jeweils ein repräsentatives Ergebniss gezeigt. Dabei wurden nur Werte über 1,0 als spezifisch betrachtet.

5.6.1 Ligand für TREM-A1

ConA- und PMA/Calonophor-stimulierte Milzleukozyten, nicht aber andere stimulierte oder unstimulierte primäre Leukozyten exprimieren einen Liganden für TREM-A1 (siehe Abbildung 31). Auch auf den Hühnerzelllinien konnte kein Ligand detektiert werden.

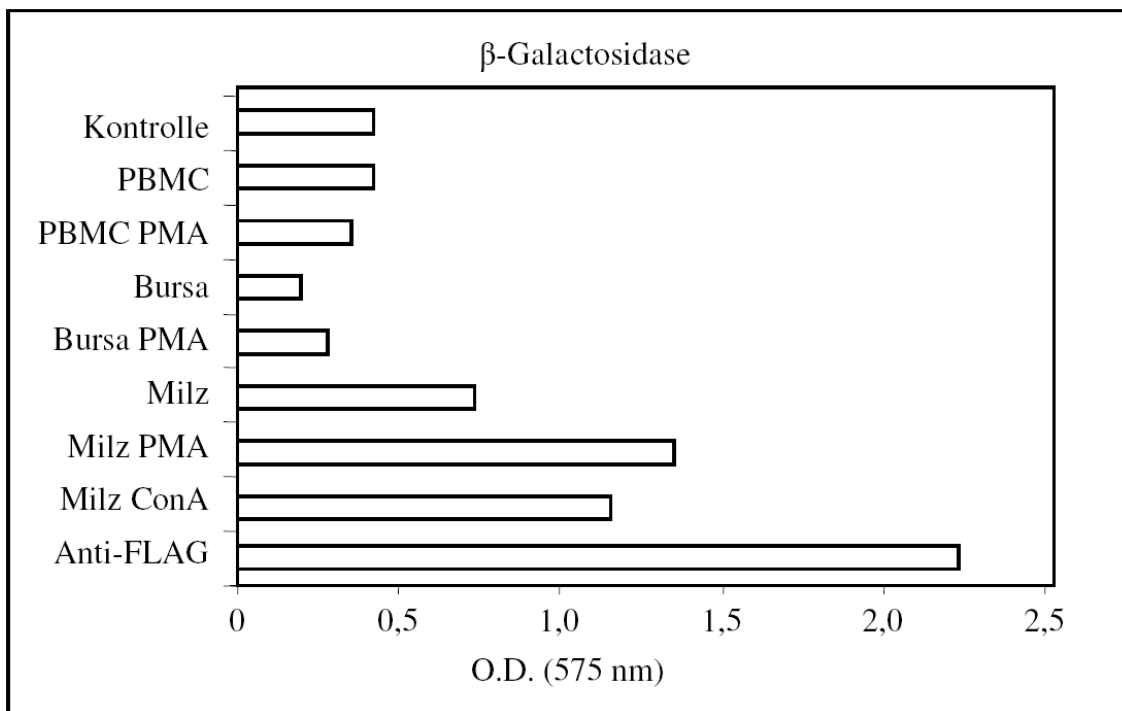


Abbildung 31: Darstellung der β -Galaktosidase-Expression. Durch Kreuzvernetzung von TREM-A1-FLAG auf BWZ.36-Zellen mit einem spezifischen Liganden kommt es zu einer erhöhten β -Galaktosidase-Expression, die durch Umsetzung des Substrates Chlorophenolrot- β -D-Galaktopyranosid bei 575 nm detektiert werden kann. Ein spezifischer Ligand wird auf PMA/Calonophor und ConA-stimulierten, nicht jedoch auf unstimulierten Milzleukozyten exprimiert.

5.6.2 Ligand für TREM-B1

Allein PMA/Calonophor-stimulierte Milzleukozyten, nicht aber andere stimulierte oder unstimulierte primäre Leukozyten exprimieren einen Liganden für TREM-B1 (siehe Abbildung 32). Auch auf ConA-stimulierte Milzleukozyten und auf Hühnerzelllinien konnte kein Ligand detektiert werden.

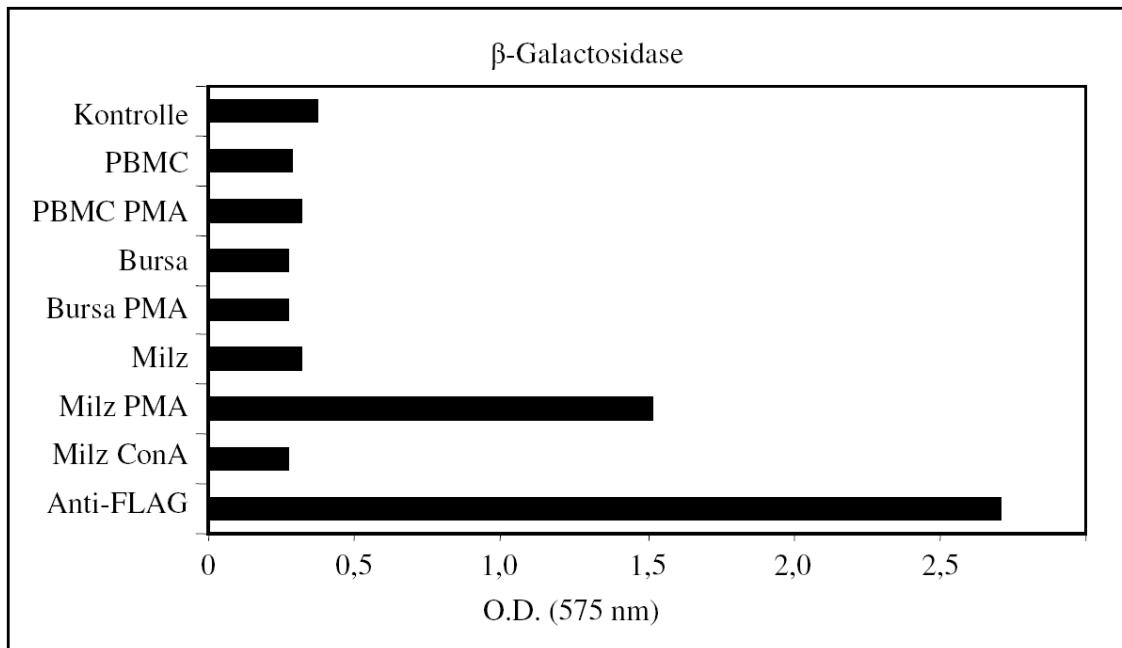


Abbildung 32: Darstellung der β -Galaktosidase-Expression. Durch Kreuzvernetzung von TREM-B1-FLAG auf BWZ.36-Zellen mit einem spezifischen Liganden kommt es zu einer erhöhten β -Galaktosidase-Expression, die durch Umsetzung des Substrates Chlorophenolrot- β -D-Galaktopyranosid bei 575 nm detektiert werden kann. Ein spezifischer Ligand wird auf PMA/Calonophor, nicht jedoch auf unstimulierten und ConA-stimulierten Milzleukozyten exprimiert.

5.7 Herstellung eines polyklonalen Kaninchenserums gegen TREM-A1

Zur Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen TREM-A1 wurde ein Kaninchen mit dem TREM-A1-huIg-Konstrukt immunisiert. Dieses sollte zur Etablierung eines Testsystems für lösliches TREM-A1 verwendet werden.

Um zu zeigen, dass das Kaninchen spezifische Antikörper gebildet hat, wurde das Kaninchenserum im ELISA getestet: zum einen in einem ELISA, der mit dem TREM-A1-huIg-Konstrukt beschichtet wurde, zum andern in einem ELISA, der mit einem für die Ig-Domäne von TREM-A1 spezifischen Peptid (Cys-Thr-Tyr-Asn-Pro-Arg-Gln-Gln-Arg-Trp-Arg-Glu-Lys-Ser-Trp) beschichtet wurde. Dadurch konnte gezeigt werden, dass das Kaninchen zwar Antikörper gegen TREM-A1 gebildet hat, die meisten Antikörper aber gegen die CH₂ und CH₃-Region des huIg-Moleküls gerichtet sind (siehe Abbildung 33 und Abbildung 34).

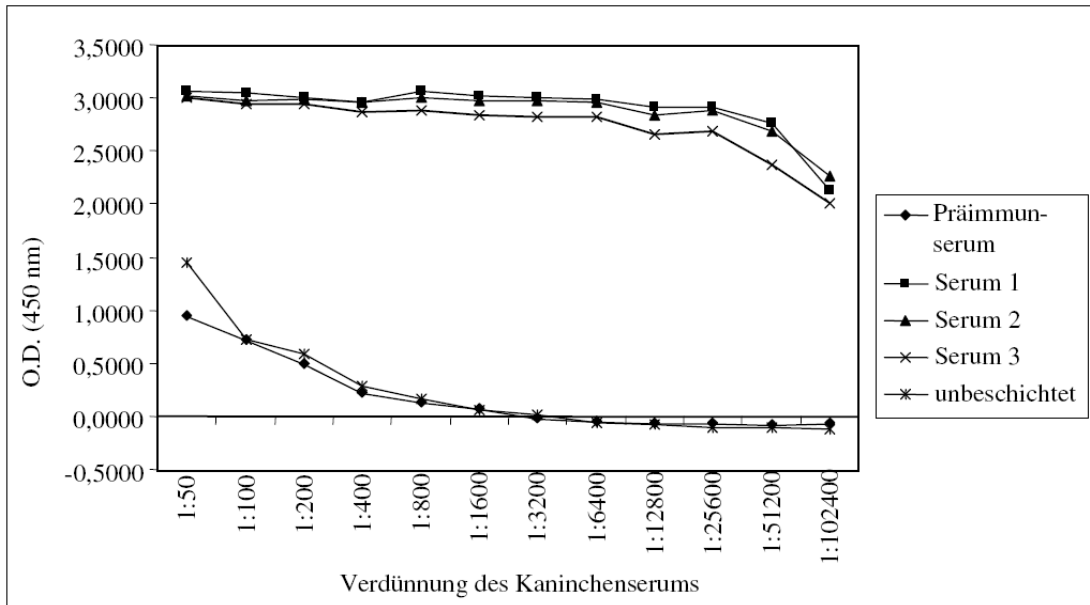


Abbildung 33: ELISA zum Nachweis der Spezifität des Kaninchenserums. Die Dellen wurden mit 1 µg/ml TREM-A1-huIg beschichtet und das Kaninchens Serum ab einer Verdünnung von 1:50 über 11 Stufen log₂ titriert. Als Negativkontrolle diente die Färbung mit Präimmuns serum. Der Wert der Kontrolle, in der kein Serum verwendet wurde, wurde von allen Werten abgezogen.

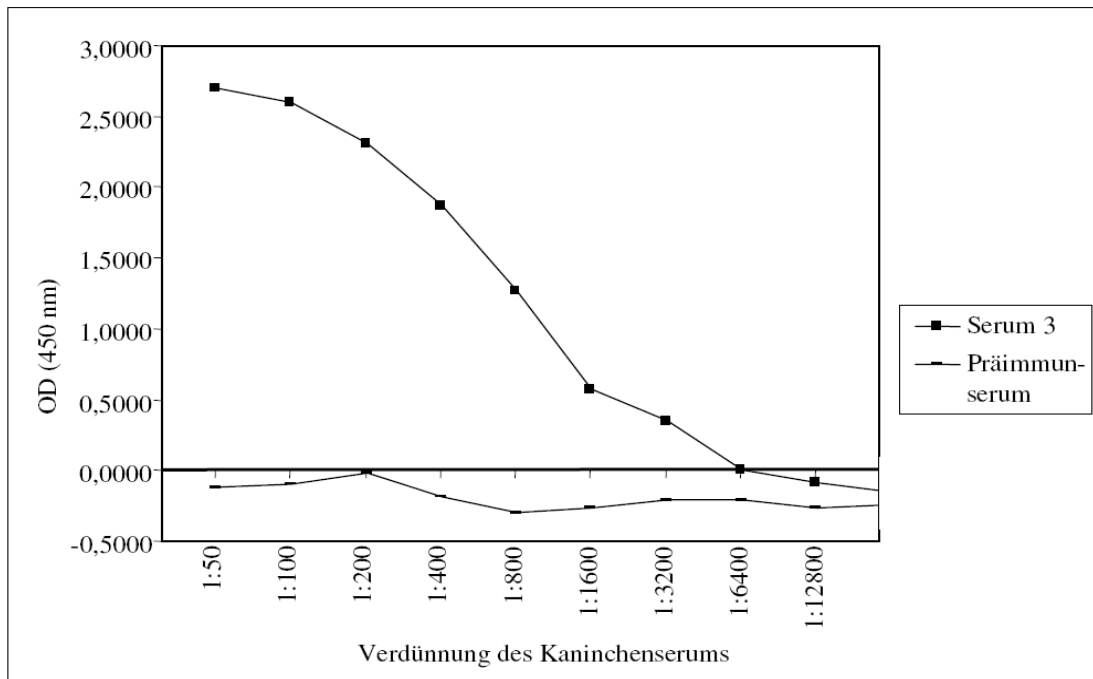


Abbildung 34: ELISA zum Nachweis der Spezifität des Kaninchenserums. Die Dellen wurden mit 1 µg/ml TREM-A1 spezifischen Peptid beschichtet und das Kaninchens Serum ab einer Verdünnung von 1:50 über 8 Stufen log₂ titriert. Als Negativkontrolle diente die Färbung mit Präimmuns serum. Der Wert der Kontrolle, in der kein Serum verwendet wurde, wurde von allen Werten abgezogen.

5.8 Herstellung des TREM-A1-COMP-FLAG-Konstruktes

Um den Liganden für TREM-A1 auf den mit Hilfe des BWZ.36-Reporterassays ermittelten stimulierten primären Zellen genauer zu charakterisieren, wurde ein lösliches COMP-FLAG-Konstrukt hergestellt, das aufgrund seiner Pentamerstruktur besser an den Liganden binden kann als das TREM-A1-huIg-Konstrukt. Das COMP-FLAG-Konstrukt besteht aus dem extrazytoplasmatischen Anteil von TREM-A1 und dem humanem COMP, welches mit ein FLAG-Epitop markiert ist, wobei sich die COMP-Elemente zu Pentameren zusammenlagern. 293-Zellen wurden stabil mit dem TREM-A1-COMP-FLAG-Konstrukt transfiziert und der Überstand der im COMP-FLAG-ELISA positiven Klone über Affinitätschromatographie aufgereinigt.

5.8.1 Nachweis des TREM-A1-COMP-FLAG-Konstruktes

Zum Nachweis des aufgereinigten TREM-A1-COMP-FLAG-Konstruktes wurde dieses nicht nur im COMP-FLAG-ELISA getestet, sondern auch mit Hilfe des polyklonalen Kaninchenserums gegen TREM-A1. Die Ergebnisse sind in Abbildung 35 und Abbildung 36 gezeigt.

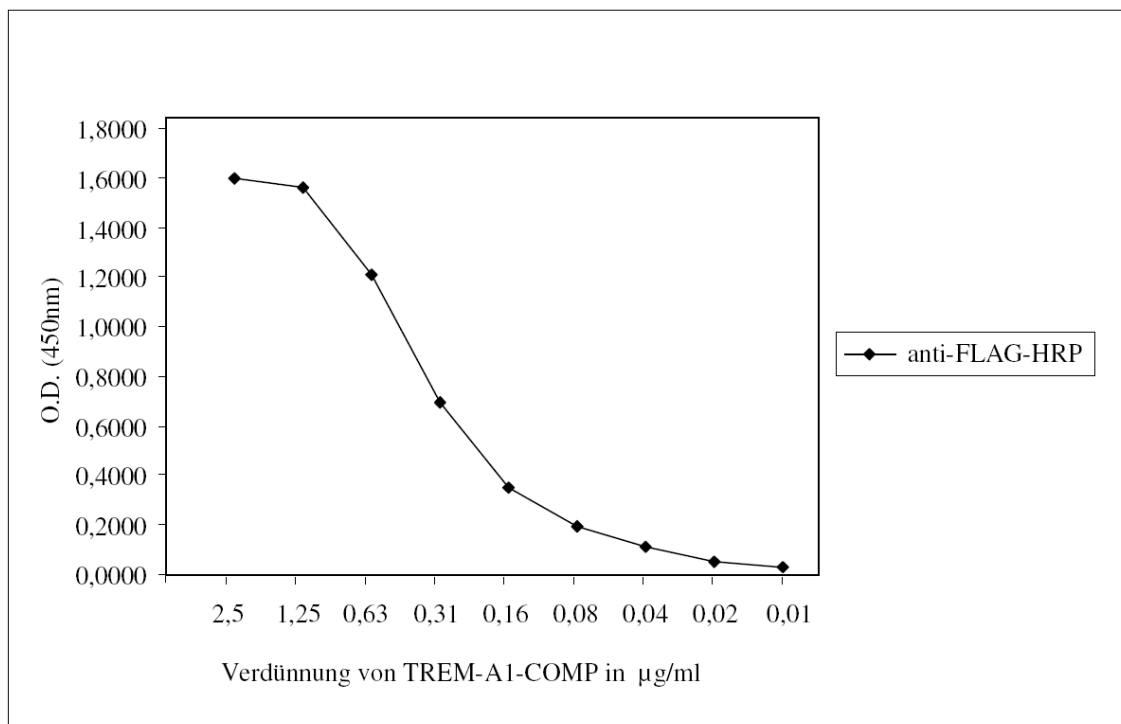


Abbildung 35: ELISA zum Nachweis des aufgereinigten TREM-A1-COMP-FLAG-Konstruktes. Die Dellen wurden mit 1 µg/ml anti-FLAG-M2® beschichtet und das COMP-FLAG-Konstrukt ab 2,5 µg/ml

über 8 Stufen log₂ titriert. Der Wert der Kontrolle ohne COMP-FLAG-Konstrukt wurde von allen Werten abgezogen.

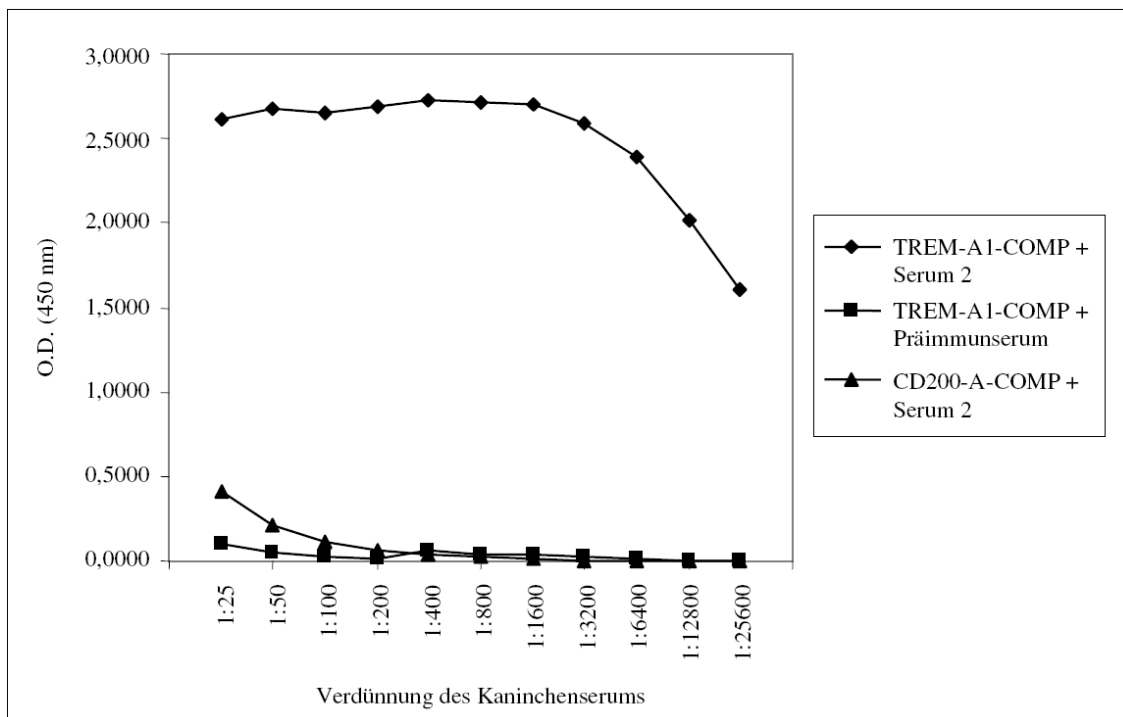


Abbildung 36: ELISA zum Nachweis des aufgereinigten TREM-A1-COMP-FLAG-Konstruktes. Die Dellen wurden mit 1 µg/ml TREM-A1-COMP-FLAG beschichtet und das Kaninchenserum ab einer Verdünnung von 1:25 über 11 Stufen log₂ titriert. Als Negativkontrolle diente neben der Detektion mit dem Präimmunserum auch die Beschichtung mit 1 µg/ml CD200-A-COMP-FLAG. Die Werte der entsprechenden unbeschichteten Dellen wurden als Kontrollen abgezogen.

5.8.2 Nachweis der Pentamerstruktur im Western Blot

Zum Nachweis der Pentamerstruktur wurde das aufgereinigte TREM-A1-COMP-FLAG-Konstrukt im Western Blot unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen analysiert und mit Anti-FLAG-HRP detektiert.

Das relative Molekulargewicht lag unter nicht reduzierenden Bedingungen bei 125 und 145 kDa und zeigt die unterschiedlich starke Glykosilierung des TREM-A1-COMP-FLAG-Konstruktes. Die in Abbildung 37 auf S. 109 erkennbare Bande bei etwa 35 kDa unter reduzierenden Bedingungen konnte im 8%igem SDS-Gel nicht weiter aufgetrennt werden.

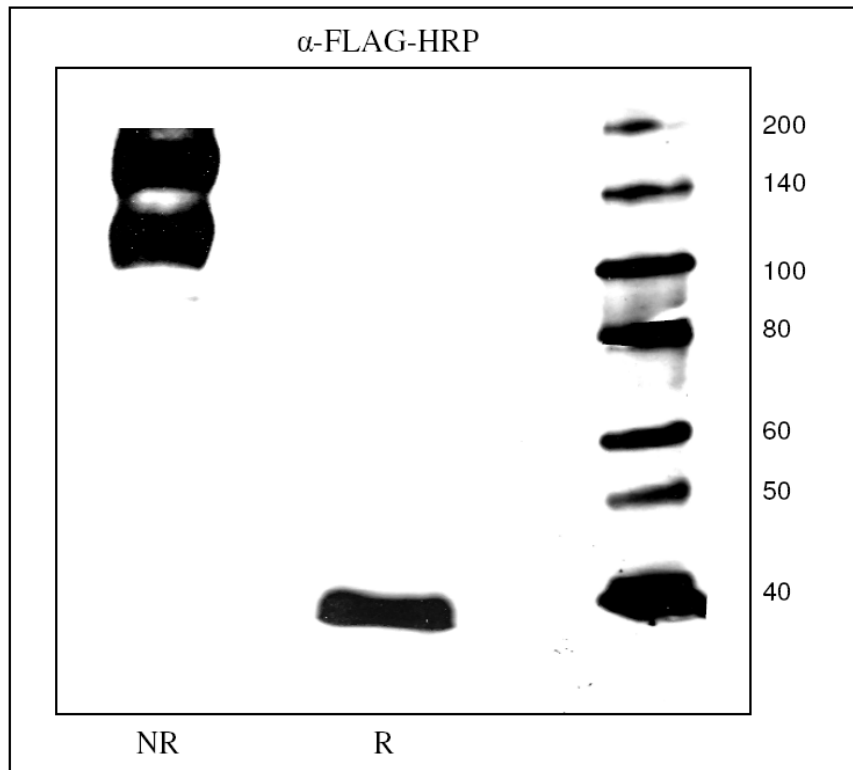


Abbildung 37: Im Western Blot aufgetragenes aufgereinigtes pentameres TREM-A1-COMP-FLAG. Das M_R von TREM-A1 lag unter reduzierenden Bedingungen (R) bei ca. 125 und 145 kDa. Im 8%igem SDS-Gel war unter nicht reduzierenden Bedingungen (NR) nur eine Bande bei etwa 35 kDa erkennbar.

5.8.3 Nachweis der Bindung von TREM-A1-COMP-FLAG an seinen Liganden

Um zu zeigen, dass ConA- und PMA/Calonophor-stimulierte Milzleukozyten einen Liganden für TREM-A1 auf der Oberfläche exprimieren, wurden diese Zellen mit TREM-A1-COMP-FLAG und TREM-A1-huIg gefärbt und mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Abbildung 38 auf S. 110 zeigt, dass mehr ConA stimulierte Milzleukozyten den Liganden exprimieren als PMA/Calonophor stimulierte und dass die Färbung mit dem pentameren TREM-A1-COMP-FLAG deutlich besser ist, als die Färbung mit dem TREM-A1-huIg-Konstrukt. Die Färbung wurde viermal unabhängig voneinander wiederholt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis dieser Versuche.

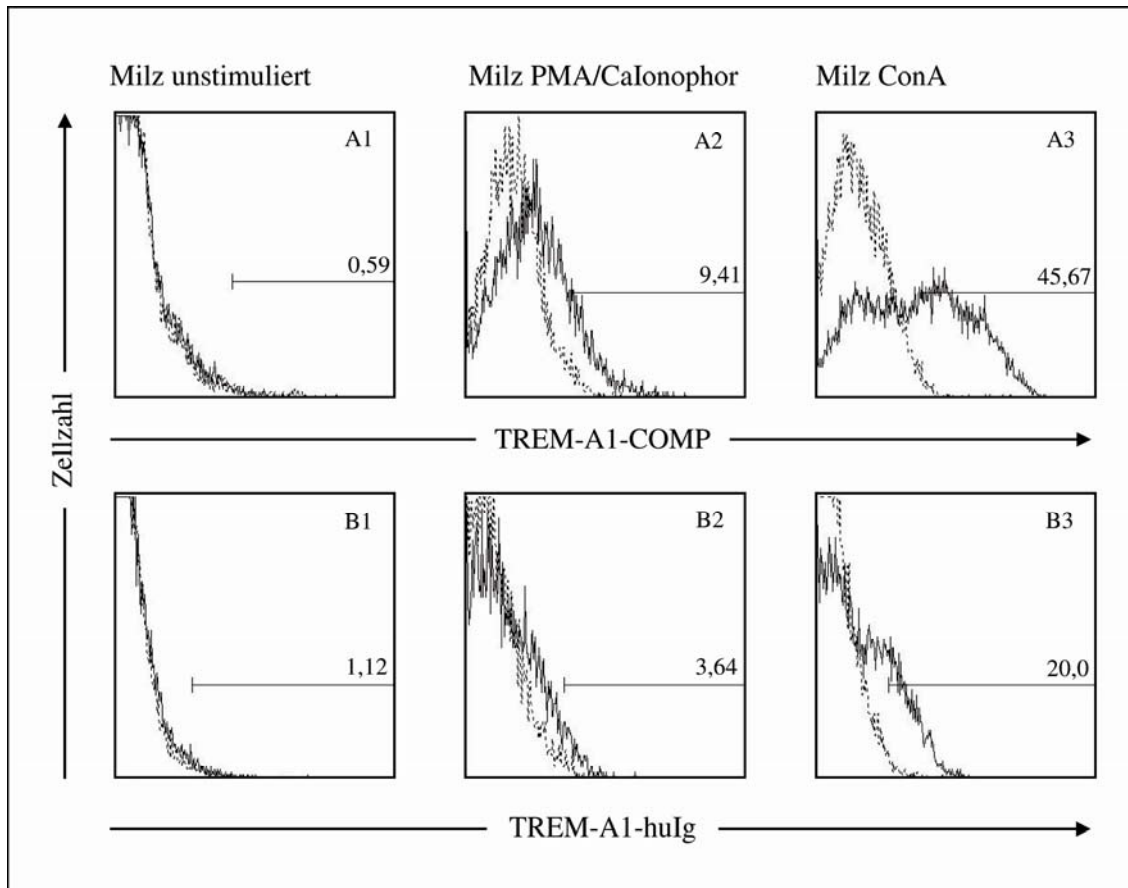


Abbildung 38: Darstellung der Färbungen von Milzleukozyten mit TREM-A1-COMP-FLAG (Reihe A) und mit dem TREM-A1-huIg-Konstrukt (Reihe B) je in einer Konzentration von 35 µg/ml. In Spalte 1 sind unstimulierte Milzleukozyten, in Spalte 2 mit PMA/CaIonophor stimulierte und in Spalte 3 mit ConA stimulierte Milzleukozyten gezeigt. Als Negativkontrolle wurde in Reihe A anti-FLAG-M2® mit sekundärem Antikörper allein verwendet, in Reihe B das nicht bindende CHIR-B2-huIg-Konstrukt. Diese Kontrollen sind gestrichelt dargestellt.

6 Diskussion

Im Rahmen dieser Dissertation wurden verschiedene Vertreter der TREMs beim Haushuhn genauer charakterisiert. Diese sind auf dem BAC-Klon 94J19 des Hühnerchromosom 26 lokalisiert und somit Mitglieder einer Multigenfamilie.

Die Familie der TREMs beim Huhn besteht aus dem potentiell aktivierenden TREM-A1 und den beiden potentiell inhibitorischen TREM-B1 und TREM-B2. Diese drei Rezeptoren werden nachfolgend im Detail besprochen.

6.1 Eingehende Charakterisierung von TREM-A1

6.1.1 Struktur und biochemische Analyse

TREM-A1 ist ein Rezeptor mit einer extrazytoplasmatischen Ig-Domäne vom V-Typ mit den Charakteristika eines aktivierenden Rezeptors, wie ein kurzer zytoplasmatischer Abschnitt und ein transmembraner Bereich, mit der positiv geladenen AS Lysin [1].

Dieselben Merkmale weisen die mit dem Adaptormoleküle DAP12 assoziierten Rezeptoren TREM-1, TREM-2 und TRAPC beim Säuger auf.

Viertlböck et al. zeigten bereits, dass die Homologie zwischen der Ig-Domäne des humanen TREM-2 und der des TREM-A1 beim Huhn auf Proteinebene bei 44 % lag, und damit zum Teil höher lag als die humanen TREMs untereinander.

Bei TREM-A1 handelt es sich um ein unterschiedlich stark glykosiliertes, 25 kDa großes Protein, das als Monomer exprimiert wird (siehe Abbildung 28 auf S. 101). Errechnet war eine Größe von 24,5 kDa.

6.1.2 Gewebeverteilung

Der spezifische Nachweis von mRNA-Transkripten von TREM-A1 wurde mit Hilfe der qPCR durchgeführt, indem ein Primerpaar etabliert wurde, mit dem die mRNA der transmembranen Form des Rezeptors nachgewiesen werden konnte. Die Abbildung 17 auf S. 92 zeigt, dass TREM-A1 insbesondere auf Monozyten und Makrophagen exprimiert wird. Hohe mRNA-Konzentrationen konnten auch in Knochenmark, Gehirn, Bursa, Milz, PBMC und PBL detektiert werden. Nach Stimulation von Makrophagen mit IFN γ oder TLR-

Liganden, wie LPS und bakterieller DNA, kommt es zu einer starken Abnahme der Expression von TREM-A1-mRNA (siehe Abbildung 23 auf S. 96).

Zur weiteren Analyse der Gewebeverteilung von TREM-A1 wurde ein spezifischer mAk hergestellt (14C9), um die Proteinexpression auf Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie zu detektieren. Zur eindeutigen Bestimmung der Zellart wurden die bei der Einfachfärbung positiven primären Zellen doppelgefärbt. Dabei konnte gezeigt werden, dass TREM-A1 vor allem auf Monozyten und Makrophagen aus PBMC und Knochenmark exprimiert wird (siehe Abbildung 27 auf S. 100). TREM-A1 konnte aber auch auf B-Zellen und CD3⁺ Zellen detektiert werden. Dabei waren 50 % der B-Zellen aus Bursa, Knochenmark und Milz und weniger als ein Drittel der B-Zellen aus PBMC und Caecaltonsillen TREM-A1 positiv. Außerdem wurde eine Subpopulation der T-Zellen mit Anti-TREM-A1 mAk gefärbt, die aber nicht näher charakterisiert werden konnte.

Vergleicht man die Ergebnisse der qPCR mit denen der Durchflusszytometrie, stellt man fest, dass man mit beiden Methoden membranständiges TREM-A1 auf Monozyten und Makrophagen eindeutig nachweisen konnte. Mit Hilfe der qPCR kann allerdings nicht anhand der gewonnenen Gewebeproben erkannt werden, welche Zellart TREM-A1 exprimiert. Dafür müssten die einzelnen Zellpopulationen aus den verschiedenen Organen mit Hilfe immunologischer Verfahren aufgereinigt werden und die mRNA-Expression aus diesen Subpopulationen ermittelt werden. Andererseits ist der Nachweis von spezifischer mRNA nicht unbedingt zwingend für eine Expression dieses Proteins auf der Zelle. Mit einem spezifischen mAk kann man allerdings durch Einfach- und Doppelfärbungen die Proteinexpression auf verschiedenen Zellpopulationen mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysieren.

Vergleicht man die Expression von TREM-A1 beim Huhn mit den TREMs beim Säuger, kann man feststellen, dass sowohl TREM-A1 als auch TREM-1, TREM-2 und TRAPC beim Säuger auf Monozyten und Makrophagen exprimiert wird. Allerdings wird TREM-1 auch auf neutrophilen Granulozyten exprimiert [7], wohingegen man TREM-2, ähnlich wie TREM-A1, auch auf Zellen des Knochenmarks und Gehirns detektieren kann [41, 43]. Auch TRAPC konnte auf Knochenmarks- und Milzzellen detektiert werden, und wie TREM-A1 auch auf B-Zellen, nicht jedoch im Gehirn und auf T- oder NK-Zellen [69].

Während es nach Stimulation muriner Makrophagen mit LPS zu einer erhöhten Expression von TREM-1 und TRAPC kommt [9, 17, 69], wird die Expression von TREM-2 nach Stimulation mit LPS oder IFN γ erniedrigt [41, 47]. Die Expression von TREM-A1 nimmt, ähnlich wie die von TREM-2, nach Stimulation von Makrophagen ab.

Die Expression von membrangebundenem TREM-A1 weist somit vor allem Gemeinsamkeiten mit der Expression von TREM-2 auf.

6.1.3 Splice-Variante

Neben dem Primerpaar, mit dem die transmembrane Form von TREM-A1 mit Hilfe der qPCR detektiert werden konnte, wurde auch ein Primerpaar etabliert, das nur die Ig-Domäne detektiert. Dabei wurden in PBMC hohe Expressionsunterschiede zwischen der membrangebundenen Form des Rezeptors und seiner Ig-Domäne festgestellt. Kombiniert mit der Tatsache, dass dieser Unterschied weder in Makrophagen noch in PBL detektierbar war, lag der Verdacht nahe, dass die Ig-Domäne vor allem von Thrombozyten, nicht aber von Monozyten exprimiert wird. Bei der Analyse von Thrombozyten-mRNA in der qPCR stellte sich heraus, dass Thrombozyten die mRNA für die Ig-Domäne von TREM-A1 viel häufiger exprimieren als für die Expression von membranständigem TREM-A1 nötig wäre (siehe Abbildung 18 und Abbildung 19 auf S. 93). Dies lässt vermuten, dass Thrombozyten eine Splice-Variante von TREM-A1 bilden und dieses alternative Splicing zur Produktion einer löslichen Form des Rezeptors führt.

Eine lösliche Form von humanem TREM-1, dessen genauer Ursprung noch nicht zweifelsfrei geklärt ist, konnte in humanem Plasma, aber auch in Makrophagenkulturen und nach Stimulation von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen mit LPS oder einem Zellwandbestandteil von *Mycobacterium bovis* BCG nachgewiesen werden [18, 19, 22]. Von TREM-2 wurde eine Splice-Variante beschrieben, die keine transmembrane Region besitzt. Diese lösliche Form des Rezeptors (sTREM-2) konnte in Makrophagenkulturen detektiert werden [41, 42].

Beim Huhn konnte bisher nur eine Splice-Variante von TREM-A1 auf mRNA-Ebene in Thrombozyten detektiert werden. Der Nachweis einer löslichen Form des Rezeptors auf Proteinebene steht aber noch aus. Deshalb ist ein struktureller und funktioneller Vergleich zu den Splice-Varianten der TREMs beim Säuger sehr schwierig.

6.1.4 Ligand

Zum spezifischen Nachweis eines Liganden für TREM-A1 auf der Oberfläche von Zellen wurde ein BWZ.36-Reporterassay etabliert, mit dessen Hilfe die Bindung eines Liganden über die Expression von β -Galaktosidase detektiert werden konnte. Es konnte gezeigt werden, dass mit PMA/CaIonophor und ConA stimulierte Milzleukozyten einen Liganden für TREM-A1

exprimieren, nicht jedoch Leukozyten aus anderen Organen oder unstimulierte Milzleukozyten (siehe Abbildung 31 auf S. 104).

Daneben konnte mit Hilfe einer Färbung mit dem löslichen pentameren TREM-A1-COMP-FLAG in der Durchflusszytometrie die Bindung an den Liganden auf diesen Zellen detektiert werden.

Weder für TREM-A1 noch für die Mitglieder der TREMs beim Säuger konnte bisher ein Ligand molekular genau identifiziert werden. Die Bindung von TREM-1 bzw. TREM-2-huIg-Konstrukten an Zellen lässt allerdings vermuten, dass diese Zellen einen spezifischen Liganden tragen. Während demnach ein Ligand für TREM-1 auf Blutplättchen exprimiert sein könnte, bindet das TREM-2-huIg-Fusions-Protein an Knochenmarksmakrophagen [51], Astrozytoma-Zelllinien und an bestimmte Oberflächenmoleküle von pathogenen Mikroorganismen [66]. Der Ligand von TRAPC wird offenbar auf Makrophagen, DCs aus dem Knochenmark, B-Zellen und Milzzellen exprimiert [69]. Der Ligand von TREM-A1 beim Huhn ist dagegen nur auf stimulierten Milzleukozyten exprimiert.

6.2 Eingehende Charakterisierung von TREM-B1

6.2.1 Struktur und biochemische Analyse

TREM-B1 ist ein Rezeptor mit zwei extrazytoplasmatischen Ig-Domänen vom V-Typ mit den Charakteristika eines inhibitorischen Rezeptors, wie ein langer zytoplasmatischer Abschnitt mit drei ITIMs und ein ungeladener transmembraner Bereich. Dieselben Merkmale weist auch TLT-1 beim Säuger auf.

Viertlböck et al. zeigten bereits, dass die Homologie zwischen den V-Typ-Ig-Domänen der inhibitorischen Rezeptoren von Mensch und Huhn zwischen 10 und 30 % lag [1].

Bei TREM-B1 handelt es sich um ein glykosiliertes 47 kDa großes Protein, das als Monomer exprimiert wird (siehe Abbildung 29 auf S. 102). Errechnet war ein Molekulargewicht von 46 kDa.

6.2.2 Gewebeverteilung

Mit Hilfe der qPCR und einem Primerpaar, das spezifisch für die membran-distale Ig-Domäne von TREM-B1 ist, konnte gezeigt werden, dass die mRNA von TREM-B1 beim Huhn vor allem in PBMC exprimiert wird, und dabei insbesondere in Thrombozyten. Niedrigere

Konzentrationen von TREM-B1-mRNA konnten aber auch in Knochenmark, Milz und PBL detektiert werden (siehe Abbildung 20 und Abbildung 21 auf S. 94 und 94).

Das murine TLT-1 wird in α -Granulas von Blutplättchen und Megakaryozyten und auf der Oberfläche von Blutplättchen exprimiert [67, 68].

Nach Stimulation von Makrophagen mit TLR-Liganden und IFN γ kommt es zu einer Abnahme der Expression von TREM-B1-mRNA beim Huhn (siehe Abbildung 23 auf S. 96).

6.2.3 Signaltransduktion

Durch Pervanadatbehandlung von stabil mit TREM-B1-FLAG transfizierten 2D8-Zellen konnte gezeigt werden, dass die ITIMs im zytoplasmatischen Bereich von TREM-B1 zur Signaltransduktion fähig sind. Es konnte eine Phosphorylierung der Tyrosinreste und die Rekrutierung der Protein-Tyrosin-Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 30 auf S. 103). SHP-2 wird auch bei dem murinem TLT-1 rekrutiert, während SHP-1 und SHIP nicht an der Signaltransduktion beteiligt sind [68].

Allerdings kann auch in den Abbildungen von Barrow et al. [68] ebenso wie in Abbildung 30 eine Rekrutierung von SHP-2 bereits vor Aktivierung des Rezeptors nachgewiesen werden. Diese konstitutive Bindung von SHP-2 wurde bis jetzt nur bei den NK-Zell-spezifischen KIR nachgewiesen [88].

6.2.4 Ligand

Zum Nachweis eines Liganden für TREM-B1 auf der Oberfläche von Zellen wurde auch für diesen Rezeptor der BWZ.36-Reporterassay etabliert. Es konnte gezeigt werden, dass mit PMA/CaIonophor stimulierte Milzleukozyten einen Liganden für TREM-B1 exprimieren. Allerdings konnte weder auf Leukozyten aus anderen Organen noch auf mit ConA stimulierten oder unstimulierten Milzleukozyten ein Ligand für TREM-B1 detektiert werden (siehe Abbildung 32 auf S. 105).

Für inhibitorische Rezeptoren der TREMs beim Säuger ist bis jetzt noch kein Ligand beschrieben worden.

6.3 Charakterisierung von TREM-B2

6.3.1 Struktur

TREM-B2 ist ein inhibitorischer Rezeptor mit einem langen zytoplasmatischen Abschnitt mit ITIMs und einem ungeladenen transmembranen Bereich, von dem mehrere Splice-Varianten mit einer unterschiedlichen Anzahl an extrazytoplasmatischen Ig-Domänen vom V-Typ existieren.

TREM-B2v3 besitzt vier Ig-Domänen und ist damit der erste beschriebene Rezeptor der TREMs beim Säuger und Huhn, der vier Ig-Domänen in seinem extrazytoplasmatischen Abschnitt aufweist.

Neben dieser Variante von TREM-B2 existieren noch zwei weitere Varianten, die von Viertlböck et al. [1] beschrieben wurden. Dabei handelt es sich um einen Rezeptor mit zwei Ig-Domänen (TREM-B2v1) und um einen mit einer Ig-Domäne (TREM-B2v2). Es ist interessant, dass sich bei den vier Ig-Domänen der dritten Variante um eine Verdopplung der beiden Ig-Domänen von TREM-B2v1 handelt und dass TREM-B2v2 die membran-distale Ig-Domäne von TREM-B2v1 fehlt. Wahrscheinlich handelt es sich bei den beiden von Viertlböck et al. beschriebenen Formen um Splice-Varianten von TREM-B2v3.

Wie bereits erwähnt, liegt die Homologie zwischen den V-Typ-Ig-Domänen der inhibitorischen Rezeptoren von Mensch und Huhn zwischen 10 und 30 %.

6.3.2 Gewebeverteilung

Eine Unterscheidung der drei Splice-Varianten von TREM-B2 war mit Hilfe der qPCR nicht eindeutig möglich. Es konnte aber mit Hilfe eines Primerpaares, das spezifisch für den Bereich zwischen Signalpeptid und der ersten Ig-Domäne ist, die Gewebeverteilung aller drei Splice-Varianten ermittelt werden. Dabei stellte sich heraus, dass TREM-B2 vor allem in PBMC und Makrophagen exprimiert wird, etwas weniger hoch in Knochenmark, PBL, Milz und Caecaltonsillen, nicht jedoch in Leber, Gehirn, Bursa und Thymus (siehe Abbildung 22 auf S. 95).

Nach Stimulation von Makrophagen mit TLR-Liganden und $IFN\gamma$ kommt es zu einer Abnahme der Expression von TREM-B2-mRNA (siehe Abbildung 23 auf S. 96).

Da für diesen Rezeptor auch kein Homolog beim Säuger beschrieben ist, wurden keine weiteren Untersuchungen zu seiner molekularen und funktionellen Charakterisierung durchgeführt.

6.4 Weiterführende Untersuchungen

6.4.1 Nachweis des Adaptormoleküls von TREM-A1

Um das Adaptormolekül des potentiell aktivierenden TREM-A1 genauer zu charakterisieren, soll zunächst geklärt werden, ob eines der beim Säuger assoziierten Adaptormoleküle (DAP12, FcεRIγ und CD3ζ) beim Huhn verwendet wird. FcεRIγ und CD3ζ konnten beim Huhn bereits identifiziert werden. DAP12 müsste erst noch kloniert werden. Möglicherweise würde aber auch wegen der hohen Homologien derartiger Ketten zwischen Säuger und Vogel das humane DAP12 funktionieren.

Die Analyse der Assoziation von TREM-A1 mit dem jeweiligen Adaptormolekül kann dann durch Kotransfektionsexperimente mit nachfolgender biochemischer Analyse durchgeführt werden.

Außerdem könnte durch Pervanadatbehandlung dieser Zellen die Funktionalität des aktivierenden Komplexes nachgewiesen werden, wenn phosphorylierte Tyrosinreste und die Signaltransduktionsmoleküle SYK und ZAP-70 detektiert werden können [4].

6.4.2 Etablierung eines Tests für sTREM-A1

Um zu untersuchen, ob es sich bei der Splice-Variante von TREM-A1 um ein lösliches Protein handelt, soll ein indirekter Capture-ELISA aus dem mAk und dem Kaninchenserum etabliert werden. Da die Expression der Ig-Domäne von TREM-A1 im Vergleich zum transmembranen Rezeptor vor allem in Thrombozyten erhöht ist, liegt die Vermutung nach, dass eine lösliche Variante von TREM-A1 im Serum zu detektieren sein müsste.

6.4.3 Expression einer löslichen Variante von TREM-B1

Da neben der membrangebundenen Form des TLT-1 noch eine lösliche Splice-Variante existiert, die in humanem und murinem Serum detektiert werden konnte [14], und da TLT-1 in seiner AS-Sequenz dem TREM-B1 sehr ähnlich ist, liegt der Verdacht nahe, dass es auch von diesem Rezeptor eine lösliche Form gibt.

Da in der qPCR Primer verwendet wurden, die für die Ig-Domäne von TREM-B1 spezifisch sind, könnte es sein, dass, ähnlich der Situation bei TREM-A1, die Expression der Ig-Domäne höher ist, als die des membranständigen Rezeptors. Eine solche Splice-Variante könnte dann ebenfalls von Thrombozyten gebildet werden. Da aber für diesen kein Primerpaar etabliert

werden konnte, das spezifisch für den Bereich zwischen der membran-proximalen Ig-Domäne und der transmembranen Region ist, war diese Fragestellung nicht mit Hilfe der qPCR zu klären.

Mit Hilfe eines mAk gegen TREM-B1 könnte die Expression von membranständigem TREM-B1 in der Durchflusszytometrie und mittels Immunfluoreszenzfärbungen analysiert werden. Dadurch könnten Rückschlüsse gezogen werden, ob es neben der membranständigen Form noch eine lösliche Variante von TREM-B1 gibt.

6.4.4 Identifizierung des Liganden von TREM-A1

Das lösliche, pentamere COMP-FLAG-Konstrukt von TREM-A1, könnte für die Identifizierung des Liganden von großem Nutzen sein. Durch die Bindung des Kaninchenserums im ELISA konnte gezeigt werden, dass TREM-A1-COMP-FLAG dem physiologisch vorkommenden extrazytoplasmatischen Bereich des Rezeptors entspricht.

Da die Bindung zwischen dem löslichen Rezeptor und seinem Liganden auf den stimulierten Milzleukozyten durch Durchflusszytometrie nachgewiesen werden, könnte man versuchen den Liganden durch Präzipitation mit dem löslichen Rezeptor aus dem Zelllysate aufzureinigen und das Protein genauer zu analysieren.

Daneben soll der Ligand durch Screenen einer aus mit ConA stimulierten Milzleukozyten hergestellten cDNA-Bibliothek in der Durchflusszytometrie genau identifiziert werden. Dazu sollen verschiedene Plasmide gepoolt transient in 293T-Zellen transfiziert werden und diese dann durch Färbung mit dem TREM-A1-COMP-FLAG auf die Expression eines Liganden hin untersucht werden. Erhält man ein positives Signal, kann man den Pool solange verkleinern, bis das Plasmid, das die genetische Information für den Liganden trägt, identifiziert ist.

7 Zusammenfassung

Einige auf myeloiden und lymphoiden Zellen bei Mensch und Maus identifizierte Rezeptorfamilien weisen sowohl aktivierende als auch inhibitorische Rezeptoren auf, die wichtige Funktionen bei der Regulation des Immunsystems haben. Die *Triggering Receptors Expressed on Myeloid Cells* (TREM) stellen eine dieser immunregulatorischen Rezeptorfamilien dar und wurden beim Säuger bereits genauer untersucht. In der vorliegenden Doktorarbeit wurden die Mitglieder der TREMs beim Huhn eingehend charakterisiert.

Der potentiell aktivierende TREM-A1 besaß eine extrazytoplasmatische Ig-Domäne und einen kurzen zytoplasmatischen Abschnitt, im transmembranen Bereich aber Lysin, als eine positiv geladene AS, die mit einem ITAM-haltigen Adaptormolekül assoziieren könnte. TREM-A1 hatte ein M_R von etwa 25 kDa. Die mRNA für das membranständige TREM-A1 wurde vor allem in Makrophagen detektiert, aber auch in Gehirn, Knochenmark, Milz, Bursa und Thymus. Auf Proteinebene konnte die Expression durch einen neu hergestellten, spezifischen monoklonalen Antikörper auf Monozyten und Makrophagen, aber auch auf etwa 50% der B-Zellen und einer Subpopulation der T-Zellen nachgewiesen werden. Die mRNA der Ig-Domäne von TREM-A1 war in Thrombozyten viel höher exprimiert als die mRNA für den membranständigen Rezeptor, was einen Hinweis auf die Existenz einer löslichen Splice-Variante von TREM-A1 in diesen Zellen liefert. Mit Hilfe von Reporterassays und löslichen Rezeptorkonstrukten konnte gezeigt werden, dass der Ligand von TREM-A1 auf stimulierten Milzleukozyten exprimiert wird, nicht jedoch auf stimulierten oder unstimulierten anderen Leukozyten. TREM-A1 wies in AS-Sequenz und Gewebeverteilung hohe Ähnlichkeit zu TREM-2 beim Säuger auf.

Der inhibitorische TREM-B1 besaß zwei Ig-Domänen und einen langen zytoplasmatischen Bereich mit zwei ITIMs. TREM-B1 hatte ein M_R von etwa 47 kDa und wurde mit Hilfe der qPCR vor allem auf Thrombozyten detektiert. Die ITIMs im zytoplasmatischen Anteil wurden nach Pervanadatbehandlung phosphoryliert und rekrutierten die Protein-Tyrosin-Phosphatasen SHP-1 und SHP-2. Der Ligand von TREM-B1 wurde auf mit PMA/Calonophor stimulierten Milzleukozyten exprimiert, nicht jedoch auf mit ConA stimulierten Milzleukozyten oder auf stimulierten bzw. unstimulierten Leukozyten anderer Organe.

TREM-B1 wies in AS-Sequenz und Gewebeverteilung hohe Ähnlichkeit zu TLT-1 beim Säuger auf.

Vom inhibitorischen TREM-B2 existierten drei Varianten, die aber alle einen langen zytoplasmatischen Bereich mit zwei ITIMs besitzen. TREM-B2v1 besaß zwei extrazytoplasmatische Ig-Domänen, TREM-B2v2 nur eine, wobei die membran-proximale Ig-Domäne von TREM-B2v1 fehlte. TREM-B2v3 hatte die beiden Ig-Domänen von TREM-B2v1 doppelt. Die mRNA aller drei Varianten wurde vor allem in PBMC und Makrophagen exprimiert, etwas weniger hoch in Knochenmark, PBL, Milz und Caecaltonsillen.

8 Summary

Title: The immunoregulatory triggering receptors expressed on myeloid cells (TREM) in chicken.

Some receptor families identified on myeloid and lymphoid cells in man and mouse have both inhibitory and activating receptors with important functions in the regulation of the immune system. The TREMs display one of these receptor families and were already analyzed in mammals. In the present thesis the members of the triggering receptors expressed on myeloid cells (TREMs) in chicken were closely characterized.

The potential activating TREM-A1 had one extracytoplasmic Ig-domain and a short cytoplasmic tail, but a positively charged amino acid in the transmembrane region, which could associate to an ITAM-containing adaptor molecule. TREM-A1 had a relative molecular weight of about 25 kDa. The mRNA of the transmembrane TREM-A1 was mainly detected in macrophages, but also in brain, bone marrow, spleen, bursa and thymus. On protein-level the expression could be demonstrated on monocytes and macrophages by a newly produced specific monoclonal antibody, but also on about 50 % of B-cells and a subpopulation of T-cells. On thrombocytes the mRNA of the Ig-domain of TREM-A1 was expressed much higher than the mRNA of the transmembrane receptor, indicating the existence of a soluble splice variant of TREM-A1 in these cells. By reporter gene assays and soluble receptor constructs could be shown, that the ligand of TREM-A1 was expressed by stimulated leukocytes from the spleen, but not by other stimulated and not stimulated leukocytes. TREM-A1 showed high similarities to TREM-2 in mammals in its amino acid sequence and gene expression pattern.

The inhibitory TREM-B1 had two Ig-domains and a long cytoplasmic tail with two ITIMs. TREM-B1 had a relative molecular weight of about 47 kDa and was mainly detected in thrombocytes by qPCR. Upon pervanadate treatment the ITIMs in the cytoplasmic tail were phosphorylated and recruited the protein-tyrosine-phosphatases SHP-1 and SHP-2. The ligand of TREM-B1 was expressed on leukocytes from the spleen, stimulated with PMA/CaInonophore, but whether on leukocytes of the spleen stimulated with ConA nor on stimulated resp. not stimulated leukocytes from other organs. TREM-B1 showed high similarities to TLT-1 in mammals in its amino acid sequence and gene expression pattern.

There were three variants of the inhibitory TREM-B2, all holding a long cytoplasmic tail with two ITIMs. TREM-B2v1 had two extracytoplasmic Ig-domains, TREM-B2v2 only one,

which however failed the membrane-proximal Ig-domain from TREM-B2v1. TREM-B2v3 had both Ig-domains from TREM-B2v1 twice. The mRNA of all the variants was mainly expressed by PBMC and macrophages, less in bone marrow, PBL, spleen and caecal tonsils.

9 Literaturverzeichnis

1. Viertlboeck, B.C., R. Schmitt, and T.W. Göbel, *The chicken immunoregulatory receptor families SIRP, TREM, and CMRF35/CD300L*. Immunogenetics, 2006. **58**(2-3): p. 180-190.
2. Williams, A.F. and A.N. Barclay, *The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition*. Annu Rev Immunol, 1988. **6**: p. 381-405.
3. Ravetch, J.V. and L.L. Lanier, *Immune inhibitory receptors*. Science, 2000. **290**(5489): p. 84-89.
4. Campbell, K.S. and M. Colonna, *Human natural killer cell receptors and signal transduction*. Int Rev Immunol, 2001. **20**(3-4): p. 333-370.
5. Gergely, J., I. Pecht, and G. Sarmay, *Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif-bearing receptors regulate the immunoreceptor tyrosine-based activation motif-induced activation of immune competent cells*. Immunol Lett, 1999. **68**(1): p. 3-15.
6. Lanier, L.L., *NK cell recognition*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 225-274.
7. Bouchon, A., J. Dietrich, and M. Colonna, *Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes*. J Immunol, 2000. **164**(10): p. 4991-4995.
8. Daws, M.R., et al., *Cloning and characterization of a novel mouse myeloid DAP12-associated receptor family*. Eur J Immunol, 2001. **31**(3): p. 783-791.
9. Bouchon, A., et al., *TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock*. Nature, 2001. **410**(6832): p. 1103-1107.
10. Chung, D.H., W.E. Seaman, and M.R. Daws, *Characterization of TREM-3, an activating receptor on mouse macrophages: definition of a family of single Ig domain receptors on mouse chromosome 17*. Eur J Immunol, 2002. **32**(1): p. 59-66.
11. Washington, A.V., L. Quigley, and D.W. McVicar, *Initial characterization of TREM-like transcript (TLT)-1: a putative inhibitory receptor within the TREM cluster*. Blood, 2002. **100**(10): p. 3822-3824.
12. King, R.G., B.R. Herrin, and L.B. Justement, *Trem-like transcript 2 is expressed on cells of the myeloid/granuloid and B lymphoid lineage and is up-regulated in response to inflammation*. J Immunol, 2006. **176**(10): p. 6012-6021.
13. Kelker, M.S., E.W. Debler, and I.A. Wilson, *Crystal structure of mouse triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM-1) at 1.76 Å*. J Mol Biol, 2004. **344**(5): p. 1175-1181.

14. Gattis, J.L., et al., *The structure of the extracellular domain of triggering receptor expressed on myeloid cells like transcript-1 and evidence for a naturally occurring soluble fragment*. J Biol Chem, 2006. **281**(19): p. 13396-403.
15. Radaev, S., et al., *Crystal structure of the human myeloid cell activating receptor TREM-1*. Structure, 2003. **11**(12): p. 1527-1535.
16. Allcock, R.J., et al., *The human TREM gene cluster at 6p21.1 encodes both activating and inhibitory single IgV domain receptors and includes NKp44*. Eur J Immunol, 2003. **33**(2): p. 567-577.
17. Gibot, S., et al., *Surface and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1: expression patterns in murine sepsis*. Crit Care Med, 2005. **33**(8): p. 1787-1793.
18. Begum, N.A., et al., *Mycobacterium bovis BCG cell wall-specific differentially expressed genes identified by differential display and cDNA subtraction in human macrophages*. Infect Immun, 2004. **72**(2): p. 937-948.
19. Plachouras, D., et al., *Monocytes as a site of production of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (sTREM-1) in the septic host*. Scand J Infect Dis, 2006. **38**(10): p. 909-915.
20. Gibot, S., et al., *A soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 modulates the inflammatory response in murine sepsis*. J Exp Med, 2004. **200**(11): p. 1419-1426.
21. Mahdy, A.M., et al., *Production of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells by lipopolysaccharide-stimulated human neutrophils involves de novo protein synthesis*. Clin Vaccine Immunol, 2006. **13**(4): p. 492-495.
22. Gómez-Pina, V., et al., *Metalloproteinases shed TREM-1 ectodomain from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes*. J Immunol, 2007. **179**(6): p. 4065-4073.
23. Bleharski, J.R., et al., *A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response*. J Immunol, 2003. **170**(7): p. 3812-3818.
24. Radsak, M.P., et al., *Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in neutrophil inflammatory responses: differential regulation of activation and survival*. J Immunol, 2004. **172**(8): p. 4956-4963.
25. Gibot, S., et al., *Surface triggering receptor expressed on myeloid cells 1 expression patterns in septic shock*. Intensive Care Med, 2005. **31**(4): p. 594-597.
26. Gibot, S., et al., *Plasma level of a triggering receptor expressed on myeloid cells-1: its diagnostic accuracy in patients with suspected sepsis*. Ann Intern Med, 2004. **141**(1): p. 9-15.
27. Giamarellos-Bourboulis, E.J., et al., *Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 1 as an anti-inflammatory mediator in sepsis*. Intensive Care Med, 2006. **32**(2): p. 237-243.

28. Gibot, S. and F. Massin, *Soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells 1: an anti-inflammatory mediator?* Intensive Care Med, 2006. **32**(2): p. 185-187.
29. Gibot, S., et al., *Time-course of sTREM (soluble triggering receptor expressed on myeloid cells)-1, procalcitonin, and C-reactive protein plasma concentrations during sepsis.* Crit Care Med, 2005. **33**(4): p. 792-796.
30. Determann, R.M., et al., *Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 1: a biomarker for bacterial meningitis.* Intensive Care Med, 2006. **32**(8): p. 1243-1247.
31. Wang, D.Y., et al., *Expression of TREM-1 mRNA in acute pancreatitis.* World J Gastroenterol, 2004. **10**(18): p. 2744-2746.
32. Richeldi, L., et al., *Triggering receptor expressed on myeloid cells: role in the diagnosis of lung infections.* Eur Respir J, 2004. **24**(2): p. 247-250.
33. Determann, R.M., et al., *Serial changes in soluble triggering receptor expressed on myeloid cells in the lung during development of ventilator-associated pneumonia.* Intensive Care Med, 2005. **31**(11): p. 1495-1500.
34. Gibot, S., et al., *Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells and the diagnosis of pneumonia.* N Engl J Med, 2004. **350**(5): p. 451-458.
35. Routsis, C., et al., *Does soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 play any role in the pathogenesis of septic shock?* Clin Exp Immunol, 2005. **142**(1): p. 62-67.
36. Torres, A. and S. Ewig, *Diagnosing ventilator-associated pneumonia.* N Engl J Med, 2004. **350**(5): p. 433-435.
37. Gibot, S., *Clinical review: role of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 during sepsis.* Crit Care, 2005. **9**(5): p. 485-489.
38. Haselmayer, P., et al., *TREM-1 ligand expression on platelets enhances neutrophil activation.* Blood, 2007. **110**(3): p. 1029-1035.
39. Ramanathan, B., et al., *Cloning of porcine triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) and its induction by lipopolysaccharide, peptidoglycan, and Salmonella enterica serovar Typhimurium infection.* Dev Comp Immunol, 2005. **29**(1): p. 1-7.
40. Ramanathan, B., et al., *Characterization of bovine cDNA encoding triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM-1).* Vet Immunol Immunopathol, 2004. **102**(1-2): p. 85-89.
41. Schmid, C.D., et al., *Heterogeneous expression of the triggering receptor expressed on myeloid cells-2 on adult murine microglia.* J Neurochem, 2002. **83**(6): p. 1309-1320.
42. Carson, M.J., J.C. Thrash, and D. Lo, *Analysis of microglial gene expression: identifying targets for CNS neurodegenerative and autoimmune disease.* Am J Pharmacogenomics, 2004. **4**(5): p. 321-330.

43. Cella, M., et al., *Impaired differentiation of osteoclasts in TREM-2-deficient individuals*. J Exp Med, 2003. **198**(4): p. 645-651.
44. Sessa, G., et al., *Distribution and signaling of TREM2/DAP12, the receptor system mutated in human polycystic lipomembraneous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy dementia*. Eur J Neurosci, 2004. **20**(10): p. 2617-2628.
45. Kaifu, T., et al., *Osteopetrosis and thalamic hypomyelinosi with synaptic degeneration in DAP12-deficient mice*. J Clin Invest, 2003. **111**(3): p. 323-332.
46. Kiiialainen, A., et al., *Dap12 and Trem2, molecules involved in innate immunity and neurodegeneration, are co-expressed in the CNS*. Neurobiol Dis, 2005. **18**(2): p. 314-322.
47. Turnbull, I.R., et al., *Cutting edge: TREM-2 attenuates macrophage activation*. J Immunol, 2006. **177**(6): p. 3520-3524.
48. Bouchon, A., et al., *A DAP12-mediated pathway regulates expression of CC chemokine receptor 7 and maturation of human dendritic cells*. J Exp Med, 2001. **194**(8): p. 1111-1122.
49. Prada, I., et al., *Triggering receptor expressed in myeloid cells 2 (TREM2) trafficking in microglial cells: continuous shuttling to and from the plasma membrane regulated by cell stimulation*. Neuroscience, 2006. **140**(4): p. 1139-1148.
50. Takahashi, K., C.D. Rochford, and H. Neumann, *Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2*. J Exp Med, 2005. **201**(4): p. 647-657.
51. Hamerman, J.A., et al., *Cutting edge: inhibition of TLR and FcR responses in macrophages by triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-2 and DAP12*. J Immunol, 2006. **177**(4): p. 2051-2055.
52. Hamerman, J.A. and L.L. Lanier, *Inhibition of immune responses by ITAM-bearing receptors*. Sci STKE, 2006. **2006**(320): p. re1.
53. Turnbull, I.R. and M. Colonna, *Activating and inhibitory functions of DAP12*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(2): p. 155-161.
54. Pasquier, B., et al., *Identification of Fc α RI as an inhibitory receptor that controls inflammation: dual role of FcR γ ITAM*. Immunity, 2005. **22**(1): p. 31-42.
55. Hakola, H.P., *Neuropsychiatric and genetic aspects of a new hereditary disease characterized by progressive dementia and lipomembraneous polycystic osteodysplasia*. Acta Psychiatr Scand Suppl, 1972. **232**: p. 1-173.
56. Nasu, T., Y. Tsukahara, and K. Terayama, *A lipid metabolic disease-"membranous lipodystrophy"-an autopsy case demonstrating numerous peculiar membrane-structures composed of compound lipid in bone and bone marrow and various adipose tissues*. Acta Pathol Jpn, 1973. **23**(3): p. 539-558.

57. Hakola, H.P. and M. Puranen, *Neuropsychiatric and brain CT findings in polycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy*. Acta Neurol Scand, 1993. **88**(5): p. 370-375.
58. Paloneva, J., et al., *CNS manifestations of Nasu-Hakola disease: a frontal dementia with bone cysts*. Neurology, 2001. **56**(11): p. 1552-1558.
59. Bianchin, M.M., et al., *Nasu-Hakola disease (polycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy--PLOS): a dementia associated with bone cystic lesions. From clinical to genetic and molecular aspects*. Cell Mol Neurobiol, 2004. **24**(1): p. 1-24.
60. Neumann, H. and K. Takahashi, *Essential role of the microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2 (TREM2) for central nervous tissue immune homeostasis*. J Neuroimmunol, 2007. **184**(1-2): p. 92-99.
61. Paloneva, J., et al., *DAP12/TREM2 deficiency results in impaired osteoclast differentiation and osteoporotic features*. J Exp Med, 2003. **198**(4): p. 669-675.
62. Paloneva, J., et al., *Loss-of-function mutations in TYROBP (DAP12) result in a presenile dementia with bone cysts*. Nat Genet, 2000. **25**(3): p. 357-361.
63. Paloneva, J., et al., *Mutations in two genes encoding different subunits of a receptor signaling complex result in an identical disease phenotype*. Am J Hum Genet, 2002. **71**(3): p. 656-662.
64. Soragna, D., et al., *An Italian family affected by Nasu-Hakola disease with a novel genetic mutation in the TREM2 gene*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2003. **74**(6): p. 825-826.
65. Fenoglio, C., et al., *Absence of TREM2 polymorphisms in patients with Alzheimer's disease and Frontotemporal Lobar Degeneration*. Neurosci Lett, 2007. **411**(2): p. 133-137.
66. Daws, M.R., et al., *Pattern recognition by TREM-2: binding of anionic ligands*. J Immunol, 2003. **171**(2): p. 594-599.
67. Washington, A.V., et al., *A TREM family member, TLT-1, is found exclusively in the alpha-granules of megakaryocytes and platelets*. Blood, 2004. **104**(4): p. 1042-1047.
68. Barrow, A.D., et al., *Cutting edge: TREM-like transcript-1, a platelet immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif encoding costimulatory immunoreceptor that enhances, rather than inhibits, calcium signaling via SHP-2*. J Immunol, 2004. **172**(10): p. 5838-5842.
69. van der Holst, R., *TRAPC - a novel Triggering Receptor expressed on Antigen Presenting Cells*. Dissertation, Stockholm, 2007.
70. DuBridges, R.B., et al., *Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system*. Mol Cell Biol, 1987. **7**(1): p. 379-387.

71. Karttunen, J. and N. Shastri, *Measurement of ligand-induced activation in single viable T cells using the lacZ reporter gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(9): p. 3972-3976.
72. Shulman, M., C.D. Wilde, and G. Kohler, *A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies*. Nature, 1978. **276**(5685): p. 269-270.
73. Beug, H., et al., *Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation*. Cell, 1979. **18**(2): p. 375-390.
74. Bading, H., C. Beutler, and K. Moelling, *Mapping of a small phosphopeptide at the carboxyterminus of the viral myb protein by monoclonal antibodies*. Oncogene, 1989. **4**(1): p. 33-38.
75. Abujoub, A. and P.M. Coussens, *Development of a sustainable chick cell line infected with Marek's disease virus*. Virology, 1995. **214**(2): p. 541-549.
76. Puehler, F., et al., *A sensitive bioassay for chicken interleukin-18 based on the inducible release of preformed interferon-gamma*. J Immunol Methods, 2003. **274**(1-2): p. 229-232.
77. Nazerian, K., *An updated listing of avian cell lines and transplantable tumours*. Avian Pathol, 1991. **16**: p. 527-544.
78. Baba, T.W., B.P. Giroir, and E.H. Humphries, *Cell lines derived from avian lymphomas exhibit two distinct phenotypes*. Virology, 1985. **144**(1): p. 139-151.
79. Schat, K.A., et al., *Transformation of T-lymphocyte subsets by Marek's disease herpesvirus*. J Virol, 1991. **65**(3): p. 1408-1413.
80. Beug, H., et al., *Erythroblast cell lines transformed by a temperature-sensitive mutant of avian erythroblastosis virus: a model system to study erythroid differentiation in vitro*. J Cell Physiol Suppl, 1982. **1**: p. 195-207.
81. Kawaguchi, T., et al., *Establishment and characterization of a chicken hepatocellular carcinoma cell line, LMH*. Cancer Res, 1987. **47**(16): p. 4460-4464.
82. Lahti, J.M., et al., *Two distinct alpha beta T-cell lineages can be distinguished by the differential usage of T-cell receptor V beta gene segments*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(23): p. 10956-10960.
83. Benting, J., et al., *Protein expression in Drosophila Schneider cells*. Anal Biochem, 2000. **278**(1): p. 59-68.
84. Lefkovits, I., *Immunology Methods Manual 1*. 1997.
85. Holler, N., et al., *Development of improved soluble inhibitors of FasL and CD40L based on oligomerized receptors*. J Immunol Methods, 2000. **237**(1-2): p. 159-173.
86. Mast, J., et al., *Characterisation of chicken monocytes, macrophages and interdigitating cells by the monoclonal antibody KUL01*. Vet Immunol Immunopathol, 1998. **61**(2-4): p. 343-357.

87. Viertlboeck, B.C., et al., *Chicken Ig-like receptor B2, a member of a multigene family, is mainly expressed on B lymphocytes, recruits both Src homology 2 domain containing protein tyrosine phosphatase (SHP)-1 and SHP-2, and inhibits proliferation.* J Immunol, 2004. **173**(12): p. 7385-7393.
88. Yusa, S. and K.S. Campbell, *Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase-2 (SHP-2) can play a direct role in the inhibitory function of killer cell Ig-like receptors in human NK cells.* J Immunol, 2003. **170**(9): p. 4539-4547.

Anhang I: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

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

- 1 Agilent Technologies, Waldbronn
- 2 Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
- 3 AppliChem, Darmstadt
- 4 Applied Biosystems, Darmstadt
- 5 Biochrom, Berlin
- 6 Biontex, München
- 7 Bio-Rad, München
- 8 Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
- 9 Fujifilm Europe, Düsseldorf
- 10 Invitrogen-Gibco, Karlsruhe
- 11 Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Suffolk, UK
- 12 Machery-Nagel, Düren
- 13 MBI Fermentas, St. Leon-Rot
- 14 Merck, Darmstadt
- 15 Millipore, Schwalbach
- 16 MWG, Ebersberg
- 17 New England Biolabs, Frankfurt am Main
- 18 Peqlab Biotechnologie, Erlangen
- 19 Qiagen, Hilden
- 20 Ratiopharm, Ulm
- 21 Roche Diagnostics, Mannheim
- 22 Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA
- 23 Sartorius AG, Göttingen
- 24 Serva, Heidelberg
- 25 Sigma, Deisenhofen
- 26 Solis Biodyne, Tartu, Estland
- 27 Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, USA
- 28 Stratagene, Amsterdam, Niederlande
- 29 Upstate, Lake Placid, NY, USA
- 30 Uptima, Montluçon cedex, Frankreich

Anhang II: Geräte in alphabetischer Reihenfolge

Gerät	Bezeichnung	Herstellerfirma
Affinitätschromatograph	GradiFrac™ System mit PeristalticPump P-1, Moitor UV-1 und Recorder REC 102	Pharmacia Biotech, Freiburg
Bioanalyzer	2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Waldbronn
Brutschrank	CO2-Auto-Zero	Heraeus Instruments, München
Durchflusszytometer	FACScan <i>Software:</i> CellQuest	Becton Dickinson, Heidelberg
Elektroblotter	Multiphor II Biochrom 2103 Power Supply	LKB Pharmacia
ELISA-Handwasher	Immuno Wash 12	Nunc, Wiesbaden
Gel Dokumentation	Gel Doc 2000 <i>Software:</i> Quantity One 4.1.1	Bio-Rad, München
Elektroporator	Gene Pulser II	Bio-Rad, München
Mikroskop	Diavert	Leitz, Wetzlar
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Köln
Photometer	Biophotometer	Eppendorf, Köln
Photometer Küvette	Spectrophotometer Quartz- Küvette	Sigma, Deisenhofen
Platten-Photometer	Sunrise Remote	Tecan, Crailsheim
Power-Supply	Power Pac 300	Bio-Rad, München
qPCR-Thermocycler	7300 Real Time PCR System <i>Software:</i> 7300 System Sequence Detection Software 1.3.1.	Applied Biosystems, Darmstadt
Rührzelle	Amicon Rührzelle 8400	Millipore, Schwalbach
SDS-Gel-Gießkammer	BioRad mini Protean II	Bio-Rad, München
Sterile Werkbank	Microflow	Nunc, Wiesbaden
Thermocycler	Biometra, TRIO Heated Lid	Biotron, Göttingen
Zählkammer	Modifizierte Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim
Zentrifuge	Sigma 4K15C	Sigma, Deisenhofen

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. T. Göbel für die Überlassung des Themas und seine hervorragende fachliche Betreuung.

Herrn Prof. Dr. M. Stangassinger danke ich für den am Institut zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Bei Frau Dr. B. Viertböck bedanke ich mich für die ausgezeichnete Einarbeitung in die verschiedenen Methoden, die herausragende fachliche Betreuung und die stete Bereitschaft zur kritischen Diskussion, die für mich von unschätzbarem Wert waren.

Herrn Prof. Dr. B. Kaspers und Frau Dr. S. Kothlow danke ich für konstruktive Beiträge, Frau Dr. S. Schwarz für die Einarbeitung in die Kunst der RNA-Isolierung und qPCR.

Es ist mir ein aufrichtiges Bedürfnis, mich ganz besonders bei meinen Kolleginnen im Labor, Ramona Schmitt und Claudia Gick, zu bedanken, die wirklich immer da waren, wenn ich sie brauchte, für alles ein offenes Ohr hatten und ohne die der Laboralltag nur halb so lustig gewesen wäre.

Mein Dank gilt ebenso Bärbel Amann, Beatrice Schaerer und Ingrid Riehl sowie meinen Mitstreitern Ferdinand Schmitt, Katharina Weibhauser-Schenk und Hanna Zipplies für das freundliche Arbeitsklima im Labor und das geduldige Ertragen mancher frecher Kommentare.

Fritz Meggendorfer, Hedi Opitz und Thomas Hoschka danke ich für die Betreuung der Tiere und für die mir entgegengebrachte Geduld.

Meinen Eltern und meinen Geschwistern möchte ich an dieser Stelle ganz herzlich für ihre stete Unterstützung und Toleranz danken.