

**Hemmung des
GM2-Gangliosid Metabolismus in,
aus humanen Monozyten generierten,
Dendritischen Zellen**

**Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn**

vorgelegt von

**Sarah Meisel
aus
Leverkusen**

Bonn, März 2015

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Univ. Prof. Dr. med. Peter Brossart
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Sven Burgdorf

Tag der Promotion: 22.06.15
Erscheinungsjahr: 2015

Danksagung

Ich danke Frau Dr. Bernadette Breiden aus der Abteilung Membrane Biology & Lipid Biochemistry von Prof. Dr. K. Sandhoff des Life & Medical Sciences Institutes (LIMES) im Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn für die Durchführung der Lipidanalyse und die freundliche Zusammenarbeit während dieser Kooperation.

Zusammenfassung

Seitdem man Ende der 80er Jahre mit der Verwendung von dendritischen Zellen in der immuntherapeutischen Behandlung von Krebs begann, wurden in klinischen Studien bereits einige Fortschritte, die zu einer verbesserten Prognose von Patienten beitrugen, erzielt. Jedoch sind DC-basierte Antitumorvakzinierungen bislang nur Chemotherapiebegleitend einsetzbar, da den induzierten Immunantworten eine ausreichende Aggressivität zur Auslöschung jeglicher Tumorzelle fehlt. Durch ihre Zelltyp-spezifische und Differenzierungsgrad-abhängige endogene Expression auf eukaryotischen Zellen und durch ihre extrinsische immunsupprimierende Wirkungsweise, wenn sie in charakteristischen Sekretionsprofilen von Tumorzellen abgegeben werden, wurde gezeigt, dass Ganglioside wichtige Modulatoren von Immunantworten sind.

Durch die Beobachtung, dass eine GM2- bzw. GM2A-Expression in Monozyten fehlt, aber kontinuierlich während der Differenzierung zu unreifen $mDCs$ steigt um dann in LPS-gereiften $mDCs$ wieder verringert zu sein, lässt sich schlussfolgern, dass dieses Gangliosid eine essentielle Rolle hinsichtlich Überleben und Funktion in DCs haben könnte.

In Anlehnung an die durch GM2-Akkumulation charakterisierten neurodegenerativen und letztendlich fatalen GM2-Gangliosidosen, Tay-Sachs (HexA), Sandhoff (HexA/HexB) und AB Variant (GM2A), wurden während dieser Arbeit beide am GM2-Metabolismus beteiligten Komponenten herunterreguliert; zum einen durch Anwendung von PUGNAc – ein chemischer Inhibitor der HexA – und zum anderen durch Elektrotransfektion mit einer GM2A-spezifischen siRNA.

Während sich für die Hemmung des GM2-Aktivatorproteins keine phänotypischen und funktionellen Veränderungen nachweisen ließen – was wahrscheinlich auf einer verbliebenen Restaktivität durch eine nicht vollständige Hemmung des GM2A basiert –, konnten für die PUGNAc-bedingte Hemmung der HexA sowohl morphologische als auch funktionelle Beeinträchtigungen, deren Vehemenz in Korrelation zur angewandten Inhibitorkonzentration stand, nachgewiesen werden. Je höher die angewandte Inhibitorkonzentration war, desto drastischer war das Ausmaß der Beeinträchtigungen.

Es konnte ein PUGNAc-bedingter Verlust der Phagozytoseaktivität unreifer $mDCs$, eine reduzierte Migrationsfähigkeit und allostimulatorische Kapazität in LPS-gereiften $mDCs$ einhergehend mit einer Herunterregulierung der Expression bestimmter CD-Moleküle und einer stark verminderte Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine nachgewiesen werden.

Aufgrund des funktionellen Einflusses und der deutlich gewordenen regulatorischen Importanz hinsichtlich der Immunogenität von $mDCs$ stellt das GM2-Gangliosid und die, zu seinem Metabolismus unabdingbaren Komponenten, potente Faktoren zur Modifikation und Optimierung der DC-Immunogenität zu Zwecken der Tumorvakzinierung dar.

Abstract

Since the late 80's when usage of dendritic cells in immunotherapeutic treatment of cancer began, some progress within clinical trials could be achieved, contributing to improved prognosis of patients.

However, DC-based anti-tumor vaccinations are so far only chemotherapy concomitantly used, since the induced immune responses lack sufficient aggressiveness to remove all tumor cells.

By their cell type-specific and differentiation-dependent endogenous expression on eukaryotic cells and their extrinsic immunosuppressive action, when submitted in characteristic secretion-profiles by tumor cells it could be shown that gangliosides are important modulators of immune responses.

By the observation that the expression of GM2 (and GM2A resp.) is lacking in monocytes, but increases continuously during differentiation to $mDCs$ to then again decrease in LPS-matured $mDCs$, the conclusion that there might be an essential role of this ganglioside towards DC-survival and function could be assumed.

Relating to by GM2-accumulation characterized neurodegenerative and ultimately fatal GM2-gangliosidosis, Tay-Sachs (HexA), Sandhoff (HexA / HexB) and AB Variant (GM2a), both components involved in the GM2-metabolism were down-regulated during this work; on the one hand by the application of PUGNAc - a chemical inhibitor of HexA - and on the other hand by electrotransfection with a GM2A-specific siRNA.

While no phenotypic and functional changes could be detected for the inhibition of the GM2-activator protein - which is probably based on a residual activity due to an incomplete inhibition of GM2A - for the PUGNAc-induced inhibition of HexA both morphological and functional impairments, with a vehemence correlating to the applied inhibitor concentrations, could be demonstrated. The higher the inhibitor concentration applied, the more drastic was the extent of deterioration.

A PUGNAc-induced loss of phagocytic activity of immature $mDCs$, a reduced migratory ability and allostimulatory capacity in LPS-matured $mDCs$, accompanied by a down-regulated expression of certain CD-molecules and a greatly reduced production of proinflammatory cytokines and chemokines, was demonstrated.

Due to the functional influence and the regulatory importance regarding the immunogenicity of $mDCs$ the GM2 ganglioside and the indispensable components to its metabolism, are potent factors for the modification and optimization of DC immunogenicity for tumor vaccination purposes.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Abstract	
Zusammenfassung.....	
Abbildungsverzeichnis	
Tabellenverzeichnis	
Abkürzungsverzeichnis.....	
1. Einleitung.....	1-34
1.1. Das Immunsystem – Ein Überblick.....	1-8
1.1.1. Das angeborene Immunsystem	1-3
1.1.2. Das adaptive Immunsystem.....	3-8
1.2. Dendritische Zellen.....	8-22
1.2.1. DC-„Subsets“ (Untergruppen).....	9-12
1.2.2. Lebenszyklus dendritischer Zellen.....	12-16
1.2.3. Kreuzpräsentation	16-17
1.2.4. DCs und immunologische Toleranz.....	17-18
1.2.5. DCs als Immuntherapie	19-22
1.3. Glykosphingolipide und Ganglioside	22-33
1.3.1. Das GM2-Aktivator Protein	26-29
1.3.2. Das GM2-Gangliosid und sein Abbau durch die HexA.....	29-31
1.3.3. Lysosomale Speicherkrankheiten (LSDs).....	31-33
1.4. Zielsetzung der Arbeit.....	33-34
2. Material.....	35-40
2.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien	35
2.2. Chemikalien und Lösungsmittel	36
2.3. Kit Systeme	37
2.4. Enzyme und Marker, Zytokine, Chemokine etc.	38
2.5. Antikörper für Western Blotting	38
2.6. Antikörper für die Durchflusszytomterie	38
2.7. siRNAs and Oligonukleotide (Primer)	39
2.8. Kultivierung von Monozyten-abstammenden Dendritischen Zellen.....	40
2.9. Häufig verwendete Puffer und Lösungen	40
3. Methoden	41-66
3.1. Extraktion von humanen PBMCs und Isolation von humanen Monozyten aus Vollblut durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation.....	41-42
3.2. Generation von Monozyten-abstammenden Dendritischen Zellen.....	42
3.3. Inhibition der beta Hexoaminidase A während der DC-Generation	42-43
3.4. Positive Selektion von CD14+Monozyten durch MACS.....	43-45
3.5. Lebendzellzahlbestimmung mittels Trypanblau.....	45-46
3.6. Elektrotransfektion von dendritischen Zellen mittels siRNA	46-47
3.7. Durchflusszytomterie.....	47-50
3.7.1. Fluoreszenzmarkierung.....	48
3.7.2. Durchflusszytomterische-Vitalitätsbestimmung	48-49
3.7.3. Migrationsassay	49
3.7.4. Mannose Rezeptor (MR) - vermittelter Endozytose Assay	50
3.8. Gemischte Leukozytenreaktion (MLR).....	50-51
3.9. Proteinbiochemische Methoden	51-59

Inhaltsverzeichnis

3.9.1. Denaturierende Zelllyse	51
3.9.2. Quantitative Proteinkonzentrationsbestimmung	51-52
3.9.3. Gewinnung von Zellkernextrakten	52
3.9.4. Probenvorbereitung für SDS-PAGE	53
3.9.5. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)	53-54
3.9.6. Coomassie Brilliant Blue Färbung	55
3.9.7. Western Blotting (Immunoblot)	55-57
3.9.8. Ponceau S Färbung	57
3.9.9. Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA	57-59
3.10. Lipidanalyse	59-62
3.11. Molekularbiologische Methoden	62-66
3.11.1. Isolierung von RNA	62-63
3.11.2. Generierung von cDNA (engl. Reverse Transcription; RT-PCR)	63-64
3.11.3. Polymerasekettenreaktion (engl. Polymerase chain reaction; PCR)	64-65
3.11.4. Agarose-Gelelektrophorese	65
3.11.5. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	65
3.11.6. Quantifizierung von Nukleinsäuren	65-66
3.11.7. Sequenzierung und Sequenzanalyse	66
3.12. Datenverarbeitung	66
3.12.1. Datenbankanalyse	66
3.12.2. Bildverarbeitung und Software	66
3.12.3. Statistische Auswertung	66
4. Ergebnisse	67-106
4.1. Vorarbeiten	67-74
4.1.1. Identifizierung des GM2A in dendritischen Zellen	67
4.1.2. Eine fortschreitende DC-Differenzierung geht mit einem kontinuierlichen Anstieg der GM2A Expression einher	67
4.1.3. (PUGNac-)Inhibitorverträglichkeit von dendritischen Zellen	68
4.2.1. PUGNac beeinflusst die Regulation der Proteinexpression von GM2A und HexA	68-70
4.2.2. PUGNac beeinflusst die Regulation der Proteinexpression von lysosomalen Enzymen	70-71
4.2.3. PUGNac beeinflusst die Regulierung der Aktivierung der MAP-Kinasen	71-72
4.2.4. PUGNac beeinflusst die Expression verschiedener nuklearer Proteine	73-74
4.3. Elektrotansfektion von mDCs mittels GM2A-spezifischer siRNA	74-77
4.3.1a. Nachweis der GM2A-Inhibition durch siRNA mittels RT-PCR	74-76
4.3.1b. Ergebnis der Sequenzierung	76
4.3.2. Nachweis der GM2A-Inhibition durch siRNA mittels WB	76-77
4.4. Lipidanalyse von Monozyten, unreifen und LPS-gereiften mDCs im Vergleich	77-79
4.5. Durchflusszytometrie	79-96
4.5.1. Einfluss des PUGNac Inhibitors auf die Zellgröße Dendritischer Zellen	79
4.5.2. Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmorphologie der mDCs	79-96
4.5.2.1. Einfluss von PUGNac auf das Expressionsmusters der CD-Moleküle von unreifen und LPS-gereiften mDCs	81-86
4.5.2.2. Durchflusszytometrische Untersuchung elektrotansfezierter mDCs mit GM2A-spezifischer siRNA	87-96
4.5.2.2.1. Etablierung der Elektrotansfektion	87-89
4.5.2.2.2. Einfluss der EP mit GM2A-siRNA auf das Expressionsmusters der CD-Moleküle von unreifen und LPS-gereiften mDCs	89-96
4.6. Migration	96-98
4.6.1. Inhibition der HexA durch PUGNac beeinflusst die mDC-Migration	96-97
4.6.2. Einfluss der GM2A-Inhibition durch siRNA auf das Migrationsverhalten von mDCs	97-98
4.7. Phagozytose	98-101
4.7.1. Inhibition der HexA durch PUGNac führt zu einer reduzierten Phagozytose der unreifen mDCs	99-100
4.7.2. Einfluss der GM2A-Inhibition durch siRNA auf die Phagozytose von mDCs	100-101
4.8. MLR (Mixed-Lymphocyte-Reaction)	102-103

Inhaltsverzeichnis

4.8.1. Inhibierung von HexA mindert die allostimulatorische Kapazität von mDCs	102-103
4.8.2. Einfluss der GM2A-Inhibition durch siRNA auf die allostimulatorische Kapazität von mDCs	103
4.9. Veränderungen des Zytokinsekretionsprofils von mDCs nach PUGNAc-Exposition.....	104-106
5. Diskussion	107-137
6. Ausblick.....	137-139
Literaturverzeichnis.....	I-XXI
Lebenslauf	

Abbildungsverzeichnis

- | | | |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| (1) | Die Entwicklung von B-Zellen im Knochenmark und T-Zellen im Thymus erfolgt aus einem gemeinsamen lymphoiden Vorläufer (CLP). Die Bildung von BCR und TCR erfolgt über mehrere Stufen der Selektion (Negative/Positive) sowie durch V(D)J-Rekombination der leichten und schweren Ketten. (Quelle.: Nemazee D. Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. Nat Rev Immunol. 2006 Oct;6(10):728-40. Review.) | 4 |
| (2) | Allgemeines Schema der T-Zell Entwicklung im Thymus (Quelle: Germain RN. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. Nat Rev Immunol. 2002 May;2(5):309-22. Review.) | 6 |
| (3) | Dendritische Zelle aus der Mäusemilz isoliert (Q: Steinman & Cohn, 1973) | 8 |
| (4) | Lebenszyklus dendritischer Zellen (Quelle: Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol. 2000;18:767-811. Review.) | 13 |
| (5) | Exogene Route und Endogene Route der AG-Aufnahme (Quelle: Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol. 2000;18:767-811. Review.) | 14 |
| (6) | Primen der T-Zellantwort (Quelle: Summers deLuca L, Gommerman JL. Fine-tuning of dendritic cell biology by the TNF superfamily. Nat Rev Immunol. 2012 Apr 10;12(5):339-51. doi: 10.1038/nri3193. Review.) | 16 |
| (7) | T-Zell:DC-Interaktionen: Kreuzpräsentation (Quelle: Summers deLuca L, Gommerman JL. Fine-tuning of dendritic cell biology by the TNF superfamily. Nat Rev Immunol. 2012 Apr 10;12(5):339-51. doi: 10.1038/nri3193. Review.) | 17 |
| (8) | Lysosomaler Metabolismus ausgewählter Sphingolipide durch jeweilige Enzyme und entsprechende Aktivatorproteine (blau); Eponyme individuell vererbter Erkrankungen (Lysosomale Speicherkrankheiten) sind am entsprechenden Abbauschritt vermerkt (rot) (Quelle: Kolter T, Sandhoff K. Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. Annu Rev Cell Dev Biol. 2005;21:81-103. Review.) | 25 |

Abbildungsverzeichnis & Tabellenverzeichnis

(9)	Strukturformeln von GD1a-GalNAc (oben links) und GM2 (unten links); Strukturformeln von GM1, GM2, GM3 (rechts) (Quellen: http://themedicalbiochemistrypage.org/sphingolipids.php ; http://en.wikipedia.org/wiki/Ganglioside)	27
(10)	Schematische Darstellung der GM2-Aktivator-stimulierten Hydrolyse des GM2- Gangliosides durch humane β-Hexosaminidase A (Quelle: Kolter T, Sandhoff K. Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. Annu Rev Cell Dev Biol. 2005;21:81-103.)	31
(11)	Verteilung der zellulären Blutbestandteile nach Ficoll- Dichtegradientenzentrifugation	41
(12)	Chemische Strukturformel von (Z)-Pugnac (Q:Sigma Aldrich)	42
(13)	Anwendung und Akkumulation von PUGNac-Z im Medium während der DC- Generierung	43
(14)	Schematische Darstellung der immunomagnetischen Zellseparation	44
(15)	Neubauer Zählkammer; L= 1 großes Quadrat	46
(16)	Neon® Tipp mit vergoldeter Elektrode (links); Neon® Röhrchen mit Elektrode (rechts) (Q: Invitrogen)	47
(17)	Aufbau eines vertikalen Elektrophoresesystems	53
(18)	Zusammenbau des Blotting Sandwiches im vertikalen Tank Blot System	56
(19)	Prinzip der Proteindetektion durch die kombinierte Bindung von Primär- und HRP-konjugiertem Sekundärantikörper an ein AG-Epitop bzw. an die FC-Region des Primär-AK. Außerdem dargestellt: die HRP-medierte Chemilumineszenz- Reaktion	57
(20)	Prinzip eines Sandwich-ELISAs (Q: epitomics)	58
(21)	Flussdiagramm zur Durchführung der Sandwich-ELISA	59
(22)	GM2A-Expression im Laufe der DC-Differenzierung aus Monozyten (Q: Bringmann, unveröffentlicht)	67
(23)	Proteinexpression von HexA und GM2A in unreifen und LPS-gereiften mDCs nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen PUGNac	68
(24)	Expressionsprofil des sezernierten GM2AP von unreifen und LPS- gereiften mDCs nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen PUGNac.	69
(25)	Proteinexpression von lysosomalen Enzymen in unreifen und LPS-gereiften mDCs nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen PUGNac	70
(26)	Proteinexpression der MAPK in unreifen und LPS-gereiften mDCs nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen PUGNac	72
(27)	Proteinexpression von PU.1 und verschiedenen Mitgliedern der NF-κB- und IRF- Familien in Kernextrakten von unreifen und LPS-gereiften mDCs nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen PUGNac	73
(28)	RT-PCR von GM2A-siRNA-transfzierten unreifen mDCs	75
(29)	Sequenzierungsergebnis und Sequenz-Alignments ergeben die Identifizierung des humanen GM2A	76

Abbildungsverzeichnis & Tabellenverzeichnis

(30)	Proteinexpression von $mDCs$ nach EP mit GM2A-spezifischer siRNA	77
(31)	Untersuchung des Sphingolipidmetabolismus von Monozyten, unreifen und reifen $mDCs$	78
(32)	Einfluss von PUGNAc auf die Zellgröße von $mDCs$	79
(33a.)	Dot Plots: Expressionsmuster bestimmter CD-Moleküle auf unreifen und LPS-gereiften $mDCs$ nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen PUGNAc	81-82
(33b.)	Graphische Darstellung: Expressionsmuster bestimmter CD-Moleküle auf unreifen und LPS-gereiften $mDCs$ nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen PUGNAc	83
(34)	Density Plots: Expressionsmuster bestimmter CD-Moleküle auf unreifen und LPS-gereiften $mDCs$ nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen PUGNAc	85
(35)	Graphische Darstellung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (MFI) bestimmter CD-Moleküle auf unreifen und LPS-gereiften $mDCs$ nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen PUGNAc	86
(36a.)	Bestimmung der Transfektionseffizienz und Apoptoserate elektrotransfekzierter $mDCs$.	87
(36b.)	Graphische Darstellung des prozentualen Anteils AlexaFluor ₄₈₈ -positiver $mDCs$ (a.) und der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (b.) gemessen über einen Zeitraum von 96 Stunden in 4 Messungen in Abständen von jeweils 24 Stunden (24Std, 48Std, 72Std, 96Std)	88
(37a.)	Dot Plots: Expressionsmuster bestimmter CD-Moleküle auf unreifen und LPS-gereiften $mDCs$ nach EP mit GM2A-spezifischer siRNA	90
(37b.)	Graphische Darstellung: Expressionsmuster bestimmter CD-Moleküle auf unreifen und LPS-gereiften $mDCs$ nach EP mit GM2A-spezifischer siRNA	92-93
(37c.)	Graphische Darstellung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (MFI) bestimmter CD-Moleküle auf unreifen und LPS-gereiften $mDCs$ nach EP mit GM2A-spezifischer siRNA	94-95
(38)	Einfluss von PUGNAc auf das Migrationsverhalten der $mDCs$	97
(39)	Einfluss der GM2A-siRNA-Transfektion auf das Migrationsverhalten der $mDCs$	98
(40)	(oben): Einfluss von PUGNAc auf die Phagozytoseaktivität der $mDCs$; (unten): Exemplarische Darstellung der Phagozytose in Dot Plots bei 37°C	99-100
(41)	(oben): Einfluss der GM2A-siRNA-Transfektion auf die Phagozytoseaktivität der $mDCs$; (unten): Exemplarische Darstellung der Phagozytose in Dot Plots bei 37°C	101
(42)	MLR: Einfluss von PUGNAc auf die allostimulatorische Kapazität der $mDCs$	102
(43)	MLR: Einfluss der GM2A-siRNA-Transfektion auf die allostimulatorische Kapazität der $mDCs$	103

Abbildungsverzeichnis & Tabellenverzeichnis

(44)	Zytokinexpressionsprofil von unreifen und LPS-gereiften $mDCs$ nach Zugabe von verschiedenen Konzentrationen PUGNAc	105-106
(45)	Strukturformeln von a.) PUGNAc, b.) O-GlcNAc und c.) GM2	111
(46)	Schema des alternativen Abbauweges des GM2-Gangliosides in Mäusen	115
(47)	Darstellung der genomischen GM2A-DNA und den durch alternatives Splicing resultierenden Transkriptvarianten und Proteinprodukte. (Quelle: Modifiziert Wu YY, Sonnino S, Li YT, Li SC. Characterization of an alternatively spliced GM2 activator protein, GM2A protein. An activator protein which stimulates the enzymatic hydrolysis of N-acetylneuraminic acid, but not N-acetylgalactosamine, from GM2. J Biol Chem. 1996 May 3;271(18):10611-5.)	117
(48)	Vereinfachte Darstellung des Glykosphingolipidabbaus	119
(49)	LPS-Signaling (Q: Mills KH. TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. Nat Rev Immunol. 2011 Nov 18;11(12):807-22. doi: 10.1038/nri3095. Review.)	122
(50)	MAP-Kinase-Signalwege in Säugetieren. (Quelle: Zhang YL, Dong C. MAP kinases in immune responses. Cell Mol Immunol. 2005 Feb;2(1):20-7. Review.)	125
(51)	Aktivierung von NF-κB (Q: Gerondakis S, Fulford TS, Messina NL, Grumont RJ. NF- κ B control of T cell development. Nat Immunol. 2014 Jan;15(1):15-25. Review.)	129

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Humane Leukozyten Lineage Marker	9
Tab. 2: FACS-Panel zur Verifizierung des Erfolgs der immunomagnetischen Zellseparation	45
Tab. 3: BSA-Standards zur Proteinkonzentrationsbestimmung	52
Tab. 4: Rezeptur eines SDS-Gels mit 12%igem Trenngel und 5%igem Sammelgel	54
Tab. 5: Funktion und Liganden der untersuchten CD-Marker	80
Tab. 6: Mausmodelle bekannter GM2-Gangliosidosen	115

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Degree Celsius
7-AAD	7-Aminoactinomycin
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
AcOH	Essigsäure
AG	Antigen
AK	Antikörper
AP	Alkaline Phosphatase
APC	Antigen-präsentierende Zelle (<i>engl. antigen presenting cell</i>)
APS	Ammoniumpersulfat
Aq. dest.	Destilliertes Wasser
Asn	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
B (B-Lymphozyten)	Bursaäquivalentes Organ; Knochenmark (<i>engl. Bone marrow (B) derived lymphocytes</i>)
B2-M	beta2-microglobulin
BCA	Bicinchoninsäure
BCR	B-Zellrezeptor (<i>engl. B-cell receptor</i>)
BDCA	<i>engl. Blood Dendritic Cell Antigen</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>engl. bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CCL	Chemokin (C-C Motiv) Ligand
CCR	C-C Motiv Chemokin Rezeptor
CD	Differenzierungscluster (<i>engl. cluster of differentiation</i>)
CD40L	CD40-Ligand
cDC	Klassische/konventionelle DC (<i>engl. classical/conventional DC</i>)
Cdc42	<i>engl. cell division control protein 42 homolog</i>
cdNA	Komplementäre DNA (<i>engl. complementary DNA</i>)
CDS	Kodierende DNA-Sequenz (<i>engl. coding DNA sequence</i>)
CLP	Gemeinsamer lymphoider Vorläufer (<i>engl. common lymphoid progenitor</i>)
cm	Zentimeter (<i>engl. centimetre</i>)
CO ₂	Kohlendioxid
cpm	Zählung pro Minute (<i>engl. counts per minute</i>)
CTL	zytotoxische T-Zelle (<i>engl. cytotoxic T-Lymphocyte</i>)
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DC	Dendritische Zelle (<i>engl. dendritic cell</i>)
DC-LAMP	<i>engl. dendritic cell lysosome-associated membrane glycoprotein</i>
DC-SIGN	<i>engl. dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin</i>
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl. deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DP	Doppelt positiv
DTT	1,4 Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
e.g.	Zum Beispiel (<i>exempli gratia</i> (lat.))
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest (<i>engl. enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EP	Elektroporation
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
et al.	und andere (<i>et alli</i> (lat.))
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
Ets-Familie	<i>engl. E26 transformation-specific family</i>
FACS	Durchflusszytometrie (<i>engl. fluorescence activated cell sorting</i>)
FasL	Fas-Ligand

Abkürzungsverzeichnis

FBS/FCS	Featles Kälberserum (<i>engl. fetal bovine/calf serum</i>)
FC	<i>engl. fragment crystallisable</i>
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FLT3	<i>engl. Fms-like tyrosine kinase 3</i>
FSDC	<i>engl. fetal skin dendritic cell line</i>
fwd	vorwärts (<i>engl. forward</i>)
g	<i>engl. gravity</i>
g	Gramm
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBA	Glucocerebrosidase
GILZ	<i>engl. glucocorticoid-induced leucine zipper</i>
GlcCer	Glucosylceramid
Gly	Glycine
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen koloniestimulierender Faktor (<i>engl. granulocyte/Macrophage colony-stimulating factor</i>)
GM2A/ GM2AP	GM2 Aktivator Protein
GSL	Glykosphingolipid
GTPase	Guanosintriphosphat (GTP)-Hydrolase
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HexA	β -Hexoaminidase A
HexB	β -Hexoaminidase B
HLA	<i>engl. human leukocyte antigen</i>
HMW	<i>engl. high molecular weight</i>
HRP	Merrettichperoxidase (<i>engl. Horseradish peroxidase; HRP</i>)
HSC	pluripotente hämatopoietische Stammzelle (<i>engl. pluripotent hematopoietic stem cell</i>)
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül (<i>engl. intercellular adhesion molecule</i>)
ICSBP	<i>engl. interferon consensus sequence-binding protein</i>
IDCs	interdigitierende DCs
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IgH	Immunoglobulin schwere Kette (<i>engl. heavy chain</i>)
IgL	Immunoglobulin leichte Kette (<i>engl. light chain</i>)
IL	Interleukin
IL3RA	<i>engl. IL-3 receptor alpha chain</i>
Inkl.	inklusive
IRAK	IL-1 Rezeptor-assoziierte Kinase (<i>engl. Interleukin-1 receptor-associated kinase</i>)
IRF	Interferon-regulatorischer Faktor (<i>engl. interferon-regulatory factor</i>)
ISRE	<i>engl. IFN stimulation response element</i>
JAK	Janus Kinase
JNK	<i>engl. c-Jun N-terminal kinase</i>
kb	<i>engl. kilo base pairs</i>
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo dalton
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	liter
LBP	LPS-bindendes Protein (<i>engl. LPS-binding protein</i>)
LC	Langerhanszelle (<i>engl. Langerhans cell</i>)
LDL	<i>engl. low density lipoprotein</i>
LFA	<i>engl. lymphocyte function-associated antigen-1</i>
LPG	Lipophosphoglycan
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol per liter (molar)
M-6-P	Mannose-6-Phosphat
MACS	<i>engl. magnetic activated cell sorting</i>
Mal (TIRAP)	<i>engl. myelin and lymphocyte protein (toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein)</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	MAP-Kinase-Kinase
MAPKKK	MAP-Kinase-Kinase-Kinase
mCD14	Membran-gebundenes CD14 (<i>engl. membrane bound CD14</i>)
MD-2	<i>engl. myeloid differentiation factor 2</i>
mDC	Myeloide DC
mDC	aus Monozyten generierte DCs
MEK 1/2	<i>engl. dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1/2</i>

Abkürzungsverzeichnis

MetOH	Methanol
MFI	durchschnittliche Fluoreszenzintensität (<i>engl. mean fluorescence intensity</i>)
mg	milligramm
MgCl₂	Magnesiumchlorid
MHC	Hauptgewebeverträglichkeitskomplex (<i>engl. major histocompatibility complex</i>)
MIIC	<i>engl. MHC class II compartment</i>
min	Minute/n
Mip	<i>engl. macrophage inflammatory protein</i>
ml	milliliter
MLK	Myosin-leichte-Ketten
MLR	gemischte Lymphozytenreaktion (<i>engl. mixed lymphocyte reaction</i>)
mM	Milimolar
MR	Mannoserezeptor
mRNA	Messenger-RNA
MW	Molekulargewicht (<i>engl. molecular weight</i>)
MWCO	<i>engl. molecular weight cut off</i>
MyD88	<i>engl. myeloid differentiation primary response gene (88)</i>
N-terminal	Amino-terminal
Na₂S₂O₃	Natriumthiosulfat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxyd
NAP1	<i>engl. nucleosome assembly protein 1</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NeuAc	N-Acetylneuraminsäure
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ng	nanogramm
NH₄Cl	Ammoniumchlorid
NLR	<i>engl. nucleotide-binding oligomerization domain receptors</i>
nm	Nanometer
NOD	<i>engl. nucleotide-binding oligomerization domain</i>
O-GlcNAc	O-linked N-acetylglucosamin
OD	optische Dichte
OGA	O-GlcNAcase
OGT	O-GlcNAc Transferase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (<i>engl. Pathogen-associated molecular patterns</i>)
PAP	Prostata-spezifische saure Phosphatase (<i>engl. prostatic acid phosphatase</i>)
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (<i>engl. peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>engl. phosphate buffered saline</i>)
PBST	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween20
pc	polyklonal (<i>engl. polyclonal</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>engl. polymerase chain reaction</i>)
pDC	plasmazytoide DC
PE	Phycoerythrin
pg	picogramm
PGE₂	Prostaglandin E ₂
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRR	Mustererkennungszepetor (<i>engl. pattern recognition receptor</i>)
PUGNAc	O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyrano- sylidene)amino-N-phenylcarbamate)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RANTES	<i>engl. regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
rev	rückwärts (<i>engl. reverse</i>)
RIPA	<i>engl. radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>engl. ribo nucleic acid</i>)
rpm	Runden pro Minute (<i>engl. rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s / sec.	Sekunden (<i>engl. seconds</i>)
SAP	Saposin
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase (<i>engl. stress-activated protein kinase</i>)
sCD14	lösliches CD14 (<i>engl. soluble CD14</i>)
SD	Standardabweichung (<i>engl. standard deviation</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>engl. sodium dodecyl sulfat</i>)

Abkürzungsverzeichnis

SEM	<i>engl. standard error of the mean</i>
siRNA	kleine interferierende (<i>engl. small interfering</i>) RNA
SMase	Sphingomyelinase
SOCS1	<i>engl. suppressor of cytokine signaling 1</i>
SPIO	Superparamagnetic iron oxide labeling
STAT	<i>engl. signal transducers and activators of transcription</i>
T (T-Lymphozyt)	Thymus (<i>engl. thymus-derived lymphocyte</i>)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBK1	TANK-binding kinase 1 (Serine/threonine-protein kinase TBK1)
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>engl. Tris buffered saline</i>)
TCR	T-Zellrezeptor (<i>engl. T-cell receptor</i>)
TE	Tris EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tfh	T Helfer Follikuläre DCs (Tfh),
TGF(-β)	transformierender Wachstumsfaktor (<i>engl. transforming growth factor</i>) (beta)
Th-Zelle	T-Helferzelle
Thr	Threonin
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (<i>engl. Toll like receptor</i>)
TNF	Tumornekrosefaktor (<i>engl. tumor necrosis factor</i>)
TRAF	<i>engl. TNF receptor associated factor</i>
TRAM	TRIF-related adaptor molecule / <i>translocating chain-associated membrane protein</i>
Treg	Regulatorische T-Zelle
TRIF	<i>engl. TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethane
Tween20	Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat
Tyr	Tyrosin
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
V(D)J-Rekomb.	somatische Rekombination (<i>engl. variable(V), diversifying (D) joining (J)</i>)
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (<i>engl. vascular endothelial growth factor</i>)
vol.	volume
WB	Western Blot
ZNS	zentrales Nervensystem
α	alpha
β	beta
β-MH	beta-mercaptoethanol
δ	delta
κ	kappa
λ	lambda
μCi	Curie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
γ	gamma

1. Einleitung

1.1. Das Immunsystem – Ein Überblick

Das Immunsystem ist ein hochdifferenziertes Organsystem, welches sich in zwei funktionelle Untereinheiten, dem angeborenen (innaten) und dem erworbenem (adaptiven) Immunsystem, gliedert. Die angeborene Immunantwort fungiert als erste Abwehr gegen pathogene Organismen oder neoplastisches Zellwachstum indem sie eine sofortige und lokale Reaktion erbringt. Weiterhin ist sie diejenige, welche die adaptive Immunantwort einleitet.

Demnach sind beide Zweige des Immunsystems indem sie ineinander übergreifen und sich ergänzen eng miteinander verknüpft, obwohl sie sich unabhängig voneinander entwickelt haben.

Eine zentrale Rolle in diesem System spielen die Antigen-präsentierenden-Zellen (*engl. antigen-presenting cell; APC*). Zu ihnen zählen neben Monozyten, Makrophagen und B-Zellen, die dendritischen Zellen (*engl. Dendritic cell; DC*) zu den wichtigsten und potentesten APCs. Sie bilden den Dreh- und Angelpunkt zwischen adaptiver und angeborener Immunität. ^[307]

1.1.a. Das angeborene Immunsystem

Der menschliche Organismus ist tagtäglich Fremdkörpern und Krankheitserregern ausgesetzt, jedoch nur selten kommt es tatsächlich zu einer Infektion und Krankheitsentstehung. Die meisten Erreger werden innerhalb von Minuten oder Stunden durch Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems bekämpft. Da diese nicht von der klonalen Expansion der antigen-spezifischen Lymphozyten abhängig sind, unterliegen sie keiner langen Induktionsperiode.

Im Gegensatz zur adaptiven Immunantwort ist die angeborene somit recht unspezifisch, da sie durch die Erbsubstanz lebenslang festgelegt ist. Das angeborene Immunsystem zeichnet sich durch seine unmittelbare Aktivierung nach erstem Antigenkontakt aus. Somit ist es prägend für die Frühphase der Immunantwort und verantwortlich für die Einleitung der adaptiven Immunreaktion durch Übermittlung der entsprechenden Informationen. Es inkludiert anatomische und physiologische Barrieren wie Epithelien, welche die Haut, und die Begrenzungen der tubulären Strukturen des Körpers, nämlich die Atemwege, der Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt, umfassen. Des Weiteren enthalten Körperflüssigkeiten wie Tränen und Speichel hohe Konzentrationen an Lysozym, welches eine antimikrobielle Wirkung hat. Die zellvermittelte Gegenwehr, die mit einer allgemein entzündlichen Reaktion verbunden ist, wird in erster Linie durch Makrophagen und Neutrophile gebildet.

Einleitung

Diese Phagozyten diskriminieren anhand ihrer Oberflächenrezeptoren zwischen potentiell pathogenen Antigenen und körpereigenen Strukturen. Diese Rezeptoren werden auch als Mustererkennungsrezeptoren (*engl. Pattern Recognition Receptors; PRR*) bezeichnet, da sie bestimmte Muster, welche eine Vielzahl an Pathogenen gemeinsam haben (*engl. Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs*), wiedererkennen. In der Regel sind diese Struktur motive essentiell für diese Organismen und hoch konserviert.

So verfügen Pathogene über eine typische Anordnung von Kohlenhydraten, die durch C-Typ (Kalzium-abhängige) Lektin-Rezeptoren, wie dem Mannose-Rezeptor der Makrophagen, erkannt werden und zur Phagozytose des Erregers führen.

Ein weiterer PRR ist der Scavenger Rezeptor. Hiermit werden negativ-geladene Liganden wie die Teichonsäure, welche Bestandteil der Zellwand gram-positiver Bakterien ist, erkannt. CD14-exprimierende Monozyten und Makrophagen hingegen binden Lipopolysaccharide (LPS) in der Membran gram-negativer Bakterien.

Zu den Pathogenen, die erkannt und eliminiert werden, zählen jedoch nicht nur Bakterien, sondern auch Pilze, Parasiten oder Viren, die z.B. anhand ihrer doppelsträngigen RNA identifiziert werden.

Ebenso gibt es eine Vielzahl weiterer PRRs (NOD-like Rezeptoren, Helikasen etc.), wobei die Toll-like Rezeptoren (TLRs) mitunter zu den wichtigsten zählen und sich an der Auslösung einer Entzündungsreaktion beteiligen. TLRs aktivieren den Transkriptionsfaktor $\text{Nf-}\kappa\text{B}$, welcher die Transkription verschiedener Gene induziert, inklusive derer für Zytokine, Chemokine und co-stimulatorischer Moleküle, welche u.a. eine essentielle richtungweisende Rolle der adaptiven Immunantwort haben. Eine besondere Bedeutung wird hierbei den Interferonen als Effektormolekülen zugeschrieben. Natürliche Killerzellen werden durch Interferone und Zytokine, die von Makrophagen sezerniert werden, aktiviert. Sie besitzen ein zytotoxisches Granulat, welches auf der Oberfläche der gebundenen Zielzelle freigesetzt wird. Die enthaltenen Effektorproteine penetrieren die Zellmembran und induzieren den programmierten Zelltod. NK Zellen haben eine besondere Rolle in der Abwehr von intrazellulären Pathogenen indem sie zum Beispiel virus-infizierte Zellen eliminieren. Darüber hinaus erkennen sie entartete Tumorzellen, die sie folglich beseitigen. Durch ihre Interaktion mit dendritischen Zellen bilden NK-Zellen einen weiteren bedeutsamen Link zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort und deren Modulation.

Zusätzlich zu der zellulären Immunabwehr verfügt der Mensch über das Komplementsystem.

Das Komplementsystem besteht aus Plasmaproteinen, welche direkt durch Pathogene (alternativer Weg) aktiviert werden können oder indirekt durch pathogen-gebundene Antikörper (klassischer Weg) oder über Mannose-bindendes Lektin (Lektin-Weg).

Es kommt zu einer Kaskade von Reaktionen auf der Oberfläche der Pathogene und der Generation von aktiven Komponenten mit einer Vielzahl von Effektorfunktionen.

1.1.b. Das adaptive Immunsystem

Die spezifische/adaptive Immunabwehr hat sich im Laufe der Phylogenese der Wirbeltiere aus der angeborenen Immunabwehr entwickelt.

B- und T-Lymphozyten bilden die beiden zentralen Zelltypen der adaptiven Immunabwehr.

Ein gemeinsamer lymphoider Vorläufer (*engl. Common lymphoid progenitor; CLP*) geht aus der pluripotenten Stammzelle (*engl. pluripotent hematopoietic stem cell, HSC*) im Knochenmark hervor und gibt den Ursprung für weitere Vorläuferzellstadien (pro-, pre-, etc.) der beiden Lymphozytenstämme.

Während B-Lymphozyten im Knochenmark (*Bursaäquivalentes Organ; engl. Bone marrow (B)*) weiter ausgebildet werden, begeben sich die Vorläufer der T-Zellen in den Thymus (*engl. Thymus (T)*) um zu differenzierten T-Lymphozyten auszureifen. In ihrer weiteren Entwicklung wandern B- und T-Lymphozyten in sekundäre lymphatische Organe wie Milz und Lymphknoten, in denen ihre Antigen-induzierte Differenzierung und Vermehrung stattfindet.

Die Präsentation dieser Antigene erfolgt durch spezialisierte Zellen, die folglich als Link zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort fungieren und somit ein effektives Zusammenspiel beider Systeme gewährleisten. Insbesondere dendritische Zellen spielen hierbei eine zentrale Rolle als Antigen-präsentierende Zellen indem sie phagozytierte Antigene als Peptid:MHC-Komplexe auf ihrer Oberfläche binden, zu den lymphoiden Organen migrieren und diese dort den residierenden Lymphozyten präsentieren und somit deren Aktivierung herbeiführen.

Für das Priming von T-Zellen ist dieser Vorgang der gebundenen Antigenpräsentation essentiell. Nur so können sie über ihren T-Zell Rezeptor (*engl. T-cell receptor, TCR*) die entsprechenden Proteinfragmente erkennen, sich zu Effektorzellen entwickeln und proliferieren.

B-Zellen hingegen können über ihren B-Zell Rezeptor (*engl. B-cell receptor, BCR*) ganze lösliche Proteine, Polysaccharide, Nucleinsäuren und Lipide erkennen. Kommt es zu einer Aktivierung von B-Lymphozyten entwickeln diese sich zu Plasmazellen und sezernieren Antikörper. Als solche sind sie verantwortlich für die humorale

Einleitung

Immunantwort und einzigartig gegenüber den übrigen Leukozyten. Die Bindung der Antikörper an die Pathogene unterstützt und verstärkt wiederum die Abwehrmechanismen der nativen Immunität durch Initiation der Rezeptor-vermittelten Phagozytose und durch Aktivierung von NK-Zellen und Komplementsystem. Des Weiteren zeichnen sich B-Lymphozyten dadurch aus ebenfalls als Antigen-präsentierende Zellen fungieren zu können.

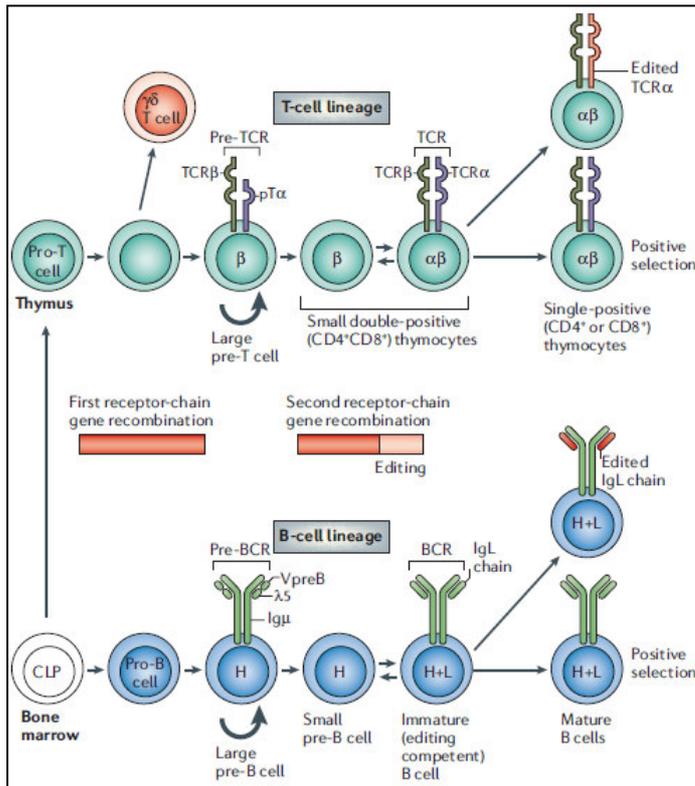


Abbildung 1:

Die Entwicklung von B-Zellen im Knochenmark und T-Zellen im Thymus erfolgt aus einem gemeinsamen lymphoiden Vorläufer (CLP). Die Bildung von BCR und TCR erfolgt über mehrere Stufen der Selektion (Negative/Positive) sowie durch V(D)J-Rekombination der leichten und schweren Ketten.

(Quelle.: Nemazee D. Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. Nat Rev Immunol. 2006 Oct;6(10):728-40. Review.)

Es besteht jedoch nur die Möglichkeit zur Aktivierung des jeweiligen Zellklons, wenn dessen Rezeptor zufällig spezifisch für das vorliegende Antigen des jeweiligen Erregers ist und an das passende Epitop binden kann. Denn obwohl die erworbene Immunität die Fähigkeit besitzt durch klonale Expansion eine große Varietät von antigenspezifischen Zellklonen hervorzubringen und somit ein hohes Maß an Anpassungsfähigkeit beweist, ist sie jedoch auch durch ihre Spezifizierung restringiert.

Durch die sogenannte somatische Hypermutation und genetischen Rekombination werden die verschiedenen Gen-Elemente (V(D)J-Rekombination) des Antigenrezeptorsegments zufällig zusammengefügt mit dem Resultat eines hochdiversen Repertoires an individuellen klonalen Antigenrezeptoren, welche aus paarweise kombinierten variablen Proteinketten (TCR: $\alpha\beta/\gamma\delta$ bzw. BCR: IgH/IgL (heavy/light chain)) bestehen. [254] Klone mit autoreaktiven Rezeptoren und solche, die nicht über die positive Selektion ihre Gen-

Einleitung

Reorganisation einstellen, unterliegen entweder der Anergie und gehen in die Apoptose (Negative Selektion) ^[167] oder können durch den Vorgang der Rezeptor Selektion/Edition erhalten bleiben indem die Rekombination der AG-Rezeptorgene wieder angeschaltet wird um die Rezeptorspezifität zu ändern. ^[377, 275] (Abb.:1)

Die Prozesse, die das Schicksal der Lymphozyten bestimmen, sind keine autarken Vorgänge, sondern werden über Interaktionen mit anderen Zellen ermöglicht und erfolgen zu verschiedenen Zeitpunkten in der Entwicklung. So findet nach erfolgreicher pre-TCR-Expression (β -Selektion) der doppelt negativen ($CD4^-/CD8^-$) Thymozyten die Umwandlung derer in doppelt positive ($CD4^+/CD8^+$) TCR-exprimierende Thymozyten statt. Die $\alpha\beta$ -TCR $^+CD4^+CD8^+$ (DP) -Thymozyten interagieren mit kortikalen Epithelzellen (und APCs) im Thymus. Die Epithelzellen (bzw. APCs) exprimieren eine hohe Dichte an MHC-I und MHC-II Molekülen, welche mit körpereigenen Peptiden beladen sind.

Der weitere Entwicklungsverlauf der Thymozyten hängt von der Signalgebung, die durch die Interaktion von TCR und Peptid:MHC-Komplex vermittelt wird, ab. Sollte das transmittierte Signal eine inadäquate Affinität nachweisen, kommt es zur negativen Selektion mit Apoptosefolge für den Thymozyten. Bei einer adäquaten Signalgebung über MHC-Klasse I Moleküle entwickeln sich DP-Thymozyten in den nächsten Schritten höchstwahrscheinlich zu $CD8^+$ T-Lymphozyten durch Verlust der $CD4$ -Expression. Bei einem MHC-Klasse II-vermittelten Signal hingegen kommt es zum $CD8$ -Expressionsverlust und die T-Zellen werden zu $CD4^+$ T-Lymphozyten. ^[254, 107] (Abb.:2)

Die Entwicklungsstadien der B-Zellen unterliegen den gleichen Kontrollen wie die der T-Zellen. Durch diese Mechanismen wird vor allem durch Erhalt der Selbsttoleranz das Entstehen von Autoimmunerkrankungen verhindert. Bei B-Zellen besteht zudem neben der somatischen Hypermutation, welche die Antigenspezifität von BCR und Antikörper gegenüber dem erkannten Antigen erhöhen soll, die Möglichkeit des Klassenwechsels des konstanten (konservierten) Teils der Antikörper, welcher die Funktion determiniert. Der Klassenwechsel ist jedoch nur bei T-Zell-abhängiger Aktivierung der B-Zelle möglich, ansonsten werden ausschließlich Antikörper der Klasse IgM produziert. Zu den wichtigsten Zellen die zur Aktivierung von B-Lymphozyten befähigt sind gehören neben $CD4^+$ Th2-Zellen auch die folliculären dendritischen Zellen.

Einleitung

nachgewiesen wurde geringfügige Mengen an IL-12 zu sezernieren und eine Th2-Zellantwort zu primen.

Dementsprechend ist beides, DC Subset und die Aktivierungssignale denen DCs ausgesetzt sind wichtig für die Polarisierung der T-Zellen. Das Heterodimer IL-12 (IL-12p70) wird als das Schlüssel-Zytokin zur Induktion einer Th1-gerichteten Immunantwort angesehen. Seine Expression wird bei DCs unter anderem durch Kontakt mit LPS oder viraler Doppelstrang-RNA induziert.

Die Th1 und Th2 Populationen lassen sich aufgrund der Sekretion typischer Zytokinmuster unterteilen. Th1-Zellen sezernieren vor allem IFN- γ , TNF- α und IL-2. Dies hemmt auf der einen Seite die Differenzierung von Th0- zu Th2-Zellen und fördert zudem die Aktivierung von NK-Zellen und CTLs. Diese Art der Immunantwort richtet sich gegen Körperzellen, die entweder entartet oder von bestimmten pathogenen Erregern, wie zum Beispiel Viren, befallen sind. Außerdem können Th1-Zellen über IFN- γ Makrophagen zur effektiven Elimination intrazellulärer Erreger, wie z.B. Mykobakterien, aktivieren. Damit stimulieren Th1-Zellen folglich die zelluläre Immunantwort. Andere Erreger, wie Helminthen, oder endogene Gefahrensignale, wie das Choleratoxin oder Prostaglandin E2, induzieren keine IL-12 Sekretion bei dendritischen Zellen und fördern dadurch die Differenzierung von Th0- in Th2-Zellen. Th2-Zellen wiederum sezernieren IL-10 und TGF- β , wodurch das Entstehen von Th1-Zellen verhindert wird. Th2-Zellen initiieren eine humorale Immunantwort, welche durch eine Erhöhung des Antikörpertiters aller Immunglobulinklassen gekennzeichnet ist.

Insbesondere bei allergischen Reaktionen spielt die Th2-gerichtete Immunantwort eine zentrale Rolle, da sie mittels IL-4 und IL-5 Sekretion einen Wechsel des Antikörperisotypen zu IgE verursachen kann und für eine gesteigerte Aktivierung von eosinophilen Granulozyten und Mastzellen verantwortlich ist.

Es existiert eine dritte Subpopulation von T-Helferzellen sind sog. regulatorischen T-Zellen (CD4+, CD25+), die sich durch die Produktion von IL-10 und TGF- β auszeichnen und antigenspezifische T-Zellen über diesen Mechanismus hemmen. Dies erzeugt Toleranz und scheint eine wichtige Rolle bei der Vermeidung von Autoimmunität zu spielen.

CD8+ Effektorzellen sind zytotoxische T-Lymphozyten (*engl. cytotoxic T lymphocytes, CTL*), die über verschiedene Mechanismen infizierte Zellen eliminieren bzw. lysieren können.

Ein Zytolyse induzierender Signalweg läuft über Fas/Fas-Ligand Interaktion mit infizierten Zellen, was zu aktivem Zelltod derselben führt. Daneben können CD8+ T-Zellen Perforin produzieren, welches Porenbildung in der Zielzelle und Import von Granzym B einleitet, worüber Caspasen aktiviert werden, was in die Apoptose der Zielzelle mündet. Neben diesen direkten Mechanismen können CD8+ T-Zellen auch inflammatorische

Einleitung

Zytokine, wie IFN- γ und TNF- α produzieren, die zur Aktivierung weiterer Effektorzellen oder zum Zelltod von infizierten Zellen führen. Auch Chemokine, welche Infektionen beeinflussen können, werden von CD8⁺ T-Zellen produziert. Ein letzter Mechanismus, den sich CD8⁺ T-Zellen zur Bekämpfung von Pathogenen zu Nutze machen, ist die Produktion von Granulysin, was in *in vitro* Kulturen als Mikrobiozid fungiert.

Die Spannweite von Effektorfunktionen trägt dazu bei, dass CD8⁺ T-Zellen in vielerlei verschiedenen Infektionen maßgeblich zur Klärung beitragen. Darunter fallen virale, bakterielle und parasitäre Infektionen, sofern sie intrazellulär vorliegen. Dabei ist je nach Pathogen eine andere Effektorfunktion oder eine Kombination von Effektorfunktionen der CD8⁺ T-Zellen ausschlaggebend für die Klärung.

Ein Teil der antigenspezifischen Lymphozyten kann sich zu Gedächtniszellen entwickeln, die bei Wiederkehren des Erregers eine beschleunigte und effektive Immunantwort initiieren können. Das immunologische Gedächtnis ist langlebig und ein wichtiger Bestandteil der erworbenen Immunität.

1.2. Dendritische Zellen

Ralph Steinman und Zanvil Cohn entdeckten die dendritische Zelle (DC) in den späten 1970ern. Bei Forschungsarbeiten an den peripheren lymphoiden Organen (Milz, Lymphknoten und Peyer's patches) der Maus fiel ihnen ein neuer Zelltyp, der sich von allen bisher beschriebenen und den Makrophagen äußerlich als auch funktionell unterschied. [361, 362] Schon Steinman und Cohn prägten den Begriff dendritische Zelle, da diese Verzweigungen (griech.: déndron = Baum) aufwies, welche äußerlich den Dendriten von Neuronen ähnelten jedoch strukturell völlig verschieden waren. 2011 wurde Ralph M. Steinman für diese Entdeckung der Nobel Preis für Physiologie und Medizin zugesprochen.



Abbildung 3:
Dendritische Zelle aus der
Mäusemilz isoliert
(Q: Steinman & Cohn, 1973)

Obwohl sie nur eine kleine Gruppe der Leukozyten repräsentieren, sind sie doch die mächtigsten und potentesten der APCs und entscheidend für die Induktion der ersten adaptiven Immunantwort, indem sie Effektor- und Gedächtnis- T- und B-Zellen aktivieren. DCs besitzen die einzigartige Fähigkeit durch Präsentation akquirierter Antigene naive T-Zellen zu aktivieren. Darüber hinaus modulieren sie die Immunantwort durch Regulation der T-Zelldifferenzierung und Polarisation der T-Zellvermittelten Immunantwort in ein Th1, Th2, Th17 oder T_{reg} – Profil. [66, 368] Eine Beteiligung an der Induktion der

immunologischen Toleranz gegenüber harmlosen (Auto-)Antigenen wird ihnen ebenfalls zugeschrieben. Durch ein hohes Niveau an co-stimulatorischen und co-inhibitorischen Molekülen steuern sie entsprechend auf eine Immunaktivierung oder Anergie zu.

1.2.1. DC-„Subsets“ (Untergruppen)

DCs sind ubiquitär verbreitet und bilden ein ausgeklügeltes Netzwerk, das ihnen erlaubt mit verschiedenen Populationen von Lymphozyten zu kommunizieren, und dabei eine Schnittstelle zwischen externer Umwelt und dem adaptiven Immunsystem herzustellen. Um diesen Schutz bereitzustellen, haben sich mehrere verschiedene Untergruppen von DCs entwickelt, die sich, trotz gemeinsamer Charakteristika, durch ihre Lokalisation, ihren Phänotyp und ihre Funktion unterscheiden. Diese Unterschiede basieren hauptsächlich auf der Expression unterschiedlicher Oberflächenmarker, welche zur Klassifizierung der DC-Untergruppen angewandt werden. So wird das DC-Netzwerk durch die stetige bzw. sequentielle Expression diverser Oberflächenrezeptoren, die an eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren gekoppelt sind, welche die Spezifizierung und Differenzierung der verschiedenen DC-Untergruppen determiniert, programmiert. [56]

DCs stammen von CD34⁺ Knochenmark Vorläuferzellen (HPC) ab und werden von anderen Zellen und Leukozyten durch das Fehlen eines entsprechenden „Lineage“-Markers (Lin-) und eine wesentlich höhere MHC-II-Expression (HLA-DR) auf der Oberfläche unterschieden. (Tab.:1)

Tabelle 1: Humane Leukozyten Lineage Marker

Zelltyp	Lineage Marker
T-Lymphozyten	CD3
Monozyten	CD14
NK Zellen, Granulozyten	CD16
B Lymphozyten	CD19
B Lymphozyten	CD20
NK Zellen	CD56

Man unterscheidet im Menschen grundsätzlich zwischen zwei Hauptuntergruppen an DCs; myeloide DCs (mDCs), welche traditionell auch als klassisch oder konventionell bezeichnet werden (cDC), und plasmazytoide DCs (pDCs).^[312] Myeloide DCs differenzieren aus myeloiden Vorläufern und exprimieren CD11c (*mDCs Lin-MHC-II⁺CD11c⁺*). Plasmazytoide DCs exprimieren hingegen die „Blood Dendritic Cell Antigens“ CD303 (BDCA-2) und CD304/Neuropilin-1 (BDCA-4) (*pDCs Lin-MHC-II⁺CD303(BDCA2)⁺CD304(BDCA4)⁺*) und CD123 (IL3RA), jedoch kein CD11c. Auch sie können sich aus myeloiden Vorläufern entwickeln, obwohl früher angenommen wurde, dass sie ausschließlich aus lymphoiden Vorläufern hervorgehen. ^[14, 213] Das Vorkommen

Einleitung

von pDCs (CD14⁻ CD11c⁺ IL-3R α ⁺) ist restringiert auf das Blut, über welches sie auch in lymphoide Organe wie Thymus, Knochenmark, Milz, Mandeln und Lymphknoten gelangen. Des Weiteren sind sie die Hauptproduzenten der Typ I Interferone (IFNs: IFN- α / β) als Antwort auf mikrobielle und vor allem virale Infektionen. [214,345] Sie sind so daran beteiligt zu verhindern, dass sich Tumore etablieren und unterstützen andere Leukozyten in der innate und adaptiven Immunantwort. [158]

Unter den pDCs können noch einmal zwei Subtypen unterschieden werden; solche mit einer hohen CD2-Expression und solche mit einer geringen CD2-Expression. Hierbei präsentieren sich die Ersteren als die effektiveren Zellen, indem sie Lysozym exprimieren, größere Mengen an IL-12p40 sezernieren und mehr CD80 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Besonders in den Mandeln und in Tumoren ist ihre Zahl hoch und sie triggern die Proliferation naiver T-Zellen. [233]

mDCs sind verbreiteter als pDCs; sie residieren in den meisten peripheren Geweben wie der Haut oder der Lamina Propria der Mukosa (interstitielle DCs), in (sekundären) lymphoiden Organen (als interdigitierende DCs in den T-Zell-Arealen) und im Blut. mDCs sind auch weitaus potenter in der Präsentation von Antigenen als pDCs. Die myeloiden DCs lassen sich in drei weitere Gruppen klassifizieren; CD1c⁺(BDCA1⁺) DCs, welche CD4⁺ T-Zellen stimulieren, IL-12 sezernieren und zur Kreuzpräsentation befähigt sind. CD141⁺(BDCA-3⁺) DCs sind besonders zur Kreuzpräsentation spezialisiert und CD16⁺ DCs haben eine starke pro-inflammatorische Funktion.

Piccoli *et al.* zeigten in einer Gegenüberstellung von CD1c⁺ und CD16⁺ DCs, dass beide Gruppen nicht auf eine Stimulation mit pro-inflammatorischen Zytokinen (TNF- α) reagierten, sondern vielmehr durch mikrobielle Stimuli zur Reifung gebracht werden konnten. Diese Erkenntnis unterstreicht ihre Rolle in der sie als zirkulierende DCs in der Früherkennung von Pathogenen involviert sind. Des Weiteren konnte die Rolle von CD16⁺ DCs als Induzenten der innate Immunität durch Untersuchung des Sekretionsprofils bestimmter Zytokine und Chemokine etabliert werden (TNF- α \uparrow). Im Gegensatz dazu beschränkt sich die Aktivität von CD1c⁺ DCs auf eine chemoattraktive Funktion (IL-8 \uparrow). [276]

Myeloide DCs wandern während ihrer Reifung von der Peripherie zu den Lymphknoten, wo sie letztendlich als interdigitierende DCs (IDCs) T-Zellen stimulieren. Obwohl IDCs eine hohe Expression von CD83, MHC-II und co-stimulatorischen Molekülen wie CD40, CD80, CD86 und CD54 aufweisen und sich somit phänotypisch von interstitiellen DCs unterscheiden, wurde bis zur Entdeckung von DC-LAMP kein IDC-spezifischer Marker charakterisiert der diese Zellen identifiziert. 1998 konnten de Saint-Vis *et al.* DC-LAMP, welches der Lysosom-assoziierten Glykoproteinfamilie zugehörig ist, in den MHCs von IDCs entdecken. Da DC-LAMP ausschließlich in IDCs vorzufinden ist, jedoch nicht in

Einleitung

unreifen CD34⁺ abstammenden DCs oder Monozyten-abstammenden DCs nachgewiesen werden konnte, gilt es seither als spezifischer Marker für diese reifen Zellen. [68]

Eine gesonderte Differenzierung der myeloiden DCs in nochmals drei Untertypen findet für interstitielle DCs im Epithelgewebe der Haut statt. [391] Neben den dermalen CD1a⁺ und CD14⁺ DCs, gibt es die in der Epidermis und dem geschichteten mukosalen Epithel residierende Langerhans-Zelle (*engl. Langerhans cell, LC*), welche 1867 von Paul Langerhans entdeckt wurde, jedoch damals von ihm fälschlicherweise für eine Nervenzelle der Haut gehalten wurden. Langerhans-Zellen unterscheiden sich von anderen DC-Untergruppen durch den Besitz so genannter Birbeck-Granula und sind durch die Expression des Proteins Langerin (CD207) in diesen Zellorganellen charakterisiert. Langerin wird eine besondere Rolle in der Abwehr einer HIV-I-Infektion zugesprochen. [69] Darüber hinaus deutet die Expression von SEMA6 auf einen aktivierten Status von LCs hin. [105]

LCs sind sehr effizient in der Kreuzpräsentation von Antigenen zu CD8⁺ T-Zellen und der Entwicklung von CTL-Antworten. Des Weiteren interagieren sie mit CD4⁺ T-Zellen und induzieren deren Differenzierung zu T-Helfer 2 (Th2) Zytokine-sezernierende (IL-4, IL-5, IL-13) Zellen. Im Gegensatz dazu, stimulieren CD14⁺ Zellen die Differenzierung der T-Zellen in folliculäre Th-DCs (Tfh), die naive B-Zellen dazu induzieren können ihren Isotypen zu wechseln und IgG- oder IgA-sezernierende Plasmazellen zu werden. Diese Fähigkeit teilen sie nicht mit den LCs. Folglich, sind humorale und zelluläre Immunantwort durch CD14⁺ DCs bzw. LCs erreichbar. CD1a⁺ DCs sind auch in der Lage CD8⁺ T-Zellen zu aktivieren, jedoch weitaus schwächer als LCs [169]

Neben den konventionellen und plasmazytoiden DCs, existieren in den Keimzentren der Lymphknoten folliculäre dendritische Zellen (fDC), die negativ für die Marker hämatopoietischer Zelllinien und von daher ontogenetisch distinkt zu allen anderen DC-Untergruppen sind. Man geht davon aus, dass sie mesenchymalem Ursprungs sind. fDCs exprimieren die lange Isoform des CR2/CD21 Rezeptors und besitzen im Gegensatz zu den interdigitierenden DCs in den lymphoiden Organen keinen MHC-Klasse-II-Komplexe. [212] Sie besitzen auch keine phagozytotischen Eigenschaften und outen sich somit als nicht-AG-prozessierende Zellen. Sie fixieren vielmehr körperfremde Antigene und stellen sie so den prozessierenden B-Zellen in den Follikeln zur weiteren Anpassung ihrer BCRs zur Verfügung.

Monozyten entwickeln sich aus myeloiden CD34⁺ Vorläufern. Unter dem Einfluss von GM-CSF und IL-4 oder TNF geben CD11c⁺ CD14⁺ Monozyten [305, 310, 439], ebenso wie Lin⁻ CD11c⁻ DCs im Blut [151] Ursprung für unreife DCs. Darüber hinaus differenzieren CD11c⁺ DCs zu

LCs in Anwesenheit von TGF- β .^[151] Wie zuvor erwähnt, besitzen auch pDCs (CD14⁻ CD11c⁻ IL-3R α ⁺) die Möglichkeit sich aus einem myeloiden CD34⁺ Vorläufer zu entwickeln.

Monozyten-abstammende CD11c⁺ DCs polarisieren hauptsächlich einen Th1-Phänotypen, wohin gegen ein CD11c⁻ DC-Subset hauptsächlich Th2-polarisierende Zytokine produziert.^[302] Tatsächlich, können CD11c⁺, aber nicht CD11c⁻ DC Subsets induziert werden IL-12 zu produzieren^[302], welches die Polarisation des induzierten T-Zell-Sekretionsmusters bestimmt.^[221]

Wie auch immer, die differentielle Regulation von NKT-Zytokinprofilen ist abhängig von verschiedenen DC-Subsets; so fördern mDCs die IFN- γ -Freisetzung, während pDCs NKT-Zellen polarisieren IL-4 zu produzieren.^[14, 157]

Eine letzte bisher charakterisierte Untergruppe bilden thymische DCs (tDCs); sie haben eine besondere Rolle in der Induktion von negativer Selektion von potentiellen autoreaktiven T-Zellklonen durch Präsentation von Eigen-AGs.^[33, 393] Anhand von Mausmodellen konnten Proietto *et al.* beispielweise demonstrieren, dass tDCs durch Negativ-Selektion autoreaktiver Thymozyten und Induktion von T_{regs} die zentrale Toleranz *in vivo* erhalten.^[283] Zwei unterschiedliche Populationen reifer DCs wurden im humanen Thymus identifiziert. Eine größere Population, welche CD11b⁻ CD11c⁺ und CD45RO^{low} ist und keine myeloiden Marker exprimiert. Und eine kleinere variable Population, welche CD11b⁺ CD11c^{high} und CD45RO^{high} ist. Darüber hinaus konnten IL-3R α ^{high} pDCs in Kortex und Medulla von Thymus entdeckt werden. ^[393, 414] Die größere (CD11b⁻) Population zeigt typische Charakteristika reifer DCs mit hohen Expressionslevels an HLA-DR, CD40, CD83, und CD86. Die kleinere Population umfasst hingegen reife CD83⁺ CD14⁻ und unreife CD83⁻ CD14⁺ DCs. Ein weiterer Unterschied ist die Expression von mRNA des inflammatorischen Chemokines Mip-1 α (CD11b⁺) und von TECK (*engl. thymus-expressed chemokine*) mRNA (CD11b⁻), so wie die Befähigung zur IL-12-Sekretion (CD11b⁻).^[393]

Die Expression von TECK scheint eine Importanz während der frühen thymischen Entwicklung und der gerichteten Migration von Thymozyten-Subsets durch Bindung an CCR9, zu haben.^[302,396, 442]

1.2.2. Lebenszyklus dendritischer Zellen

Nach ihrer Entwicklung aus den hämatopoietischen Vorläufern im Knochenmark begeben sich dendritische Zellen über die Blutbahn in fast alle Gewebe, wo sie zunächst in einem „unreifen“ Zustand residieren. In diesem Zustand verfügen sie über ein extrem niedriges bzw. kein T-Zell-Aktivierungspotential, da ihnen akzessorische Oberflächenmoleküle wie CD40, CD54 und CD86 fehlen. Im Gegensatz dazu sind sie sehr gut dafür ausgerüstet,

Einleitung

Antigene aufzunehmen und gleichsam durch eine hohe endozytische Aktivität charakterisiert.

DCs verfügen über verschiedene Merkmale, welche sie zu solch potenten APCs machen. Zum einen verfügen unreife DCs über Mechanismen der Phagozytose zur Aufnahme von Partikeln und Mikroben, zum anderen können sie über Makropinozytose extrazelluläre Flüssigkeiten und darin gelöste Stoffe sammeln. Insbesondere der adsorptiven Endozytose, deren Vermittlung durch entsprechende Rezeptoren stattfindet, wird eine bedeutsame Rolle zugeschrieben. Hierzu zählen die Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRRs), mit Hilfe derer sie spezifische chemische Signaturen, PAMPs, auf bestimmten Gruppen von Pathogenen erkennen. Toll-like-Rezeptoren und C-Typ-Lektin-Rezeptoren, wie der Makrophagen-Mannose Rezeptor und DEC-205, ebenso wie Fc γ - und Fc ϵ -Rezeptoren spielen in diesem Zusammenhang eine bedeutende Rolle.

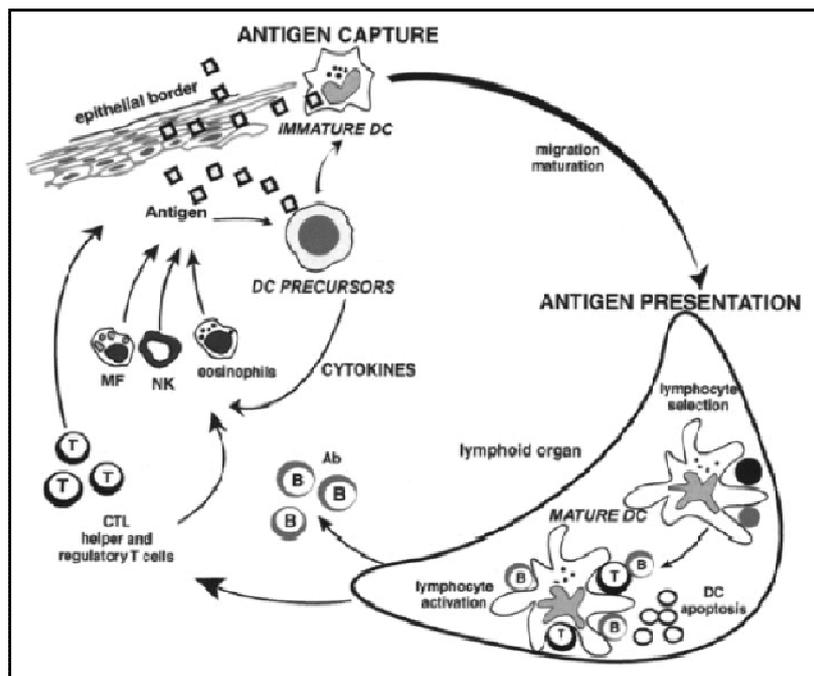


Abbildung 4:

Lebenszyklus dendritischer Zellen: Zirkulierende DC-Vorläufer gelangen als unreife DCs in Gewebe. Nachdem sie AGs aufgenommen haben migrieren reife DCs zu den lymphoiden Organen, wo sie die Möglichkeit zur Selektion seltener zirkulierender AG-spezifischer Lymphozyten haben.

Diese aktivierten T-Zellen helfen DCs bei der terminalen Reifung, was die Expansion und Differenzierung von Lymphozyten mit sich führt. Aktivierte Lymphozyten wandern in entzündete Gewebe und üben Effektorfunktionen aus.

Es besteht die Annahme, dass DCs nach Interaktion mit Lymphozyten durch Apoptose sterben.

(Quelle: Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol. 2000;18:767-811. Review.)

Einleitung

Treffen unreife DCs auf einen leistungsfähigen immunologischen Stimulus werden sie mobilisiert und beginnen zu reifen. Diese erhebliche Transformation hat den Verlust des Antigenaufnahme-potentials und die Zunahme der T-Zell-stimulatorischen Funktionen zur Folge.

Während ihrer Reifung, in der sie das aufgenommene Antigen prozessieren um es an einem MHC-Molekül-gebunden an der Oberfläche zu präsentieren, migrieren sie über die afferenten Lymphgefäße zu den T-Zell-Regionen der sekundären lymphoiden Organe. Der Zusammenbau des Peptid:MHC-Komplexes kann derweil über die endogene also auch die exogene Route verlaufen. MHC-I-Moleküle werden über die endogene Route beladen indem Peptide im Proteasom generiert und im Anschluss zum endoplasmatischen Retikulum (ER) transferiert werden, wo es zu ihrer Kopplung an MHC-I-Moleküle mit anschließender Translokation zur Zelloberfläche über den Golgi-Apparat kommt.

Die Verarbeitung von Antigenen über die exogene Route erfolgt zunächst durch ihren Abbau in Endosomen und des anschließenden Transports der generierten Polypeptide in MHC-Klasse II-reichen Kompartimenten (*MIIC*, engl. *MHC class II-rich compartments*) um dort auf MHC-II-Moleküle geladen zu werden.^[14] Ein intrazelluläres Protein „HLA-DM“ ist an der Beladung der naszierenden

MHC-II-Moleküle beteiligt, indem es die katalytische Entfernung der invarianten Kette (I_i), welche das MHC-II-Molekül blockiert und für die Peptidbeladung unzugänglich macht, fördert. Der proteolytische Abbau von I_i wird durch das Verhältnis von Cathepsin S und seinem endogenen Inhibitor Cystatin C reguliert. Während der Reifung kommt es zu einer Herunterregulierung von Cystatin C und einem Anstieg der Cathepsin S Aktivität, was den Abbau von I_i fördert und den Export von Peptid-beladenen Klasse II-Molekülen zur Zelloberfläche ermöglicht. (Abb.5)

Die reifeinduzierenden Moleküle, welche die DCs zur Reifung

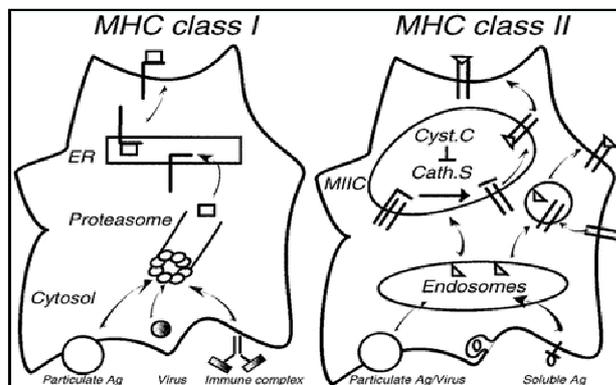


Abbildung 5:

Exogene Route: Peptide von phagozytierten Partikeln oder Immunkomplexen werden im Proteasom generiert, ins ER transferiert und anschließend auf naszierende MHC-I-Moleküle geladen.

Endogene Route: Lösliche AGs werden durch Makropinozytose oder Rezeptor-medierte Endozytose aufgenommen. Resultierende Peptide vom AG-Abbau in Endosomen werden zu MIICs transportiert, wo sie über das Entfernen von I_i auf MHC-II-Moleküle geladen werden. I_i wird durch Cathepsin S (Cath.S) gespalten, welches durch Herunterregulation von Cystatin C (Cyst.C) freigegeben wird.

(Quelle: Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol. 2000;18:767-811. Review.)

Einleitung

stimulieren, so genannte „Reifestimuli“, können von vielfältiger Natur sein (endogene/exogene Signale), ebenso wie verschiedenen Faktoren, welche Einfluss auf die Reifung nehmen. Der Reifungsprozess ist ein kontinuierlicher Vorgang, welcher in der Peripherie mit dem Antigenkontakt und/oder dem Treffen auf inflammatorische Zytokine beginnt und erst während der DC-T-Zell-Interaktion endet. Pathogen-zugehörige Moleküle wie LPS, bakterielle DNA und virale doppelsträngige RNA induzieren die DC-Reifung. Das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Signalen reguliert ebenfalls den Reifungsprozess. So stimulieren Zytokine wie IL-1, IL-6, GM-CSF, TNF- α , und Prostaglandin E2 allesamt die Reifung, während IL-10 sie blockiert.

Der koordinierte Ablauf der Reifung beinhaltet morphologische als auch funktionelle Veränderungen der DCs. Der Verlust von endozytotischen / phagozytotischen Rezeptoren und adhäsiven Strukturen geht einher mit einer gesteigerten Expression der Oberflächenrezeptoren CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) der B7 Superfamilie, die als co-stimulatorische Rezeptoren in der T-Zell-Aktivierung fungieren.^[474]

Die Expression weiterer CDs (*engl. Cluster of Differentiation*) wie CD40, welcher im weiteren Verlauf an CD154 (CD40L) auf Th-Zellen bindet und die DC-Aktivierung unterstützt, und der Reifemarker CD83 werden ebenfalls hochreguliert. Gleichzeitig findet eine Reorganisation des Zytoskeletts, Verlagerung der lysosomalen Kompartimente und Änderung der MIICs statt. Darüber hinaus erlangen die DCs eine hohe zelluläre Motilität.^[14] CCR7, ein chemotaktischer Rezeptor, wird hochreguliert. Folglich erhalten die DCs eine Reaktionsbereitschaft zu Mip-3 β (CCL19) und 6CKine (CCL21) (potentiell auf Lymphgefäßen exprimiert ^[446, 456, 478]), beides Chemokine, die von Zellen in der T-Zell-Zone exprimiert werden. In Folge dessen induziert dieser Rezeptor die reifenden DCs dazu, das entzündliche Gewebe zu verlassen und über einen Chemokine-Gradienten durch die Blutbahn zur Milz oder durch das lymphatische System zu einem Lymphknoten, zu wandern. Hier agieren sie nun als Antigen-präsentierende Zellen (APC); sie aktivieren und steigern durch Antigenpräsentation, Co-Stimulation und Sekretion von Chemokinen und Zytokinen (u.a. große Mengen IL-12) die angeborene (Natürliche Killerzellen) und erworbene (T- und B-Zellen) Immunität.

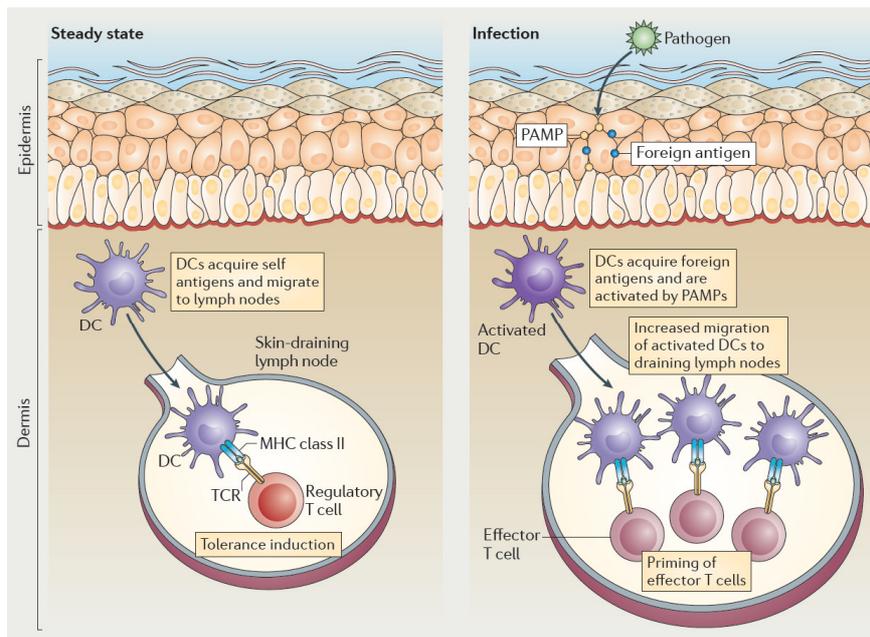


Abbildung 6 : Primen der T-Zellantwort

In Abwesenheit einer Infektion beteiligen sich DCs an zentraler und peripherer Toleranz indem sie Eigen-AGs oder unschädliche AGs aus der Umgebung (kreuz-)präsentieren um Apoptose, Anergie oder eine regulatorische Funktion von T-Zellen zu induzieren.

Entzündungssignale induzieren eine Hochregulierung von co-stimulatorischen Molekülen und Chemokinen, welche die Migration der DCs in lymphoide Gewebe unterstützen. In den T-Zell-Regionen induzieren Peptid-beladenen DCs die Generation von T-Effektorzellen und deren Proliferation.

(Quelle: Summers deLuca L, Gomerman JL. Fine-tuning of dendritic cell biology by the TNF superfamily. Nat Rev Immunol. 2012 Apr 10;12(5):339-51. doi: 10.1038/nri3193. Review.)

Eine direkte Antigenpräsentation zu CD4⁺ T- Helferzellen steuert deren Entwicklung und veranlasst diese wiederum die Aktivierung von Effektorzellen (AG-spezifische CD8⁺ zytotoxische T-Zellen (CTLs) und B-Zellen; AG-unspezifische Makrophagen, Eosinophile, NK-Zellen) zu regulieren, welche durch DCs dazu veranlasst werden zum Ort der Gewebsverletzung zu migrieren. Dabei ist jede T-Helferzelle über ihren T-Zellrezeptor (TCR) spezifisch gegenüber einem bestimmten Antigen. Nur wenn das passende Antigen präsent ist können ruhende T-Helferzellen über professionelle APCs (Makrophagen, B-Lymphozyten, und DCs) aktiviert werden. Trotzdem können Makrophagen und B-Zellen nur T-Gedächtniszellen aktivieren, während DCs die zusätzliche Fähigkeit haben auch naive T-Zellen „primen“ zu können.

1.2.3. Kreuzpräsentation

Multiple Liganden und Rezeptoren der TNF-Superfamilie partizipieren sequentiell in der T-Zell:DC-Kreuzpräsentation. DCs werden über die Erkennung von PAMPs oder DAMPs (*engl. damage-associated molecular patterns*) aktiviert und in Folge dessen steigern sie

ihre Expression von CD40, MHC-Molekülen und den co-stimulatorischen Molekülen CD80 und CD86. Die Präsentation von Peptidantigenen im Kontext der MHC-Klasse II Moleküle gegenüber AG-spezifischen CD4⁺ T-Zellen, einhergehend mit co-stimulatorischen Signalen von CD80 und/oder CD86, resultiert in die CD4⁺ T-Zell-Aktivierung, die von einer Hochregulation der DC-lizensierenden Faktoren CD40L und Lymphotoxin- α 1 β 2 (LT α 1 β 2) begleitet wird.^[370] Die induzierte CD40L- und LT α 1 β 2-Expression befähigt die aktivierten AG-spezifischen CD4⁺ T-Zellen zur Lizenzierung von DCs durch CD40- und LT β Rezeptor(LT β R)-Signalisierung.

Die CD40-vermittelte Signaltransduktion mündet in die Produktion von IL-12 und einer Hochregulation von CD70, CD86, 41BBL, OX40L und GITRL, wohingegen über LT β R die Produktion von Typ I Interferonen (IFNs) induziert wird. PAMPs und DAMPs sind an diesen Prozessen beteiligt..

Priming von CD8⁺ T-Zellen über MHC-Klasse I-restringierte Peptide resultiert in die Hochregulation von CD27, 41BB, OX40 und GITR. Die entsprechende Stimulation dieser Rezeptoren durch korrespondierende Liganden der TNF-Superfamilie in Kombination mit IL-12 und Typ I IFNs mündet in eine CD8⁺ T-Zell-Aktivierung und -Proliferation, so wie die Ausbildung von Effektorfunktionen, und die Bildung und Erhaltung von CD8⁺ T-Gedächtniszellen.

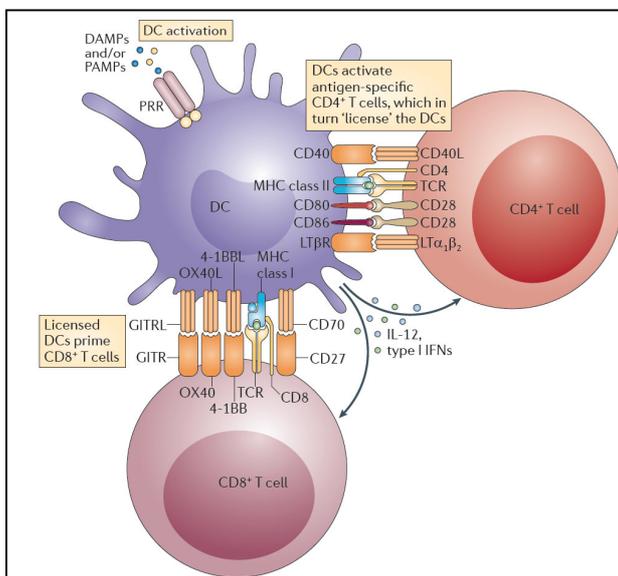


Abbildung 7: T-Zell:DC-Interaktionen werden maßgeblich durch die Kommunikation über Rezeptoren und Liganden der TNF-Superfamilie beeinflusst. Dabei werden CD4⁺ T-Zellen über die Beteiligung von Peptid:MHC-II-Komplexen und CD8⁺ T-Zellen mittels Peptid:MHC-I-Komplexen aktiviert

(Quelle: Summers deLuca L, Gommerman JL. Fine-tuning of dendritic cell biology by the TNF superfamily. Nat Rev Immunol. 2012 Apr 10;12(5):339-51. doi: 10.1038/nri3193. Review.)

1.2.4. DCs und immunologische Toleranz

Neben ihrer traditionellen Rolle als immunogene Zellen, regulieren DCs Immunreaktionen und vermitteln periphere T-Zell-Unreaktivität unter homöostatischen Konditionen *in vivo*.^[132] Die regulatorische Aktivität von DCs setzt sich aus multiplen Mechanismen

zusammen, welche die Produktion und Ausschüttung von anti-inflammatorischen Zytokinen.^[260] Fas/FasL-induzierte Apoptose von Effektor-Immunzellen^[372], so wie das Löschen und Induzieren von T_{regs} beinhaltet.^[81, 243, 279]

Zu tolerogenen DCs zählen die Mehrheit unreifer DCs, Subpopulationen von unterschiedlichem Reifegrad so wie pDCs.^[227] In Abwesenheit von co-Stimulation induziert die AG-Präsentation durch DCs eine immunologische Toleranz des spezifischen T-Zell-Repertoires durch Mechanismen der Deletion^[398] und Anergie.^[7] Diese DCs werden als „Steady-State“ DCs bezeichnet. Sie befinden sich also in Abwesenheit von Infektion oder Entzündung in einem ruhenden Zustand.

Periphere „Steady-State“ DCs stellen unzureichende Signale (keine co-Stimulation) für T-Zellen bereit um ,dass diese komplette Effektorfunktion erlangen oder eine Gedächtnisentwicklung herbeiführen könnten. Folglich induziert die Präsentation von aufgenommenen harmlosen oder endogen-exprimierten AGs periphere Toleranz in naiven T-zellen und beendet „Memory“-CD8⁺ T-Zellantworten.^[74, 165]

Obwohl während der T-Zell-Entwicklung autoreaktive Klone durch negative Selektion im Thymus aussortiert werden, greift dieser Mechanismus nicht gänzlich. Durch kontinuierliche Präsentation von Autoantigenen werden potentiell autoreaktive T-Zellen desensibilisiert.

Für eine Toleranzherstellung von CD8⁺ T-Zellen spielt der Mechanismus der Kreuzpräsentation eine zentrale Rolle. Es konnte demonstriert werden, dass eine konstitutive Kreuzpräsentation gewebespezifischer Antigene die Toleranz endogener autoreaktiver CD8⁺ T-Zellen mediert. Ist die Fähigkeit Dendritischer Zellen zur Kreuzpräsentation beeinträchtigt, akkumulieren autoreaktive CD8⁺ T-Zellen in peripheren lymphatischen Organen.^[219]

Auf der anderen Seite lässt sich jedoch bei einer Vielzahl von Malignitäten eine signifikante Veränderung der DC-Generation feststellen. Obwohl DCs eigentlich in der Lage sind neoplastisches Zellwachstum zu eliminieren, kann bei einigen Krebstypen eine gänzliche Abwesenheit von DCs am Ort des Tumors festgestellt werden.^[100, 444, 481, 487] Andere Krebstypen weisen eine Beeinträchtigung der DC-Reifung auf, welche durch ein Ausbleiben der T-Zell-Aktivierung in Korrelation mit einer induzierten T-Zell-Anergie gekennzeichnet ist.^[471, 483] Nichts desto Trotz stellen DCs unter „Steady-State“-Konditionen starke Induzenten der T-Zell-Toleranz dar, indem sie die Kapazität besitzen aus naiven CD4⁺ Vorläufern die Bildung von Foxp3⁺ T_{regs} zu polarisieren.^[453, 482] [325, 363, 366, 414]

1.2.5. DCs als Immuntherapie

Immuntherapien versuchen sich die Eigenschaften und die Spezifität des Immunsystems zu Eigen zu machen um beispielsweise Tumore zu behandeln. Die molekulare Identifizierung humaner Krebs-spezifischer Antigene hat es dabei ermöglicht Antigen-spezifische Immuntherapien zu entwickeln. Aufgrund ihrer Fähigkeit sowohl Immuntoleranz als auch Immunität zu kontrollieren bilden DCs den zentralen Dreh- und Angelpunkt des Immunsystems. Folglich richten sich Anstrengungen eine therapeutische Immunität gegen Krebs zu generieren auf dieses wesentliche Ziel.^[269]

Anhand von Mausmodellen konnte demonstriert werden, dass AGs, welche von Tumoren freigesetzt werden, von DCs aufgenommen werden können. Die anschließende Kreuzpräsentation dieser AGs gegenüber T-Zellen führt zur Generation von Tumorspezifischen CTLs, die zur Tumor-Rejektion beitragen.^[72, 95]

Tumore können jedoch eine AG-Präsentation und die Etablierung einer Tumorspezifischen Immunantwort durch vielerlei Mechanismen verhindern.^[291] Durch sezernierte Faktoren wie IL-6 und M-CSF fördern sie die Differenzierung von Makrophagen aus Monozyten anstelle von DCs, welche Tumor-spezifische T-Zellen primen könnten^[52], die Freisetzung von IL-10 verhindert eine Reifung von DCs^[88, 359] und andere Tumor-abstammende Faktoren wie z.B. TSLP induzieren sogar die Generation von abberant-gereiften „pro-Tumor-DCs“, welche OXL40 exprimieren, somit die Generation von Th2-Zellen polarisieren, die IL-4 und IL-13 sezernieren^[11], die wiederum die Apoptose von Tumorzellen verhindern und indirekt Tumorstadium fördern indem sie Tumor-assoziierte Makrophagen stimulieren EGF zu sezernieren. Auch Mammakarzinom-infiltrierende pDCs, welche nach TLR-Ligation nur wenig IFN α produzieren, fördern Tumorstadium indem sie naive CD4⁺ T-Zellen induzieren sich in IL-10-produzierende immunsuppressive T-Zellen zu differenzieren.^[42] Die Hemmung der IFN α -Sekretion mag ebenso die Generierung von CTLs beeinträchtigen, da DCs Typ I IFNs zur Kreuzpräsentation von Tumor-AGs benötigen.^[72, 95] Schlussendlich können DCs direkte pro-Tumor Effekte besitzen; so wurde nachgewiesen, dass mDCs Überleben und Klonogenität von Tumorzellen des Multiplen Myeloms fördern^[12, 178] und pDCs zur Tumorstadium von Eierstockkrebs beitragen indem sie förderliche Zytokine sezernieren.^[59, 62]

Aufgrund dessen ist es notwendig Vakzinierungsprotokolle zu etablieren, welche potente CD8⁺ CTLs erzeugen, die eine hohe Avidität besitzen und in der Lage sind Peptid:MHC I-Komplexe auf Tumorzellen zu erkennen, hohe Level an Granzym und Perforin exprimieren, in der Lage sind in die Tumorumgebung einzudringen und die immunmodulatorischen Mechanismen des Tumors zu überwinden.^[3, 168] Kritisch hierfür ist die Präsenz

entsprechender DCs, die Qualität der induzierten CD4⁺ T-Helferzellen, die Eliminierung bzw. nicht-Aktivierung von T_{regs} und die Störung des immunsuppressiven Tumormikromilieus.^[269]

Vakzinierungsstrategien unter Einbezug von DCs wurden - dank der besonderen Eigenschaft dieser Zellen innate und adaptive Immunantworten zu koordinieren - bereits entwickelt und seit mehr als einem Jahrzehnt getestet.^[390] Im Rahmen einer Tumorkvakzinierung ist es von Bedeutung eine gleichzeitige Induktion von Tumorspezifischen T-Effektorzellen und die Generation eines immunologischen Gedächtnisses zu erzielen um eine gezielte Reduktion der Tumormasse zu gewährleisten und im weiteren Verlauf Tumorrezidive zu kontrollieren. Innerhalb dieses Prozesses ist es zunächst von Bedeutung den DCs Tumor-spezifische Antigene bereitzustellen. Zum Einen kann dies durch die *ex vivo* Kultivierung von Patienten-abstammenden DCs mit einem Adjuvant, welches die Reifung der DCs induziert, und dem tumor-spezifischen AG und anschließender Re-Injektion in den Patienten, erfolgen und zum Anderen können DCs induziert werden Tumor-spezifische AGs, die mit einem DC-Rezeptor-spezifischen AK fusioniert werden um chimärische Proteine zu bilden, *in vivo* aufzunehmen.^[269]

Neben der Möglichkeit einzigartige mutierte Antigene zum Beladen von DCs zu verwenden, zählen auch gemeinsame nicht-mutierte AGs zu potentiellen Kandidaten ^[30,86,111,272] wobei die letzteren potentielle Nachteile bezüglich einer möglichen Erschöpfung des Repertoires an hoch-aviden Klonen durch negative Selektion ^[3,87] und durch das Vorhandensein von T_{regs} unter den die existierende Memory-T-Zellen, aufweisen können. Das Hervorrufen einer AG-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺-medierten Immunität durch spezifisches DC-Targeting konnte erfolgreich *in vivo* demonstriert werden.^[28,29,132]

Die meisten Rezeptoren, die in „Targeting“-Studien zur Anwendung kommen sind C-Typ-Lektin-Rezeptoren (CLR). Viele endozytotische Transmembran-Rezeptoren der CLR-Familie werden von DCs exprimiert und sind in die AG-Aufnahme verwickelt.^[85] Zu ihnen zählen u.a. der Mannose-Rezeptor, CD205 und DC-SIGN. Versuche des CLR-Targetings können in zwei Kategorien unterteilt werden; zum einen Strategien die auf die Bindung von natürlichen Rezeptorliganden abzielen und zum anderen Strategien, die Rezeptorspezifische Antikörper instrumentalisieren.^[486]

Steinman und Nussenzweig demonstrierten, dass unterschiedliche DC-Subsets unterschiedliche Immunantworten hervorrufen ^[78] und bestätigten damit frühere *in vivo*- und *in vitro*-Studien mit purifizierten Maus-DC-Subsets ^[228, 285], in denen CD205-exprimierende CD8⁺ DCs verabreichte AGs im Kontext von MHC-I und MHC-II Molekülen präsentierten, während CD8⁻ DCs, welche das DC-Marker-AG des monoklonalen AKs 33D1 exprimieren, spezialisiert für eine MHC-II-abhängige AG-Präsentation sind.^[78] Weitere

Konsequenzen, die sich durch das DC-Targeting ergeben, betreffen durch zielgebende Antikörper bereitgestellte Aktivierungssignale (e.g. über Dectin-1, DC-SIGN, CD40), welche die DCs nicht notwendigerweise auf die gewünschte Art und Weise polarisieren mögen (e.g. über DCASGPR) [202] und Aspekte der Signaltransduktion in Abhängigkeit zum jeweils involvierten Oberflächenrezeptor. Beispielsweise kann eine von CD205-exprimierenden DC eingeleitete Th1-medierte Immunantwort über einen CD70-abhängigen Mechanismus ablaufen, während die Th1-Polarisation in CD8⁻33D1⁺ DCs über den klassischen IL-12 abhängigen Weg stattfindet.[349]

Die erste veröffentlichte klinische Studie zur Erforschung DC-basierter Impfstoffe involvierte Patienten mit B-Zell-Lymphom und gebrauchte unreife DCs, die intravenös verabreicht wurden.[144, 486] Über 150 Studien wurden seitdem vermeldet, wobei Melanome den am häufigsten frequentierten Krebstypen in der Behandlung mit DC-basierten Vakzinen darstellen, gefolgt von Prostatakrebs, Nierenzellkarzinom, Brustkrebs, multiplem Myelom, Leukämien, Darmkrebs und Gliomen.[13]

In der ersten Vakzinierungsstudie von 1996 wurde Gebrauch von zirkulierenden myeloiden DCs gemacht, die weitere Anwendung in Studien von Lymphomen und Prostatakrebs fanden.[144, 347] Erste Studien verwendeten unreife DCs bis man herausfand, dass sie Toleranz anstelle von Immunität induzierten und dazu übergang reife DCs zu benutzen. [28, 29, 132, 486] FLT3L-expandierte DCs^[91], CD34⁺ DCs^[15, 223], IFN- α -^[16] oder IFN- β -^[384] generierte DCs und allogene DCs^[140, 231] fanden Verwendung in Vakzinierungsstudien. Letztendlich wurden auch CD34⁺ Stammzellen in der Klinik getestet mit einigen ermutigenden Ergebnissen.[267]

DCs werden mit Peptiden gepulst, Proteinen beladen oder mit RNAs transfeziert, die für spezifische AGs kodieren. Um die Auswahl präsentierter Tumor-spezifischer AGs zu erweitern wurden DCs mit Tumor-abstammenden RNAs transfeziert oder mit Tumorzellen fusioniert um DC-Tumor-Hybride zu kreieren.[166] Darüber hinaus wurden DC-abgeleitete Exosome zu Vakzinierungszwecken verwendet^[80], da sie in der Lage sind Peptid-spezifische T-Zell-Antworten zu induzieren.[239]

Mehrere klinische Studien evaluierten die Kombination einer DC-basierten Therapie mit anderen Therapien, so wie die Depletion von T_{regs} ^[63], Chemotherapie ^[140, 355] oder Administration von IFN- γ .^[137] In einer klinischen Studie der Phase III wiesen Patienten mit metastasierendem Melanom, die ein Peptid-Vakzin in Kombination mit IL-2 erhalten hatten, eine allgemein verbesserte Ansprechrate und progressionsfreie Überlebensrate gegenüber Patienten auf, denen lediglich IL-2 verabreicht wurde.[331] Die Behandlung von metastasierendem Prostatakrebs mit sipuleucel-T (APC8015) – ein zelluläres Produkt, das auf der Anreicherung von APCs basiert, die kurz mit einem PAP-Fusionsprotein und Gm-

CSF kultiviert wurden – resultierte in eine um ein durchschnittlich um 4 Monate verlängertes Überleben in Phase III Studien.^[136, 160] Eine andere Therapie mit einem Idiotyp-Vakzin gegen follikuläre Lymphome verlängerte signifikant eine Chemotherapie-induzierte Remission in Patienten einer klinischen Studie der Phase III.^[328] Auch ein anderes Beispiel einer randomisierten klinischen Studien der Phase II an Männern, die an metastasierendem Prostatakrebs erkrankt sind, demonstrierte ein allgemein verbessertes Überleben von Patienten, die einen Pox-Virus-basierten Impfstoff gegen PSA (PROSTVAC) erhalten hatten.^[161]

Neue Strategien, die zur Zeit in klinischen Studien erprobt werden machen Gebrauch von TLR-Ligand-aktivierten DCs, benutzen verschiedene DC-Subsets und DC-basierte Therapien in Kombination mit Strategien, die auf co-stimulatorische Moleküle, wie CTLA4, OX40, 4-1BB oder PD1 abzielen.^[486]

1.3. Glykosphingolipide und Ganglioside

Sphingolipide und Glykosphingolipide sind Bestandteile der Membranen aller eukaryotischen Zelloberflächen. Dabei setzen sie sich in einem Zell- und Spezies-spezifischen Muster zusammen. Das Grundgerüst der GSLs besteht aus einem hydrophoben Ceramidanteil und einem glykosidisch gebundenen Kohlenhydratanteil. Mit dem Ceramidanteil sind sie in der Zellmembran verankert und somit am Aufbau der Zellmembranen beteiligt. Der Oligosaccharridanteil wird auf der Außenseite der Zellmembran präsentiert, wo er für eine Vielzahl biologischer Prozesse von Bedeutung ist.^[173] GSLs werden im Golgi durch sequentielle Addition von individuellen Monosaccharriden an das nicht-reduzierte Ende der wachsenden Polysaccharridkette mittels Glycosyltransferasen synthetisiert.^[226]

1942 fand der Begriff „Gangliosid“ durch den deutschen Wissenschaftler Ernst Klenk seine erste Anwendung. Klenk entdeckte Ganglioside erstmalig in frisch isolierten Ganglionzellen aus dem Gehirn von Tay-Sachs erkrankten Patienten und benannte sie entsprechend ihrer besonders hohen Anzahl am Fundort, nämlich den Ganglionzellen (Neuronen).^[193, 314] Ganglioside sind Glykosphingolipide, jedoch charakterisiert durch den Besitz von mindestens einer negativ-geladenen Neuraminsäure. Das Vorhandensein von eben diesen Sialinsäurederivaten unterscheidet sie von anderen Sphingolipidgruppen.

Ganglioside gehören zu den sogenannten ganglio-, lacto-, und neolacto-Serien. Andere Glykolipid-Serien in humanen Geweben sind die globo-, isoglobo-, und muco-Serien, welche alle von Lactosylceramid abstammen.(Abb.8) Je nach Anzahl der Sialinsäurereste, welche durch Sialyltransferasen an die innere Galaktoseeinheit gebunden werden, findet eine Klassifizierung der Ganglio-Serie in asialo-(0), a-(1), b- (2) und c- (3) statt.

Ganglioside dessen Sialinsäurereste mit dem inneren N-Galaktosamin verknüpft sind werden als α -Serien Ganglioside bezeichnet. Des Weiteren bedient sich die systematische Klassifizierung der einzelnen Ganglioside der Nomenklatur von Svennerholm. In dieser referieren die Großbuchstaben M, D, T und Q auf Mono-, Di-, Tri und Tetrasialoganglioside und die Nummerierung (1, 2, 3 etc.) richtet sich nach der Reihenfolge der Migration der Monosialoganglioside in der Dünnschichtchromatographie (GM3 > GM2 > GM1). Die strukturelle Diversität der Ganglioside stellt ein wesentliches Kennzeichen dieser Moleküle dar. Über 200 Ganglioside, welche sich durch ihre Kohlenhydrat-Komponenten unterscheiden sind heute bekannt.^[332, 432]

Bei der Gangliosidsynthese stellt die Konversion von GM3 zu entweder GM2 (a-Serie) oder GD3 (b-Serie) einen wesentlichen Verzweigungspunkt dar.^[226] Die Verbreitung der Ganglioside ist ubiquitär und nicht auf neuronale oder andere bestimmte Zelltypen beschränkt - so weit untersucht. Auf neuronalen Zellen des zentralen (ZNS) und peripheren (PNS) Nervensystem sind sie jedoch besonders zahlreich. Speziell in der grauen Substanz des Gehirns befindet sich die höchste Konzentration an Gangliosiden.^[374] Neben dem ZNS befindet sich der höchste Level des GM2 Gangliosides z.B. im Rückenmark. In verschiedenen Laboren durchgeführte Studien weisen auf eine Rolle der GSLs in der Morphogenese und Differenzierung hin.^[123, 431] Beispielsweise differenzieren HL60 Zellen, die mit GM3 inkubiert wurden, in Monozyten/Makrophagen, welche charakteristisch hohe GM3-Level besitzen. Währenddessen differenzieren die gleichen Zellen in Präsenz von SPG (Sialylparaglobosid) zu SPG-haltigen Granulozyten;^[261, 262] d.h. die Anreicherung spezifischer Ganglioside triggert und definiert die Richtung terminaler Differenzierung und erhöhte Gangliosid-Level in Membranen sind Ergebnis ebenso wie Ursache der Differenzierung.^[121] Besonders Ganglioside der b-Serie (zwei NeuAc Reste) weisen ein einzigartiges Expressionsmuster während der neuralen Differenzierung auf und es wurde ihnen nachgewiesen, dass sie die Fähigkeit haben die Differenzierung selbiger zu induzieren.^[431] Das GM2 Gangliosid wird als onkofetales Antigen beschrieben, da es in bestimmten Tumoren und im humanen fetalen Gehirn auftritt mit maximaler Expression bei 22 Wochen. ^[149, 375, 400] Während der frühen kortikalen Entwicklung initiieren pyramidale Zellen die Bildung von Dendriten und Neuriten. Morphologisch reife pyramidale Neuronen bilden normalerweise keine weiteren Primär-Dendriten. In neuronalen Speicherkrankheiten findet jedoch eine ektopische Dendritogenese statt, deren metabolisches Merkmal ein erhöhtes intrazelluläres GM2-Expressionslevel ist. In Korrelation dazu findet man während der normalen Dendritogenese unreifer Neuronen ebenfalls erhöhte GM2-Level (s.o.).^[400] Es häufen sich die Beweise, dass Ganglioside als

regulatorische Elemente in zellulären Events, wie der Neuritogenese, Axonogenese und Synaptogenese, fungieren.^[431]

Die Funktion der Ganglioside ist entsprechend ihrer Verbreitung recht vielschichtig. Neben ihrer nachgewiesenen Funktion in Zellwachstum und Differenzierung spielen sie eine wichtige Rolle bei der Modellierung der Signaltransduktion über u.a. Zell-Zell-Interaktion und Zell-Adhäsion.^[216] So konnten ihnen Auswirkungen auf Zelltyp-spezifische Adhäsions-prozesse als Liganden für Selektine nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden sie als Bindungsstellen für Viren, Bakterien und Toxine (Spezifität von GM1 für Cholera-Toxin) identifiziert und beeinflussen u.a. dadurch Immunreaktionen.^[162] Sie haben Anteil an der Onto- und Onkogenese, wo sie viele Aspekte der Krebsmetastasierung und malignen Transformation beeinflussen.^[194, 428, 429] Darüber hinaus sind sie in die Pathogenese bestimmter immun-vermittelter neurologischer Krankheiten verwickelt indem sie durch ihre hoch-antigenen Kohlenhydratanteile die Produktion von Antikörpern, die mit individuellen GSLs reagieren, fördern. Interessanterweise lassen sich anhand bestimmter Ganglioside auch die Blutgruppen A, B und 0 bestimmen indem man die Kombination der angehängten Monosaccharide betrachtet.

Ganglioside bzw. GSLs sind nicht homogen über die Zelloberfläche verteilt, sondern segregieren in Mikrodomänen, so genannten Lipid Rafts. Diese Lipid Rafts sind reich an Glycosylphosphatidylinositol-verankerten Proteinen, Sphingomyelin und Cholesterin.^[293, 353] Aufgrund dieser besonderen Lokalisation in spezialisierten Mikrodomänen in der Plasmamembran sind Ganglioside besonders an der interzellulären Signalgebung ^[119, 121, 124, 244, 425] und dem „Trafficking“ und / oder „Sorting“ beteiligt. ^[122, 392] Lipid Rafts nehmen als Signalplattformen eine bedeutende Rolle im Immunsystem der Säugetiere ein da sie verschiedene Immunrezeptor-initiierte Zellfunktionen effizient orchestrieren.^[458, 464, 488] Bedeutsam ist hierbei ihre Beteiligung an der Aktivierung von T- ^[460] und B-Lymphozyten ^[491], so wie bei Zellen des innaten Immunsystems.^[489]

Ganglioside modulieren die Zytotoxizität Natürlicher Killerzellen (NK). Siglec-7 (*engl. sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins*) ist ein inhibitorischer Rezeptor auf NK-Zellen, der präferiert eine NeuAc α 2-8NeuAc Sequenz bindet. Diese ist charakteristisch für Ganglioside der b-Serie wie GD3, GD1b und GT1b. In Folge dessen wird die Zytotoxizität von NK-Zellen in einer Siglec-7 abhängigen Weise durch bestimmte Ganglioside supprimiert.^[216]

Innerhalb einer Entzündungsreaktion binden zirkulierende Neutrophile Blutgefäße um an ihnen entlang zu rollen (Rolling and Adhesion) um schließlich in das umgebende Gewebe zu gelangen. Ganglioside auf der Oberfläche von Neutrophilen werden in der Realisierung

Einleitung

dieses Prozesses als Rezeptoren impliziert indem sie Endothelium-exprimiertes E-Selectin binden.^[216] Aktuelle Untersuchungen weisen daraufhin, dass Ganglioside als sogenannte „Counterreceptors“ anpassungsfähige Bindungsstellen für endogene Lektine darstellen. So konnte gezeigt werden, dass GM1, welches als wichtiger Modulator des neuronalen Zellwachstums und der T-Zellkommunikation dient, mit Galectin-1 in einer Raft-abhängigen Lektin-Endozytose co-lokalisiert. Dieser Nachweis konnte in diversen Zelltypen, einschließlich leukämischen T-Zellen, erbracht werden und deutet auf eine Rolle dieses ubiquitären Gangliosides als funktionellen Galectin-1-Counterrezeptor hin.^[193] Die Tatsache, dass regulatorische T-Zellen (T_{regs}) Galectin-1 besitzen und nach Aktivierung eine Zunahme der Expression zu verzeichnen ist, deutet auf eine putative Rolle in der Immunregulation hin. Durch T_{regs} präsentierte oder sezernierte Galectin-1 engagiert T_{eff} -exprimiertes GM1 als Counterrezeptor mit der Konsequenz einer Suppression der T_{eff} -Proliferation und Induktion von Anergie oder Apoptose.

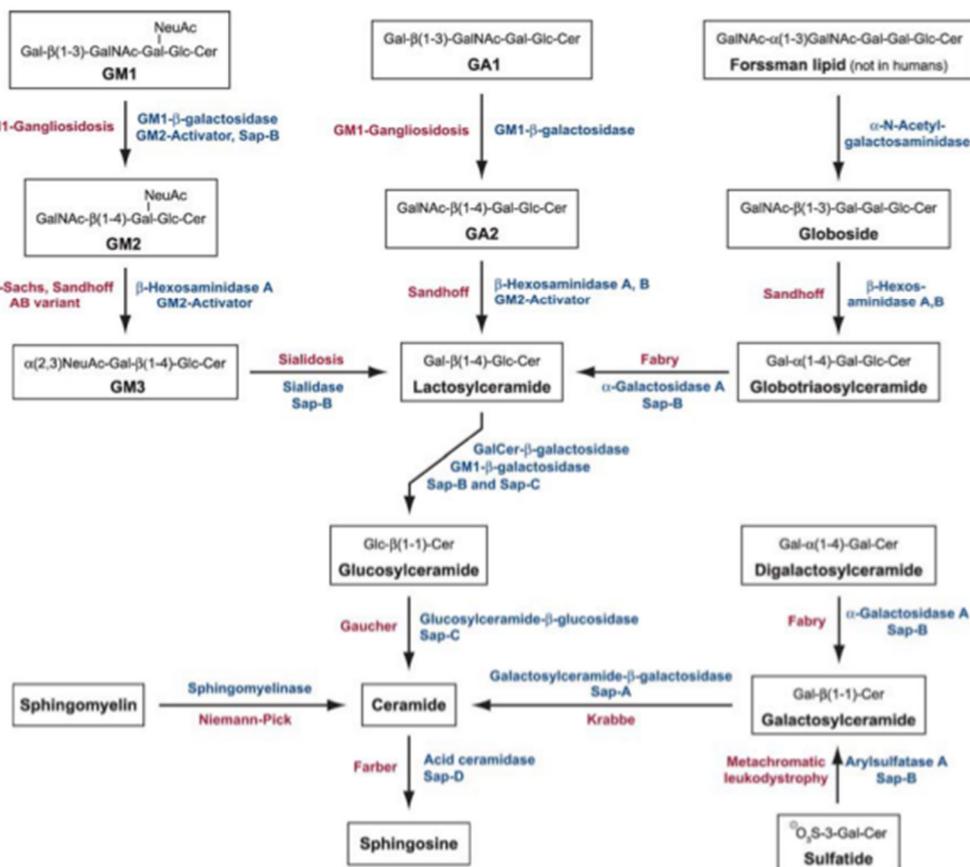


Abbildung 8:

Lysosomaler Metabolismus ausgewählter Sphingolipide durch jeweilige Enzyme und entsprechende Aktivatorproteine (blau); Eponyme individuell vererbter Erkrankungen (Lysosomale Speicherkrankheiten) sind am entsprechenden Abbauschritt vermerkt (rot)

(Quelle: Kolter T, Sandhoff K. Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. Annu Rev Cell Dev Biol. 2005;21:81-103. Review.)

1.3.1. Das GM2-Aktivator Protein

Der lysosomale Glykosphingolipidabbau in Geweben höherer Lebewesen wird durch das sequentielle Freisetzen von Monosacchariden mittels spezifischer saurer Glykohydrolasen bewerkstelligt. Für den Abbau mancher GSLs ist die Anwesenheit von sogenannten Aktivatorproteinen essentiell.^[27]

Die vier bekannten Sphingolipid-Aktivatorproteine bzw. Saposine, SAP-A, -B, -C und -D, bilden eine Familie kleiner, hitzestabiler Proteine, die durch limitierte Proteolyse aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein, dem Prosaposin, entstehen ^[138, 477]

Die physiologische Aufgabe der SAP-Proteine ist die Aktivierung von Substraten des lysosomalen Lipidstoffwechsels um sie somit für den Abbau durch die jeweiligen Hydrolasen zugänglich zu machen. SAP-A fungiert dabei als Co-Aktivator der sauren β -Glucosidase, SAP-B wird unter anderem von der Sialidase, der α -Galaktosidase A und der Arylsulfatase A benötigt. SAP-C aktiviert die Substrate der Gluco- und der β -Galaktocerebrosidase sowie der sauren Ceramidase, die auch von SAP-D stimuliert wird. Die Funktionen der Saposine sind demnach nicht nur vielschichtig sondern auch überlappend.

Im Vergleich dazu ist der GM2 Aktivator einzigartig in vielerlei Aspekte. Zum einen ist er durch ein unabhängiges Gen kodiert und teilt keine Primärstruktur-Homologien mit den anderen Aktivatorproteinen, welche durch eine Sequenzkonservierung von 60% gekennzeichnet sind. Darüber hinaus funktioniert er als Monomer, wohingegen alle vier Saposine Dimere bilden.

Entgegengesetzt der früheren Postulierung, dass dem GM2-Aktivator lediglich die Assistenz beim GM2 -Abbau inne liegt, wurden ihm über die letzten Jahrzehnte weitaus mehr Aufgaben nachgewiesen und das Spektrum seiner Substrate erweitert.

Nach der erstmaligen Erkenntnis, dass die Hydrolyse von GM2 durch HexA einen Protein Co-Faktor benötigt ^[468], wurde 6 Jahre später das Glykolipid GA2 als weiteres Substrat für die Hydrolyse durch HexA und GM2AP identifiziert.^[451]

Neben GM2 und GA2 weist der Aktivator eine geringfügig höhere Affinität für GM1 auf. Jedoch bindet GM2AP nicht an die β -Galaktosidase, welche die Hydrolyse von GM1 katalysiert.^[57] Es kann dem Aktivator aber eine Detergenz-ähnliche Funktion beigemessen werden, da bei Vorliegen einer sehr hohen Konzentration doch eine Aktivator-bedingte Förderung der GA2 und GM1-Umsetzung stattfindet.^[415]

In vitro fördert GM2A die Konversion von GM2 zu GA2 durch Abspaltung von NeuAc durch eine Sialidase. Außerdem haben Versuche mit GM2-Analoga gezeigt, dass der Ceramidteil durch u.a. PE ersetzt werden kann (PE(dipalmitoylphosphatidylethanolamine)-

Einleitung

II3NeuAcGgOse3), aber die Erhaltung der Hydrophobität des Lipidteils unerlässlich für die Aktion des GM2AP ist.^[415]

Anhand von Untersuchungen mit rekombinantem GM2AP, konnte etwas Licht in das Enigma der GM2AP-Wirkungsweise gebracht werden indem man die Bedeutung des GM2-Epitops etablierte. Dessen spezifische Trisaccharridstruktur und die GalNAc-NeuAc-Interaktion innerhalb des Epitopes, GalNAc β 1 \rightarrow 4(NeuAc α 2 \rightarrow 3)Gal-, scheinen dabei von wesentlicher Bedeutung zu sein.^[236, 415] Schon zuvor wurde in NMR-Studien die Existenz einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Acetoamido-NH von GalNAc und der Carboxylgruppe von NeuAc suggeriert. ^[461, 466]

Die hohe Spezifität des Aktivators gegenüber dem Oligosaccharridanteil wurde bereits 1984 deutlich. Das Entfernen von entweder GalNAc, NeuAc oder dessen negativer Ladung vom GM2-Molekül resultierte in eine signifikant reduzierte Glykolipidbindung durch den Aktivator und ein Ausbleiben der Hydrolyse durch HexA. ^[467]

Durch die Erkennung und Modifikation der Konformation und Interaktionen innerhalb der Trisaccharridstruktur ermöglicht das GM2AP den Zugang zu jeweils GalNAc und NeuAc durch die HexA bzw. die Sialidase. ^[409, 415]

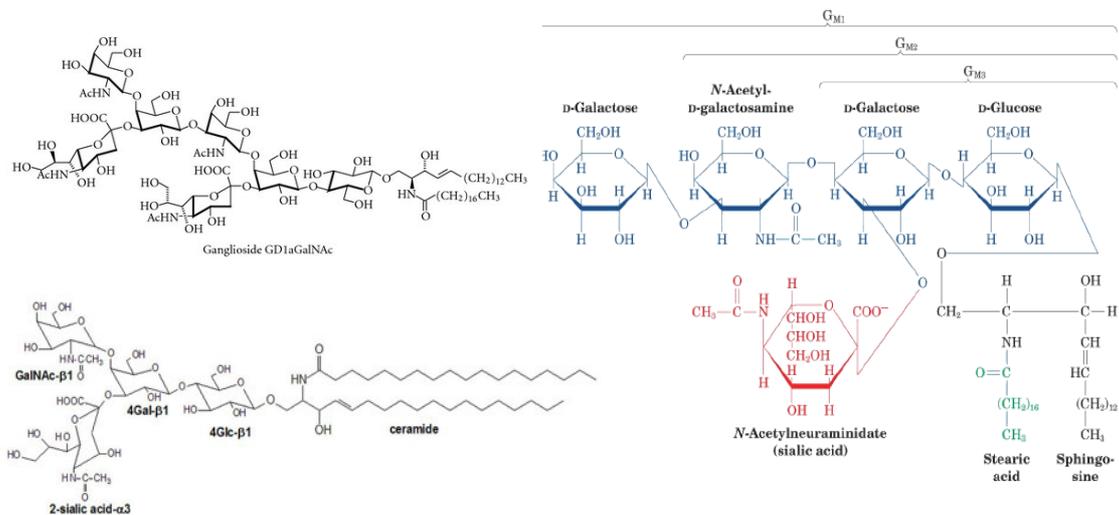


Abbildung 9:
Strukturformeln von GD1a-GalNAc (oben links) und GM2 (unten links); Strukturformeln von GM1, GM2, GM3 (rechts)

(Quellen: <http://themedicalbiochemistrypage.org/sphingolipids.php>;
<http://en.wikipedia.org/wiki/Ganglioside>)

Obwohl die Funktionsweise des GM2AP nach wie vor nicht völlig verstanden wird, ist eine weitverbreitete Annahme die, dass GM2AP partiell in die Lipiddoppelschicht eintaucht und GM2 aus der Membran extrahiert indem es das Gangliosid aus der Doppelschicht heraushebt und folglich den Trisaccharridteil der HexA zur Hydrolyse von GalNAc präsentiert.^[409] Demnach wird der HexA der Zugang zum membrangebundenen GM2 durch sterische Hinderung durch angrenzende Lipidmoleküle erschwert. Tatsächlich ragt

die Zuckerkette des GM2-Gangliosides nur 2.2 Å aus der Membranoberfläche heraus.^[236] Weitere Hinweise zu der Annahme, dass HexA aus sterischen Gründen nicht in der Lage ist GM2 effektiv umzusetzen sind durch die GM2AP-unabhängige Hydrolyse von Liposom-inkorporiertem GalNAc-GD1a durch HexA geliefert worden. Liposom-inkorporiertes GM2 hingegen kann nur mit Hilfe des GM2AP hydrolysiert wird.

1997 beschrieben Yadao *et al.*, dass GM2AP einen dreifachen Komplex mit dem GM2 Gangliosid und HexA bildet. Diese Komplexbildung ist transient und benötigt die α -Untereinheit des heterodimeren Enzyms um eine Interaktion dessen mit dem Aktivator zu gewährleisten. Des Weiteren postulieren Yadao *et al.* die Existenz zweier unabhängiger Bindungsdomänen des Aktivators, eine für das Substrat und eine für die HexA, da Aktivator und HexA unabhängig von einer GM2-Präsenz miteinander interagieren. Die Untersuchungen bestätigen also die Vermutung, dass der Aktivator ein bivalentes Protein ist, das unabhängig voneinander befähigt ist Substrat und Enzym zu binden um dabei einen Dreifachkomplex zu bilden.

Seine Funktion als Substrat-spezifischer Co-Faktor für HexA während des GM2-Gangliosid-Abbaus ist einzigartig und kann von keinem der vier Saposine übernommen werden.^[226] Trotzdem begünstigt Saposin B, welches relativ unspezifisch ist und eine Detergenz-ähnliche Funktionsweise besitzt, die stimulatorische Aktivität von GM2AP bezüglich der GalNAc-Spaltung von GM2 signifikant. Diese Tatsache, dass die GM2-Hydrolyse nicht effizient durch eines der vier Saposine stimuliert werden kann, und dass in der Typ AB Gangliosidose eine Defizienz des GM2-Aktivators in eine schwere und letztlich tödliche zerebrale Akkumulation von GM2 resultiert, macht die physiologische Bedeutung des Aktivatorproteins für den Abbau von GM2 *in vivo* deutlich.^[415]

Neben seiner essentiellen Funktion als nicht-enzymatischer Co-Faktor beim Gangliosidabbau liegt dem GM2AP ebenfalls eine Rolle als Transportprotein inne.^[57] *In vitro* konnte nachgewiesen werden, dass GM2AP ein weites Spektrum an Lipiden, wie Glykolipide, Ganglioside und zumindest ein Phosphoacylglycerol, bindet, solubilisiert und zwischen Liposomen transferiert. Es zeigte sich, dass eine Änderung des pH-Wertes Einfluss auf die Transport-Rate hatte, was suggeriert, dass GM2AP als genereller intra- und / oder interzelluläres Lipid-Transport-Protein *in vivo* dient.^[226, 300]

Der intrazelluläre Haupttransportweg für lysosomale Proteine (welche, wie HexA, keine Transmembrandomäne besitzen) läuft über den Mannose-6-Phosphat Rezeptor (MPR).

Wie andere lysosomale (und sezernierte) Proteine wird GM2AP als prepro-Polypeptid synthetisiert, wobei die Pre-Sequenz richtungsweisend für eine Synthese im endoplasmatischen Retikulum (ER) ist.^[226, 300] An ausgewählten Asn-X-Ser/Thr-Stellen findet eine Glykosylierung des monomeren GM2AP statt.^[300, 462] Im Anschluss an die

Glykosylierung kann eine Markierung eines oder mehrerer der Oligosaccharide mit hohem Mannose-Anteil durch Phosphate folgen. Neben Signalpeptiden dient die (M-6-P-) Glykosylierung nun dem intrazellulären Transport (Proteintargeting) zum Lysosom.^[38, 463] Der endgültige Vollzug des endosomal-lysosomalen Weges (Biosynthetische Route) wird durch die Interaktion mit einem MPR (Kation-abhängigen (CD)/Kation-unabhängigen Rezeptor (CI)) im trans-Golgi realisiert. Einem Teil der M6P-haltigen lysosomalen Proteine versagen jedoch dabei mit einem der MPRs zu interagieren und werden sezerniert. Aufgrund der Lokalisierung des CI-MPR auf Plasmamembranen ist ein „Zurückerobern“ von M6P-haltigen Proteinen aus extrazellulären Flüssigkeiten, gefolgt von ihrem Transport zu Lysosomen möglich (Endozytische Route).^[226] Neben dem M6P-abhängigen Proteintargeting ins Lysosom konnte ein alternativer M6P-unabhängiger Weg für Saposine und den GM2AP demonstriert werden.^[300, 301] GM2AP ohne Mannose-6-Phosphat-Kennung werden nicht über die biosynthetische oder endozytische Route ins Lysosom dirigiert, sondern von der Zelle sezerniert. In einer Funktion als GSL-Transportprotein beschleunigt der Aktivator somit Endozytose und lysosomalen Abbau der GSLs. Folglich mag der Aktivator eine wichtige Kontrollfunktion bezüglich Regulation von Menge und Typ der GSLs auf Zelloberflächen haben. Neuere Studien haben einen neuen Sortillin-medierten Mechanismus des lysosomalen „Sorting“ und „Trafficking“ enthüllt. Dieser Mechanismus konnte für Prosaposin und GM2AP demonstriert werden.^[197]

Die Transferkapazitäten von Aktivatorproteinen sind wesentlich für das Beladen von Lipid-Antigenen auf Immunorezeptoren der CD1-Familie um die Präsentation der AGs gegenüber T-Lymphozyten zu realisieren.^[174, 229] Es liegen Berichte vor, in denen die 3-dimensionale Struktur von Protein-Lipid-Komplexen zwischen humanem CD1b und 2 Lipiden, nämlich Phosphatidylinositol und Gangliosid GM2 ^[101], und zwischen CD1a und Sulfatiden^[436] nachgewiesen werden konnte.

Ein weitere in vivo Funktion des Kohlenhydrat-unabhängig-sezernierten Aktivators ist die Bindung von Lipiden wie Phosphatidylcholin und PAF (Platelet-activating Factor) und die Inhibition derer Aktivitäten.^[299] Die PAF-stimulierte Freisetzung von intrazellulären Ca²⁺-Pools durch humane Neutrophile wird durch GM2AP gehemmt.

1.3.2. Das GM2-Gangliosid und sein Abbau durch die HexA

Der lysosomale Abbau von GSLs hat einen sequentiellen Verlauf, der mit der schrittweisen Freisetzung von Monosaccharid-Einheiten vom nicht-reduzierten Ende der Oligosaccharidkette beginnt.^[480] Das schrittweise Spalten der hydrophilen Kopfgruppen der GSLs führt letztendlich zur Generation von Sphingosin, Fettsäuren, Monosacchariden,

Einleitung

Sialinsäuren, und Sulfaten, so wie Ceramid. Diese finalen Abbauprodukte sind in der Lage das Lysosom zu verlassen.

Das GM2-Gangliosid besitzt einen einzelnen Acetylneuraminsäurerest und ist charakterisiert durch die drei Monosaccharide Glucose, Galaktose und N-Acetylgalactosamin, welche das GM2-Aktivator-spezifische GM2-Epitop bilden. Durch Abspaltung des N-Acetylgalactosamins (GalNAc) wird GM2 zu GM3 abgebaut. (Abb.8)

Der Abbau von GM2 findet im Lysosom durch eine spezifische Glykosidase, nämlich der β -Hexoaminidase statt. Es gibt 3 Isoformen der β -Hexoaminidase, wobei jedoch nur das HexA Isozyme, welches aus α - und β -Untereinheiten besteht, in der Lage ist GM2 zu hydrolysieren. α - und β -Untereinheit unterscheiden sich durch ihre Substratspezifität; während nur die α -Untereinheit ein aktives Zentrum für die GM2-Hydrolyse besitzt, können beiden Untereinheiten, α und β , die Hydrolyse von GM2 unterstützen.^[226]

In Folge dessen benötigt die Hexoaminidase den sogenannten GM2-Aktivator zur erfolgreichen GM2-Hydrolyse. HexA kann Glykolipid-Substrate auf Membranoberflächen nur spalten, wenn sie weit genug in die wässrige Phase hinaus ragen. In Abwesenheit von Detergenzien, welche in der Lage sind Lipide zu solubilisieren, sind GSLs mit kurzen Kohlenhydratketten nicht ausreichend zugänglich für Wasser-lösliche Hydrolasen, die sich in Abwesenheit der Membran-störenden Aktivatorproteine im Lysosol befinden.^[407, 408]

Das Bedürfnis nach einem Protein-Co-Faktor für die Hydrolyse von GM2 durch HexA wurde 1973 erstmals festgestellt.

GM2A besitzt ein 8-strängiges anti-paralleles β -Faltblatt, welches den Rahmen für einen großräumigen becherförmigen Hohlraum, der mit hydrophoben Seitenketten gesäumt ist, bildet. Die Form und Größe dieses β -Bechers ist passend für die Bindung der 18-Kohlenstoffatomkette des Ceramid-Rückrates (Sphingosin). Das Vorhandensein eines solchen Hohlraumes erklärt die hohe Affinität von GM2AP gegenüber gewissen Gangliosiden.^[409] Um die enzymatische Reaktion zu erleichtern, bildet GM2AP einen Komplex mit GM2, wobei dessen hydrophile Kopfgruppe auf der Proteinoberfläche für die HexA zugänglich bleibt und der Lipidteil innerhalb der hydrophoben Tasche sequestriert wird.

Darüber hinaus zeigt das Schema, dass zunächst der Aktivator an das Membranständige GM2-Gangliosid bindet, es von der Membran löst und erst dann HexA dazukommt. (Abb.9) Bis dato ist jedoch nicht gänzlich geklärt, ob die Katalyse des GM2-Abbaus an der Membran oder im Lysosol stattfindet. Durch Anbindung von HexA mittels der α -Untereinheit und deren Interaktion mit den terminalen Zuckereinheiten (GalNAc und NeuAc, s.o.) wird ein funktioneller transienter Komplex gebildet, der zur Entstehung des GM3 Gangliosides führt.^[412]

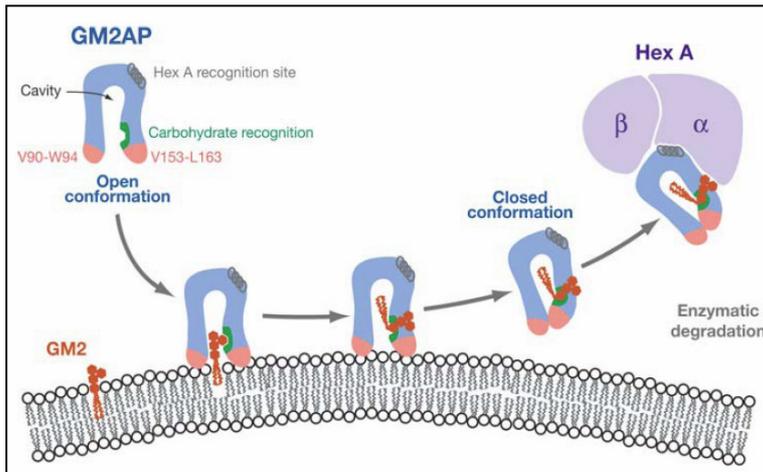


Abbildung 10:
Schematische Darstellung
der GM2-Aktivator-
stimulierten Hydrolyse
des GM2-Gangliosids
durch humane β -
Hexosaminidase A

(Quelle: Kolter T, Sandhoff K. Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. Annu Rev Cell Dev Biol. 2005;21:81-103. Review.)

1.3.3. Lysosomale Speicherkrankheiten (LSDs)

Nun gibt es jedoch eine Vielzahl lysosomaler Stoffwechselerkrankungen, in denen der Abbau von Makromolekülen, wie z.B. Lipiden, blockiert ist. Sphingolipidosen bilden eine Untergruppe LSDs, deren zugrundeliegenden vererbten genetischen Defekte mit Prozessen des Gangliosid-Abbaus interferieren oder diesen selbst betreffen.^[290] Mutationen in Genen, welche für Proteine kodieren, die im lysosomalen Abbau von Sphingolipiden involviert sind, sind autosomal rezessiv vererbt mit Ausnahme von Morbus Fabry.^[71] Entsprechend der streng-sequentiellen Stoffwechselfade der GSLs im Menschen wurden Defekte für fast jeden Schritt des Abbaus dieser Lipide beschrieben.^[443]

Sphingolipidosen weisen einen hohen Grad phänotypischer Variabilität auf.^[110] Einsetzen, Entwicklung und Symptome variieren zwischen Sphingolipidosen und auch drastisch innerhalb ein und der selben Krankheit.

Ein Faktor, der die Pathogenese der Krankheit bestimmt ist das Zelltyp-spezifische Muster der GSL-Expression. Lipidspeicherung in Lipidose-Patienten tritt besonders in Zellen und Organen auf, in denen das jeweilige Lipidsubstrat des defekten Abbausystems hauptsächlich synthetisiert oder durch Phagozytose aufgenommen wird. So werden komplexe Ganglioside hauptsächlich in Nervenzellen geformt mit der Konsequenz, dass eine Änderung des Katabolismus dieser Glykolipide anfänglich zur Schädigung des ZNS führt. Ceramid ist ein essentieller Bestandteil der Haut. Entsprechend weisen Patienten mit vollständigem Verlust der Glucosylceramide- β -Glucosidase-Aktivität einen schweren Haut-Phänotypen auf.^[470] Galactosylceramid und Sulfatide sind charakteristische Myelin-Lipide. Folglich zeigen sich in Morbus Krabbe und der MLD die Myelin-bildenden Zellen am stärksten betroffen. Alternativ präsentiert Morbus Gaucher ein Beispiel, bei dem eher die Aufnahme als die endogene Synthese des entsprechenden Lipids zu einer

Einleitung

Manifestation in Makrophagen führt, da diese große Mengen an Sphingolipiden phagozytieren.^[175]

Neben der Zelltyp-spezifischen Expression von Sphingolipiden, ist ein zweiter wichtiger Faktor die verbleibende Aktivität des defekten Enzyms in vielen, aber nicht allen LSDs. Beginn und Verlauf der Speicherkrankheit wird so zum Teil bestimmt.^[58, 200] Ein (fast) vollständiger Verlust der katabolischen Aktivitäten resultiert in fatale infantile Formen der Speicherkrankheiten. Allel-Mutationen, welche Proteine mit einer gewissen Restaktivität produzieren, haben die Folge, dass sich die Krankheit in die Länge zieht. Diese klinischen Formen werden zumeist als späte infantile, juvenile oder chronische Krankheiten beschrieben, die eine große Spannweite klinischer Symptomatologie aufweisen.^[314]

Bei den GM2-Gangliosidosen kommt es zu einer Akkumulation von hauptsächlich GM2 ^[485], dessen genetische Grundlage auf Mutationen von entweder *hexa*, *hexb* oder *gm2a* basiert. Entsprechend des betroffenen Gens werden 3 Krankheiten unterschieden; kommt es zu einem Defekt von *hexa* oder *hexb*, welche für die α - bzw. β -Untereinheiten der Hexoaminidase kodieren kommt es zum Ausbruch von Morbus Tay-Sachs bzw. Morbus Sandhoff, in der das Isozym HexB (β/β) ebenfalls defizient ist. Ein vererbter Defekt im GM2-Aktivatorprotein-kodierenden Gen hat den AB Variant der GM2-Gangliosidosen zur Folge.

Die Symptome der Tay-Sachs-Erkrankung wurden erstmals 1881 von dem britischen Augenarzt Tay beschrieben, der über einen Fall von infantiler amaurotischer Idiotie berichtete. Ein typischer Befund bei der Untersuchung des Augenhintergrundes ist der sog. „kirschrote Fleck“ in der Retina, der sowohl bei M. Tay-Sachs als auch bei M. Sandhoff beobachtet wird. Die klassische Erkrankung ist durch das Auftreten neurologischer Symptome im frühen Kindesalter charakterisiert; motorische Fertigkeiten und Sehvermögen gehen verloren und Makrozephalie und neurologische Störungen schreiten fort, bis der Tod eintritt. In juvenile Verlaufsformen treten motorische Störungen später auf. Sie sind charakterisiert durch eine fortschreitende Demenz im ersten Lebensjahrzehnt. Eine chronische bzw. adulte Verlaufsform fällt durch Abnormitäten in Gang und Körperhaltung der Patienten auf. Mit fortschreitendem Alter treten neurologische Symptome, wie spinale Muskelatrophie und Psychosen, in den Vordergrund. Das Sehvermögen und die Intelligenz sind aber nicht eingeschränkt und Patienten können ein Alter von vierzig Jahren erreichen. Das klinische und pathologische Bild von Morbus Sandhoff und AB Variant entspricht weitgehend dem der Tay-Sachs'schen Erkrankung; Organomegalie und Knochendeformationen treten zusätzlich bei der Sandhoff'schen Erkrankung auf und Symptome beim AB Variant treten leicht verzögert

ein.^[173]

Einhergehend mit einem neurodegenerativen Krankheitsverlauf kommt es bei allen GSL- und Gangliosid-LSDs zu Entzündungsreaktionen. Überschüssige Lipide werden in kausalen Zusammenhang mit der Generation proinflammatorischer Immunantworten, welche die Aktivierung des Mikroglia/Makrophagen-Systems mit sich zieht, gebracht. Als Folge der Produktion proinflammatorischer Zytokine kommt es zur Schädigung des ZNS.^[421] *Ex vivo* aktivieren Ganglioside Mikroglia dazu die pro-inflammatorischen Mediatoren Stickstoffmonoxid und TNF- α zu produzieren.^[288] Andererseits supprimieren Ganglioside eine TLR-induzierte Expression pro-inflammatorischer Zytokine.^[340]

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Dendritische Zellen sind bekannt dafür die potentesten Antigen-präsentierenden Zellen zu sein mit der einzigartigen Fähigkeit ruhende naive T-Zellen zu stimulieren und primäre Immunantworten zu initiieren.^[34] Vielversprechende Ergebnisse aus Vakzinierungsstudien in Tiermodellen und die Entwicklung von Protokollen um eine ausreichende Menge humaner DCs für die klinische Anwendung zu generieren hat zu Versuchen geführt die Umsetzbarkeit und Effektivität dieser Methode in Patienten im Kontext von Phase I/II klinischen Studien zu verifizieren.

In Bezug auf eine klinische Aktivität von DCs in Krebspatienten konnte nur in einer Minderheit von Patienten eine objektive klinische Antwort nachgewiesen werden, was indiziert, dass Patienten mit malignen Tumoren in fortgeschrittenen Entwicklungsstadien wahrscheinlich keine Vorteile durch diese Herangehensweise haben. Diese Schlussfolgerung findet Bestärkung durch eine klinische Studie der Phase III an Patienten mit Stadium IV Melanomen in der es missglückte zu demonstrieren, dass die DC-Administration einen gesteigerten Nutzen gegenüber der Standardchemotherapie hat.^[13, 323]

Es ist bekannt, dass Tumore immunsuppressive Faktoren synthetisieren und sezernieren^[291], und dass die Präsenz einer großen Tumorlast mit einer schwachen Auswirkung jeglicher aktiver Immuntherapie in Korrelation steht. Ganglioside, die von Tumoren abgestoßen werden, gehören mit zu diesen immunsuppressiven Faktoren.^[457] Ganglioside üben eine signifikante Hemmung auf die Kapazität von APCs eine protektive T-Zell-Antwort zu initiieren aus.^[41, 344] Es konnte nachgewiesen werden, dass Gangliosid GD1a, welches auch in hoher Konzentration von Tumorzellen sezerniert wird, eine LPS-stimulierte Reifung von humanen dendritischen Zellen verhindert.^[339]

Aufgrund der kumulierenden Beweise über immunregulatorische Funktionen von Gangliosiden einhergehend mit der zentralen Bedeutung von DCs in Immunantworten und

dem Nachweis eines besonderen Expressionsmusters des GM2-Gangliosides während der Differenzierung Monozyten-abstammender Dendritischer Zellen, wurde der Metabolismus des GM2-Gangliosides Gegenstand der Untersuchungen in dieser Arbeit.

Da durch die Charakterisierung der LSDs die Sensibilität des GM2-Metabolismus gegenüber Veränderungen deutlich wurde, einhergehend mit der Demonstration gravierender physiologischer Folgen mit fatalem Ausgang, stellt dieses System einen möglichen Angriffspunkt zur Beeinflussung intrinsischer DC-Kapazitäten dar mit dem Ziel eine Optimierung von DC-Funktionen hinsichtlich einer Anwendung in der Tumorthherapie zu erreichen.

Vor diesem Hintergrund wurde im Rahmen dieser Arbeit einerseits die Hemmung der Hexoaminidase durch einen chemischen Inhibitor herbeigeführt und andererseits die Expression des GM2-Aktivatorproteins als Co-Faktor während der GM2-Hydrolyse durch Elektrotransfektion mit einer spezifischen siRNA verhindert.

Ziel der durchgeführten Untersuchungen war die Erforschung der Auswirkungen auf Morphologie, Funktion und Immunogenität von DCs, die aus Monozyten generiert wurden und wahlweise durch Stimulation mit LPS zur Reifung induziert wurden.

Veränderungen des CD-Expressionsmusters auf der Oberfläche von DCs, sowie die Auswirkungen auf die Lipidzusammensetzung in der Zellmembran wurden analysiert bzw. über eine Kollaboration gemeinsam aufgedeckt. Veränderungen der Phagozytose- und Migrationsfähigkeiten, sowie die allostimulatorische Kapazität reifer DCs gegenüber T-Lymphozyten als APC-Schlüsselfunktionen wurden ebenfalls eruiert. Darüber hinaus konzentrierte sich ein Großteil dieser Arbeit auf die Auswirkungen auf das Zytokinsekretionsprofil von (LPS-gereiften) DCs und die Untersuchung der molekularbiologischen Grundlagen (MAPKs und Transkriptionsfaktoren NF- κ B, IRFs) der phänotypischen Veränderungen.

2. Material

2.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>
15ml / 50ml Zentrifugenröhrchen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
25cm ² / 75cm ² Zellkulturflaschen	BD Biosciences Europe, Erembodegem, B
96-well Zellkulturplatten Cellstar® (655180)	Greiner bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Allegra® X-15R Zentrifuge	Beckman Coulter®, Krefeld, DE
Autoclav : Varioklav® Dampfsterilisator	HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim, DE
Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Combitips plus (2,5ml ; 5ml ; 25ml)	Eppendorf AG, Hamburg ; DE
Costar™ Sterile Disposable Reagent Reservoirs (50ml)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Eppendorf Research® plus (Multichannel)	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Filter-Pipettenspitzen, premium surface (10µl, 100µl, 200µl, 1000 µl)	nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe, DE
Heracell™ 240 CO ₂ Inkubator	Thermo Scientific, Langenselbold, DE
Herasafe™ Class II Sterilbank, KSP 18	Thermo Scientific, Langenselbold, DE
IKA MTS2 Microtiter-Schüttler	ProfiLab24 GmbH, Bernau, DE
ImageQuant LAS 4000	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, DE
MicroBeta FilterMate-96 Harvester	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
MicroTouch® Nitrile puderfreie Handschuhe	Ansell Healthcare, Brüssel, B
MicroWell™ 96well-Platte PolySorp™, Nunc-Immuno™	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Mini – PROTEAN® II Electrophoresis System	BioRad Laboratories GmbH, München, DE
Mini-Spin®	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Multipette® Stream	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Neon® Transfection System	Life technologies GmbH, Darmstadt, DE
Olympus CKX41 microscope	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, DE
Parafilm® M	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA
PowerPac™ Basic Power Supply	BioRad Laboratories GmbH, München, DE
Protran™ BA83 Nitrocellulose membrane	GE Healthcare/Whatman GmbH, Dassel, DE
SAROGOLD Cling film	FORA SAROGOLD GmbH, Rorschacherberg, CH
Serological Pipettes CELLSTAR® (2ml, 5ml, 10ml, 25ml, 50ml)	Greiner bio-one Northamerica, Inc., Monroe, NC, USA
Stericup® Steritop™ Vacuumdriven filtration systems	Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
Synergy™ 2 Microplate Reader	BioTek, Bad Firedrichshall, DE
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Transferpipette (Pasteurpipette)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Vortex-Genie® 2	Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA
Wallac MicroBeta® TriLux	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Wasserbad	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, DE
Whatman® 3MM Chromatographie-Papier	Whatman® International Ltd., Maidstone, GB

2.2. Chemikalien und Lösungsmittel

Alle aufgeführten Chemikalien und Lösungsmittel wurden in "pro analysis" Qualität verwendet und über AppliChem (Darmstadt), Biomol (Hamburg), Biozym (Hess. Oldendorf), Carl Roth (Karlsruhe), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Serva (Heidelberg) oder Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.) bezogen.

(³ H) Thymidine	Isopropanol
1,4 Dithiothreitol (DTT)	Kaliumchlorid (KCl)
30% Acrylamide – Bisacrylamide	Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)
Agarose	Methanol (MetOH)
Ammoniumacetat (NH ₄ Ac)	Milchpulver
Ammoniumpersulfate (APS)	NatriumAzide (NaAzid)
Aprotinin	Natriumchlorid (NaCl)
ATX Ponceau S red staining solution	Natriumdesoxycholat
Bromophenolblau	Natriumdodecylsulfat (SDS)
BSA	Natriumhydroxid (NaOH) 0,1N
Coomassie Brilliant Blue R250	NP-40
Dimethylsulfoxid (DMSO)	PMSF
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Ponceau S
EDTA 0,5 M	Propidiumiodid (PI)
EGTA 0,5 M	Salzsäure (HCl) 1N
Essigsäure (AcOH)	Schwefelsäure (H ₂ SO ₄) 2N
Ethanol (EtOH)	TEMED
Ethidiumbromid (EtBr)	Tetramethylbenzidin
FCS/FBS	Tris
FITC-Dextran	Trypanblau
Glycerin >99,0% (GC)	Tween® 20
Glycine	Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)
HEPES	β-Mercaptoethanol
IGEPAL CA-630	

Material & Methoden

2.3. Kit Systeme

DreamTaq Green PCR Mastermix: DreamTaq DNA polymerase (5U/μl), 2x DreamTaq Green Puffer, 4 mM MgCl ₂ , dNTPs (0,4 mM per dNTP)	Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA
DuoSet® ELISA Development System (human IL-6, IL-10, IL-12p70, Mip1α, TNF-α, RANTES): Capture Antibody, Detection Antibody, Standard, Streptavidin-HRP, Reagent Diluent (1% BSA in PBS, pH 7.2-7.4), Substrate Solution (Reagent A + Reagent B)	R&D Systems, Wiesbaden, DE
GM2 Ganglioside Activator (GM2A) ELISA Kit: Pre-coated, ready to use 96-well strip plate, Standard; Standards Diluent; Detection Reagent A/B; Assay Diluent A/B; TMB Substrat; Stop Solution; Wash Buffer	antibodies-online GmbH, Aachen, DE
MACS: LS Columns; Quadro MACS magnet; CD14 MicroBeads, human; MACS-buffer (DPBS, pH7,2 + 0,5% MACS BSA Stock Solution + 2mM EDTA) MACS™ Rinsing Solution; MACS® BSA Stock Solution	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE
Neon® Transfection System: 100μl reaction tips, electrolytic buffer E2, resuspension buffer R, electroporation tubes	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE
PCR clean-up Gel Extraction NucleoSpin® Extract II Kit: NT Puffer; NT3 Puffer; NE Puffer; NucleoSpin® Extract II columns; NucleoSpin® collecting tubes (2ml)	Macherey-Nagel, Düren, DE
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Bonn, DE
Pierce™ Bovine Serum Albumin Standard, fraction V (2mg/mL)	Thermo Fisher Scientific, Bonn, DE
Qiagen RNeasy Mini Kit: RLT-Puffer; RPE-Puffer; RW1-Puffer; Rneasy Mini-Säule	Qiagen, Hilden, DE
Superscript™ cDNA Synthesis Kit: Superscript-RT; RT-Puffer; Oligo-dt-Primer; dNTP-Mix (10mM); MgCl ₂ ; DTT (0,1M); RNase-Out	Invitrogen, Karlsruhe, DE
SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate	ThermoFisher Scientific, Bonn, DE
TMB Substrate Reagent Set BD OptEIA™: Color Reagent A, Color Reagent B)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA

Material & Methoden

2.4. Enzyme und Marker, Zytokine, Chemokine etc.

1 kb Plus DNA Ladder	Fermentas Life Sciences, Vilnius, LT
100 bp DNA Ladder, Ready-Load	Invitrogen, Karlsruhe, DE
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas Life Sciences, Vilnius, LT
(Z)-Pugnac	Tocris Bioscience, R&D Systems, Wiesbaden, DE
Gm-CSF	Berlex Laboratories Inc., Wayne, NJ, USA
IL-4	R & D Systems, Wiesbaden, DE
LPS	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, DE
Mip-3β	R & D Systems, Wiesbaden, DE
Halt™ Phosphatase Inhibitor Cocktail	Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA

2.5. Antikörper für Western Blotting

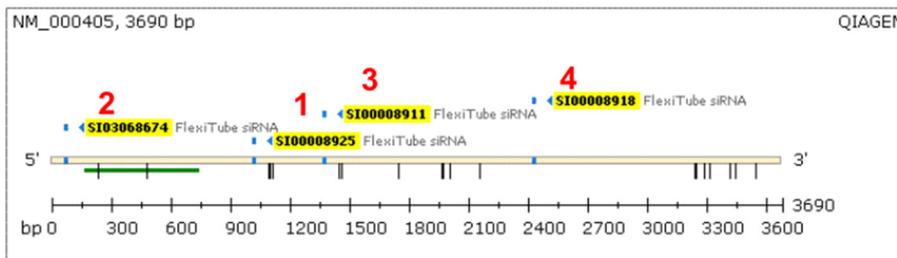
Antikörper für Zellysate	Antikörper für Kernextrakte	Alle verwendeten Antikörper wurden entweder bei abcam Inc. (Cambridge, MA, USA), Santa Cruz Biotechnology Inc. (Heidelberg, DE), Epitomics (Burlingame, CA, USA) oder Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA) gekauft.
anti-GM2A	Anti-c-REL	
Anti-pp38	Anti-IRF3	
anti-pERK1 / pERK2	Anti-IRF7	
anti-pMEK1/2	PU.1	
Anti-pJNK	Anti-RelB	
anti-Raf-1	Anti- IRF8	
anti-HexB	NFκB p50	
anti-Acid Ceramidase		
anti-HexA	Kojugierte Sekundäre Antikörper	
Anti-Phospho-SAPK/JNK	Anti-mouse AP	
Anti-c-JUN	Anti-goat AP	
anti-Sphingomyelinase	Anti-rabbit AP	
anti-GBA (Glucocerebrosidase)		
Anti-GAPDH		

2.6. Antikörper für die Durchflusszytometrie

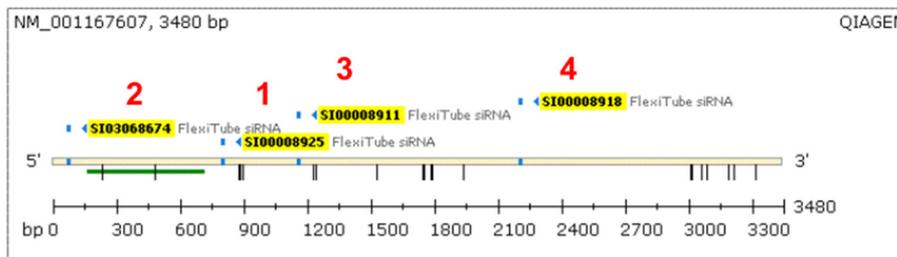
Spezifität	Konjugat	Hersteller
Maus IgG - Isotypkontrolle	PE/FITC	Beckman Coulter Co./Immunotech, Marseille, F
CD1a; CD3; CD14; CD19; CD40; CD54; CD80; CD83; CD86 CD206; CD209; HLA-DR	PE/FITC	Beckman Coulter Co./Immunotech, Marseille, F
CD197 (CCR7)	FITC	R & D Systems, Wiesbaden

2.7. siRNAs and Oligonukleotide (Primer)

Name	Sequenz	Hersteller	Anwendung
GM2A Fwd. Primer	CCA CAG ACC TTG CAG TTA ACT C	MWG	Amplifikation von Transkriptvarianten 1 und 2 , RNA
GM2A Rev. Primer	TTT CAG TGA GGG TAG TGG AC	MWG	Amplifikation von Transkriptvarianten 1 und 2, RNA
B2-M Fwd. Primer	GGG TTT CAT CCA TCC GAC AT	biomers	Positivkontrolle; Amplifikation von β 2-Mikroglobulin
B2-M Rev. Primer	GAT GCT GCT TAC ATG TCT CGA	biomers	Positivkontrolle; Amplifikation von β 2-Mikroglobulin
GM2A-siRNA siRNA1: Hs_GM2A_3 siRNA2: Hs_GM2A_5 siRNA3: Hs_GM2A_1 siRNA4: Hs_GM2A_2	GeneSolution siRNA (Cat. No. 1027416) AAG AGC CTC GTT CAT TTC CAA CAG CTT CTT TGC GTA ACC AAT CAG GGC CTA GCA AGA GAC TTA CAC CCT GTT ACA TCA TAA CAA	Qiagen	gm2a Gene Silencing
FlexiTube Control siRNA	scramble	Qiagen	Negativkontrolle
Silencer® Select GAPDH-siRNA	cat# 4390850	Ambion	Postivkontrolle
ns-FICo-siRNA 3'-AlexaFluor488	AAT TCT CCG AAC GTG TCA CGT	Qiagen	Elektrotransfektionskontrolle



Homo sapiens GM2A, transcript variant 1, mRNA



Homo sapiens GM2A, transcript variant 2, mRNA

Material & Methoden

2.8. Kultivierung von Monozyten-abstammenden Dendritischen Zellen

Name & Zusammensetzung	Hersteller
Buffy Coats (Blutkonserven) zur Gewinnung von PBMCs und Monozyten	freiwillige Spender, Uniklinikum Bonn, DE
X-VIVO™ 20	LONZA, Verviers, B
RPMI Medium 1640(1x) + GlutaMAX™-I (2 g/l NaHCO ₃ 10 mM Hepes, 2 mM L-Glutamin) + (5% oder 10%) Hitze-inaktiviertes FBS (fetal bovine serum) + 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin	Gibco® Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE
PBS Dulbecco	Invitrogen Gibco™, Darmstadt, DE
Biocoll Separating Solution	Biochrom AG, Berlin, DE

2.9. Häufig verwendete Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
Blocking Lösung	Entweder 5 % Milchpulver oder 5% BSA; 0,1 % Tween; ad. 1x TBS
SDS-Laufpuffer (1x)	25 mM Tris ; 192 mM Glycine ; 1% SDS
Transferpuffer/Blotpuffer (1x)	25 mM Tris ; 192 mM Glycine ; 0,05% SDS; 20% MetOH
3x Probenpuffer	180 mM Tris-HCl pH 6.8; 6 % SDS; 0,001 % Bromphenolblau; 28 % Glycerin; 100 mM DTT
RIPA Lysepuffer; pH 8,3	1% Igepal CA-630; 0,5% Na-Desoxycholat; 0,1% SDS; 2mM EDTA; 2µg/ml Aprotinin; 1mM PMSF; 10 µl/ml (100x) Halt™ Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific); ad. 1x PBS
1x PBS für ELISA	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; pH7,2-7,4 (0,2 µm filtered)
Puffer A für Zellkernextrakte	0,2M HEPES pH7,5; 1M KC; 0,5M EDTA; 50mM EGTA; ad. ddH ₂ O + 1mM DTT; 0,5mM PMSF
Puffer C für Zellkernextrakte	20mM HEPES pH7,9; 0,4M NaCl ; 1mM EDTA ; 1mM EGTA ; ad. ddH ₂ O + 1mM DTT ; 1mM PMSF
1x TAE ; pH 8.0	1 mM EDTA , 40 mM Tris; 13mM Essigsäure
Western Blot Waschlösung 1x TBS (T 0,1%); pH 7.2	150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (+ 0,1 % TWEEN®)
TE Puffer; pH 8.0	10 mM Tris-HCl ; 1mM EDTA

3. Methoden

3.1. Extraktion von humanen PBMCs und Isolation von humanen Monozyten aus Vollblut durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

Mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation ist es möglich PBMCs aus Vollblut zu extrahieren. Nach der Zentrifugation erhält man ein Lymphozytenkonzentrat, welches als "Buffy Coat" bezeichnet wird.

Ficoll ist ein hydrophiles Polysaccharid mit einer spezifischen Dichte von 1,077 g/ml wenn Hypaque (Diatrizoate) zugegeben wurde. Lymphozyten und Monozyten (PBMC) besitzen eine geringere Dichte; dementsprechend akkumulieren sie in der Interphase zwischen Plasma (inkl. Thrombozyten) und Ficoll-Hypaque. Im Gegensatz dazu ist die Dichte von Erythrozyten und polymorphnuklearen Zellen höher als die von Ficoll-Hypaque. Als Folge dessen setzen sich die Zellen am Grund ab und bilden ein dunkelrot gefärbtes Zellsediment (Abb.: 11).

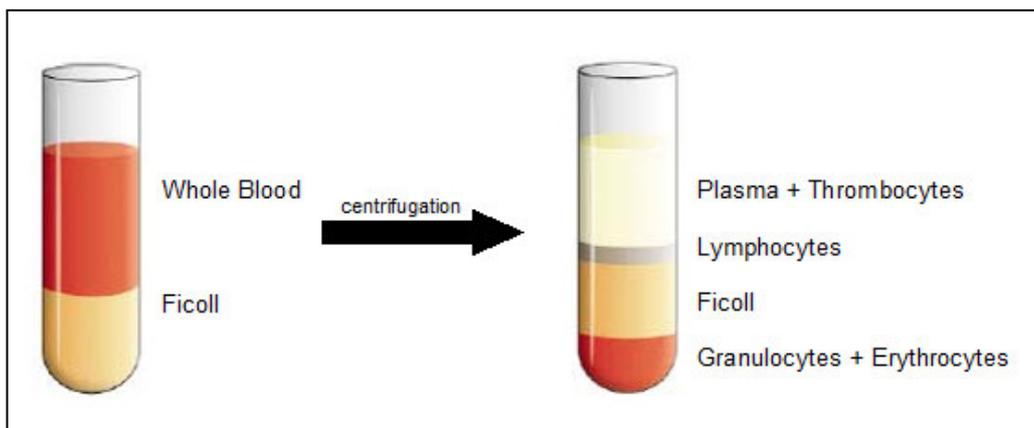


Abbildung 11:
Verteilung der zellulären Blutbestandteile nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

Zunächst wurden auf den Grund von 6 kanonischen Röhren jeweils 12ml Ficoll vorgelegt; im Anschluss wurden gleiche Volumina (ca. 30ml) von 1:4 PBS-verdünntem Vollblut langsam darüber geschichtet.

Nach einer Zentrifugation von 18 Minuten bei 1800rpm haben sich Buffy Coats an der Plasma-Ficoll Interphase gebildet und dunkelrote Pellets aus Granulozyten und Erythrozyten auf dem Boden der kanonischen Röhren angesammelt. Ungefähr. 2/3 des Überstandes wurde abpipettiert und verworfen. Mittels einer Pasteurpipette wurden die 6 Buffy Coats vorsichtig abgenommen und gleichmäßig auf 4 neue Röhren verteilt.

Nach zwei aufeinanderfolgenden Waschschrritten mit PBS, wurden die extrahierten PBMCs in 40ml X-VIVO20 Medium resuspendiert.

Nach der Zellzahlbestimmung (s. 3.5.) wurden die Zellen entweder in einem MLR (s. 3.8.) verwendet oder nochmals durch immunnomagnetische Zelleperation (MACS) (s. 3.4.) aufgetrennt ; aber für die Generation von DCs aus Monozyten wurden 1×10^8 Zellen/10ml X-VIVO20 Medium in einer 75cm^2 Zellkulturflasche ausgesät und für 2 Stunden bei 37°C and 5% CO_2 inkubiert. Das Prinzip basiert darauf, dass Monozyten die Fähigkeit haben am Flaschenboden zu adherieren während Lymphozyten in Suspension bleiben. Durch Aspiration des Mediums und zwei sukzessiven PBS-Waschschritten wurden Debris und jegliche Zellen, ausgenommen der adherenten Monozyten, gewaschen. Die Monozyten wurden dann in 10ml FBS-ergänzttem RPMI Medium/ 75cm^2 Zellkulturflasche at 37°C and 5% CO_2 kultiviert.

3.2. Generation von Monozyten-abstammenden Dendritischen Zellen

Die Monozyten aus 3.1. wurden in FBS-ergänzttem RPMI Medium für 7 Tage bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. An jedem 2. Tag (Tag 0, 2, 4, 6) wurden die Zellen mit Interleukin 4 (20 ng/ml) und GM-CSF (100 ng/ml) stimuliert um ihre Differenzierung zu dendritischen Zellen zu induzieren. Um eine Ausreifung der generierten dendritischen Zellen herbeizuführen wurde in den entsprechenden Fällen den Zellen eine einmalige Dosis LPS (100 ng/ml) an Tag 6 zugeführt.

3.3. Inhibition der β -Hexoaminidase A während der DC-Generation



Abbildung 12:
Chemische Strukturformel
von (Z)-Pugnac
(Q:Sigma Aldrich)

Mit Hilfe eines chemischen Inhibitors, welcher spezifisch für das GM2 Gangliosid-abbauende Enzym β -Hexoaminidase A ist, wurde der Gangliosidmetabolismus der dendritischen Zellen manipuliert.

Neben seines inhibitorischen Effekts auf dieses Enzym, blockiert er darüber hinaus eine andere neutrale Hexoaminidase, nämlich *O*-GlcNAc- β -*N*-acetylglucosaminidase (*O*-GlcNAcase). Sie ist verantwortlich für die Abspaltung von *O*-GlcNAc (*O*-linked-beta-*N*-acetylglucosamine).

Der Inhibitor „*O*-(2-Acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino-*Z*-*N*-phenylcarbamate“ (IUPAC Name) wird als Feststoff durch Tocris Bioscience unter dem Handelsnamen (Z)-Pugnac vertrieben. Er ist in DMSO ab einer Konzentration von 100mM löslich. Zur Durchführung der Experimente wurden die in Abb.13 aufgeführten Konzentrationen wie in der Grafik dargestellt angewandt.

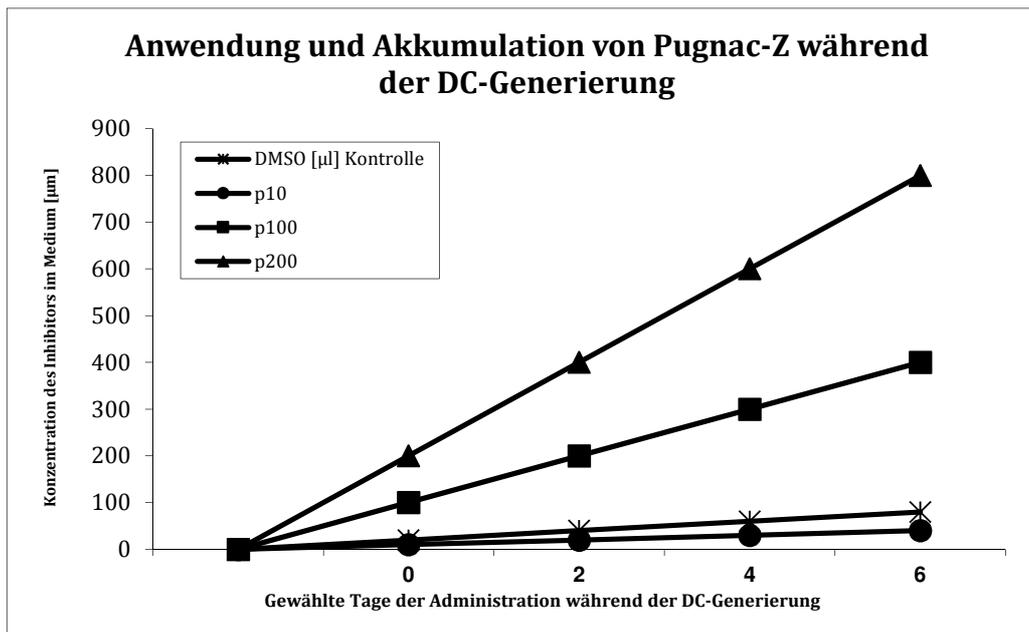


Abbildung 13:
Anwendung und Akkumulation von PUGNac-Z im Medium während der DC-Generierung

3.4. Positive Selektion von CD_{14}^{+} Monozyten durch MACS

MACS ist eine patentierte Technologie basierend auf der Anwendung von superparamagnetischen Partikeln. Diese Partikel sind an hochspezifische Antikörper konjugiert, welche ein gewisses Antigen auf der Oberfläche der jeweiligen Zelle erkennen und binden. Als Folge dessen werden Zielzellen, welche das spezifische Antigen auf ihrer Zelloberfläche exprimieren durch die entsprechenden MicroBeads markiert und in einem magnetischen Feld zurückgehalten.

Die magnetisch aktivierte Zellsortierung wurde in Übereinstimmung mit den Herstellerinstruktionen durchgeführt.

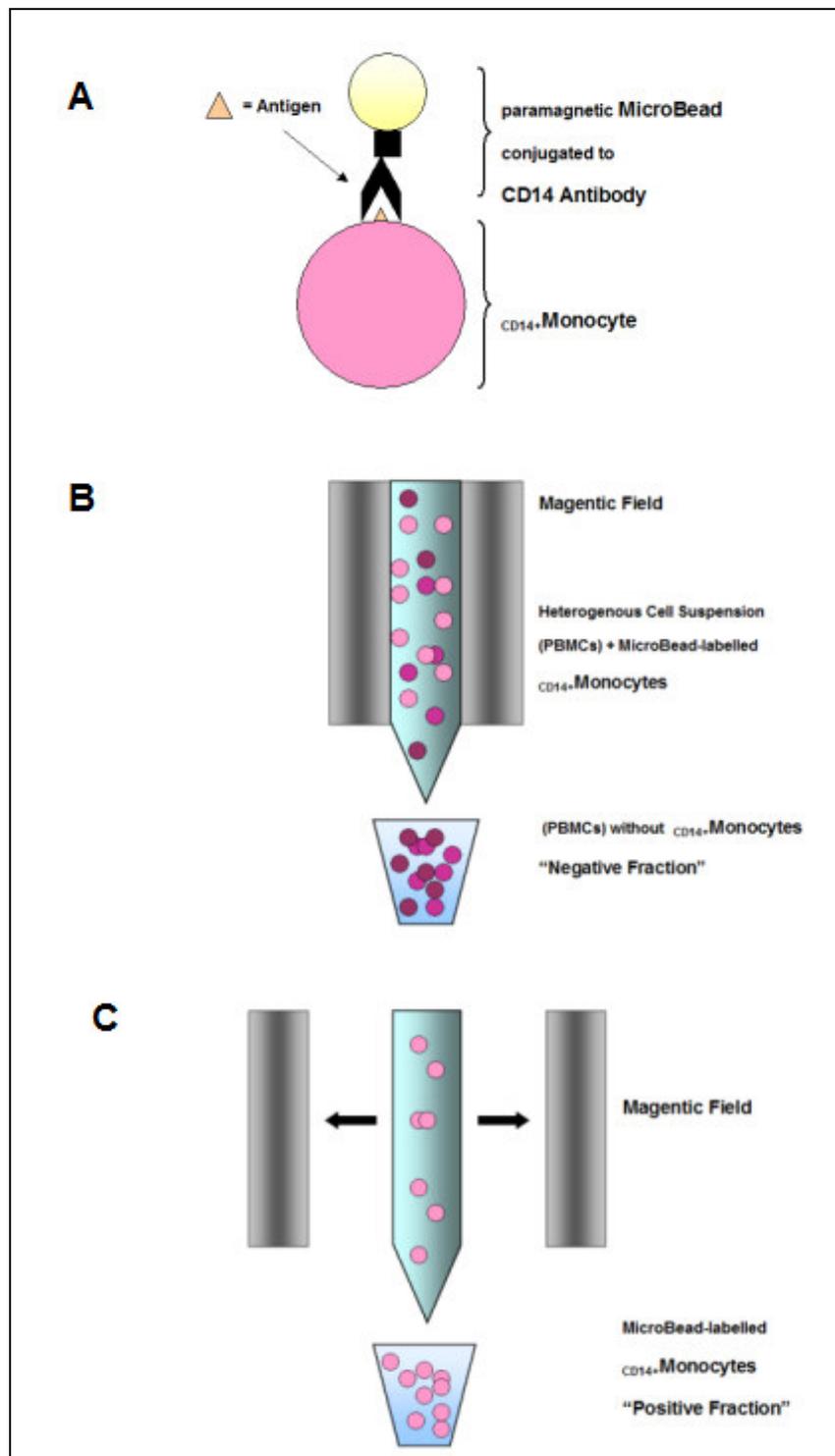


Abbildung 14:
Schematische Darstellung der immunomagnetischen Zellseparation

Nach der in Kapitel 3.1. beschriebenen Dichtegradientenzentrifugation, wurde die immunomagnetische Zellseparation mit humanen CD_{14} Antikörper-konjugierten MicroBeads zur positiven Selektion von CD_{14}^{+} Monozyten aus PBMCs angewandt.

Die PBMCs wurden gezählt, mit MACS Puffer gewaschen und anschließend in 100 μ l einer 4:1(80 μ l/20 μ l) - MACS Puffer/MicroBeads Mischung pro 1×10^7 Zellen aufgenommen. Nach 15-minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Zellen mit 1-2 ml MACS Puffer / 1×10^7 Zellen erneut gewaschen. Nach vollständiger Aspiration des Überstandes wurde das Zellpellet in 500 μ l MACS Puffer/ 1×10^8 Zellen resuspendiert.

Zur magnetischen Separation wurden LS Säulen, welche eine Matrix aus ferromagnetischen Sphären enthält, angewandt. Wenn diese in ein magnetisches Feld gesetzt wird, (QuadroMACS™ Separator) amplifizieren die Sphären es um ein 10,000-faches, und induzieren folglich einen hohen Gradienten in der Säule. Vor dem Beladen muss die Säule vorbereitet werden durch Spülen mit 3 ml MACS Puffer. Nachdem die heterogene Zellsuspension auf die Säule gebracht wurde und diese dann passiert hat folgten 3 sukzessiven Waschschritten mit 3 ml MACS Puffer. Nur CD_{14} positive Zellen werden in der Säule zurückgehalten während alle anderen Zellen passieren können und sich im Effluent wiederfinden. Die Säule wurde dann vom Separator entfernt und über einem neuen Sammelgefäß platziert. 5ml MACS Puffer wurden auf die Säule pipettiert und die Fraktion der magnetisch markierten Zellen wird durch festes Stoßen des Kolbens in die Säule herausgespült. Um den Erfolg der Methode zu verifizieren, wurde eine Probe aus dem Effluent und der markierten Fraktion zur FACS Analyse verwendet.

Tabelle 2: FACS-Panel zur Verifizierung des Erfolgs der immunomagnetischen Zellseparation

FITC	PE
Mouse IgG	Mouse IgG
CD14	HLA-DR
CD3	CD19

3.5. Lebendzellzahlbestimmung mittels Trypanblau

Trypanblau ist ein unverzichtbarer Farbstoff. Die Reaktivität von Trypanblau basiert auf der Tatsache dass das Chromophor negativ geladen ist und nicht mit der Zelle interagiert bevor die Membran nicht geschädigt wurde. Folglich sind alle Zellen, welche den Farbstoff ausschließen lebendig.

Die Zählungen wurden mit Hilfe eines konfokalen Mikroskopes ausgeführt. PBMCs aus Vollblut können bequem in einer 1:30 Verdünnung in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt werden. Hierzu wurde eine 1:10 Vorverdünnung mit 10 μ l Zellsuspension 10 μ l

Trypanblau und 80µl PBS angelegt. 50 µl dieser Mischung wurden weiter mit 100µl PBS verdünnt um die 1:30 Verdünnung zu erhalten.

Zählungen die während dieser These durchgeführt wurden lagen in einem Verdünnungsrahmen von 1:2 bis 1:50. Üblicherweise werden 2-4 große Quadrate gezählt um eine durchschnittliche Zellzahl zu bestimmen. Zur Berechnung der tatsächlichen Zellzahl wird die folgende Formel angewandt.

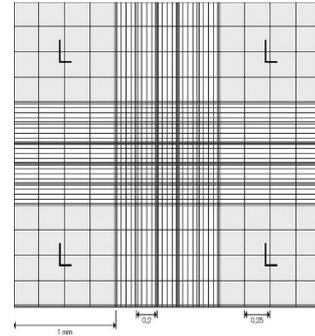


Abbildung 15:
Neubauer Zählkammer;
L= 1 großes Quadrat

Durchschnittliche Zellzahl x Verdünnungsfaktor x Volumen x 10^4 =

(Beispiel für Buffy Coats: # x 30 x 40 x 10^4 = ###)

3.6. Elektrotransfektion von dendritischen Zellen mittels siRNA

Die RNA-Interferenz ist ein natürlicher (Abwehr-)Mechanismus von Eukaryoten. So kann beispielsweise doppelsträngige Viren-RNA, wie sie in eukaryotischen Organismen nicht vorzufinden ist, erkannt und eliminiert werden. Zudem ist RNAi ein post-transkriptioneller Mechanismus der Genregulation. Durch den Einsatz von synthetisch hergestellten kleinen, doppelsträngigen RNA-Molekülen – „small interfering RNAs“ (siRNA) – konnte dieser Mechanismus zur Sequenz-spezifischen Inaktivierung von Genen herangezogen werden.

Die Elektroporation eignet sich hinsichtlich der Einschleusung der siRNA indem sie durch Erzeugung eines elektrischen Feldes in Form eines kurzen Pulses eine vorübergehende Permeabilisierung der Zellmembran erzeugt.

Zur Durchführung der Elektrotransfektion wurde das Neon® Transfection System von Invitrogen benutzt. Die Methode wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. $mDCs$ wurden, wie unter 3.1. und 3.2. beschrieben, kultiviert, geerntet und mit PBS gewaschen. Nach anschließender Zellzählung wurden pro Probe mindestens 2×10^6 (optimalerweise 4×10^6) $mDCs$ pelletiert und in 100µl Resuspension Buffer R resuspendiert. Zu je 2×10^6 unreifen oder LPS-gereiften $mDCs$ wurden 100nM siRNA pipettiert. Die Zellsuspension wurde in 100µl-Neon® Tipps, die eine vergoldete Elektrode enthalten, aufgenommen. Nach Platzierung im Gerät wurden die Zellen bei 1450V, 20ms und 1 Puls elektroporiert. Sofort wurden elektrotransfezierte $mDCs$ in Zellkulturflaschen mit vorgewärmten RPMI-Medium (+IL-4; +GM-CSF; ohne FCS) überführt um für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 weiterkultiviert zu werden. Als Kontrollen dienten $mDCs$, welche mit GAPDH-spezifischer siRNA (Positivkontrolle) bzw. Non-Silencing „Scramble“-siRNA (Negativkontrolle) transfeziert wurden.

Zur Etablierung des aufgeführten Protokolls wurden zudem siRNA-Konzentrationen zwischen 10-200nM getestet, die Geräteeinstellung für die Elektroporation variiert, der Zeitpunkt der LPS-Zugabe, so wie der Einfluss von unterschiedlichen Medien und Kultivierungszeiträumen nach der Elektrotransfektion.

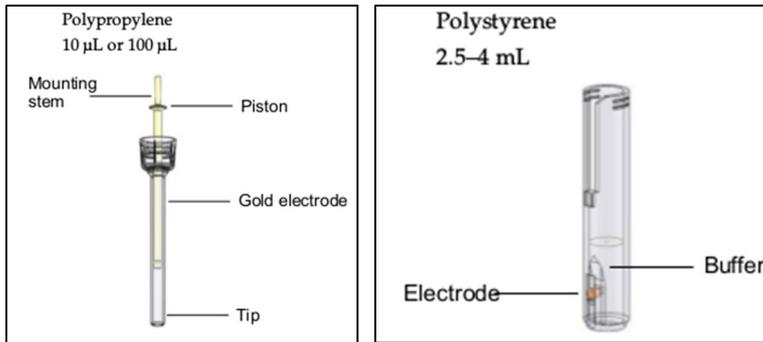


Abbildung 16:
Neon® Tipp mit vergoldeter Elektrode (links);
Neon® Röhrchen mit Elektrode (rechts)
(Q: Invitrogen)

3.7. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS) ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen, Peptiden und DNA. Das Prinzip ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten spezifischen Antikörpern durchgeführt wird (e.g. Proteine der CD-Klassifizierung). Zur Quantifizierung von DNA werden interkalierende Farbstoffe eingesetzt (e.g. Propidiumiodid).

Grundlage der Durchflusszytometrie ist eine (gefärbte) Einzelzellsuspension (oder andere lösliche Partikel), wobei diese einzeln einen fokussierten Laserstrahl (Argonlaser 488nm) passieren und das dabei erzeugte, charakteristische Streu- und Fluoreszenzlicht separat detektiert wird. Bei der Messung werden die Zellen durch eine Kapillare gesaugt und gelangen einzeln in die „Flow Cell“ (Durchflusszelle), in der sie durch Laserlicht angeregt werden.

Die Zellen streuen einen Teil des Lichts, welches mittels Detektoren (Photomultiplier) nachgewiesen wird. Abhängig von der Auswahl der Antikörper-gekoppelten Fluorophore können in einer Mehrfachfärbung verschiedene Marker, deren emittiertes Fluoreszenzlicht sich in der Wellenlänge unterscheidet, detektiert werden.

Anhand Fluorochrom-gekoppelter Antikörper lässt sich zum einen die Expressionsdichte der jeweiligen Zielstruktur auf einzelnen Zellen bestimmen und zum anderen der Anteil Fluoreszenz-positiver Zellen innerhalb der jeweiligen Probe (MFI/%). In Folge dessen lassen sich Rückschlüsse über Herkunft, Funktion, Differenzierungs- und Aktivierungsgrad schließen.

Die Menge des gestreuten Lichts korreliert mit der Größe der Zelle und mit ihrer Komplexität. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt vom Volumen der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = Sidewards Scatter) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, die von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und der Menge der Vesikel in einer Zelle beeinflusst wird. Zusammenfassend kann eine FACS-Analyse neben der Expression bestimmter Oberflächenmarker Aufschluss über Größe und zytoplasmatische Dichte von Zellen geben, und damit Informationen zu morphologischen Kriterien, mit denen man Aussagen über die Zugehörigkeit zu bestimmten Zellgruppen und die Homo- bzw. Heterogenität von Zellpopulationen treffen kann, geben.

3.7.1. Fluoreszenzmarkierung

Abhängig von Ihrem Reifestatus exprimieren dendritische Zellen verschiedene Oberflächenmoleküle unterschiedlich stark. Darüber hinaus hat jeder Zelltyp eine spezifisches Expressionsmuster bezüglich der Zusammensetzung der Oberflächenmoleküle, welches seine Identifizierung ermöglicht. Durch die Markierung mit FITC- oder PE-konjugierten Antikörpern mit anschließender Messung im Durchflusszytometer wurde die Expression und Zusammensetzung dieser Oberflächemoleküle bestimmt.

Zur erfolgreichen Durchführung werden wenigstens 2×10^5 Zellen/Probe gebraucht.

6 µl des jeweiligen PE-markierten Antikörpers und 6 µl des FITC-markierten Antikörpers werden in jedes Röhrchen vorgelegt. Jeder Versuchsansatz beinhaltet eine Isotypenkontrolle, welche als Negativkontrolle dient. Hierzu werden FITC- und PE-markierte Anti-Maus IgG in ein FACS-Röhrchen gegeben. Im Anschluss wird zu jedem Röhrchen die gewünschte Anzahl in 100 µl Isoflow-resuspendierter Zellen gegeben. Die Inkubationszeit beträgt 20 Minuten bei Zimmertemperatur im dunkeln. Danach wurden die Zellen mit 1ml Isoflow gewaschen (Zentrifugation: 5 Minuten; 3000rpm). Um die Messungen am Durchflusszytometer durchzuführen wurden die Antikörper-markierten Zellen dann wieder in 500 µl Isoflow aufgenommen.

3.7.2. Durchflusszytometrische-Vitalitätsbestimmung

Propidiumiodid ist ein fluoreszierender DNA-interkalierender Farbstoff, dessen Emissionsmaximum (590nm) sich beim Einlagern in die DNA verschiebt (FL2-Kanal: 535nm bzw. 617nm). Der Farbstoff kann die perforierte Zellmembran von toten Zellen, jedoch nicht die intakte Membran von lebenden Zellen durchdringen, wodurch eine

Bestimmung der Zellviabilität innerhalb einer Zellsuspension möglich ist. Eine Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose ist jedoch nicht möglich. Eine weitere durchflusszytometrische Anwendung von PI stellt die Messung des DNA-Gehaltes von Zellen dar. Dies wird vor allem zur Analyse des Zellzyklus oder zur Bestimmung von Polyploidie eingesetzt. Zur Durchführung der Vitalitätsbestimmung werden 1×10^5 Zellen in Isoflow resuspendiert, mit 10 μ l Propidiumjodid versetzt und im unmittelbarem Anschluss gemessen.

3.7.3. Migrationsassay

Die Migration ist ein intrinsisches Merkmal von reifen dendritischen Zellen. Nachdem sie ein Antigen aufgenommen haben migrieren DCs zu den sekundären lymphoiden Organen um T-Zellen das aufgenommene Antigen zu präsentieren. Auf diese Art und Weise induzieren sie eine Immunantwort der T-Zellen und bilden gleichzeitig den Link zwischen immanenter und adaptiver Immunantwort. Der Migrationversuch simuliert diese Situation durch Verwendung des Botenstoffes Mip-3 β , welcher die DC-Migration triggert. Mip-3 β , bzw. CCL19, ist ein Chemokin, welches an den CCR7-Rezeptor bindet. Mip-3 β wird von reifen dendritischen Zellen sezerniert und bindet an den CCR7-Rezeptor auf T-Zellen und vice versa.

Der Versuch wurde in 3fach Ansätzen durchgeführt. 1ml FBS-supplementiertes RPMI Medium wurde in jedes Well einer 24-Well Platte pipettiert. 4 μ l Mip-3 β wurden hinzugegeben um eine Konzentration von 100ng/ml zu erhalten. Im Anschluss wurden Transwells mit einer Porengröße von 8,0 μ m auf jedes Well gesetzt und mit 2×10^5 Zellen/1ml Medium gefüllt und für 3 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Transwells vorsichtig von den Wells entfernt und verworfen. Das Medium in den Wells, welches die migrierten DCs enthält wurde in FACS Röhrchen transferiert. Um alle migrierten Zellen zu erfassen, die noch im Well zurückgeblieben waren, wurden die Wells noch 2x mit PBS gewaschen.

Die Zellen wurden für 5min bei 1500rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde wird das DC-Pellet in 300 μ l Isoflow FACS-Puffer resuspendiert und die Zellzahl mittels Durchflusszytometer bestimmt.

3.7.4. Mannose Rezeptor (MR) - vermittelter Endozytose Assay

Im Hinblick auf Antigenaufnahme und Antigenpräsentation durch APCs stellt die Rezeptor-vermittelte Endozytose den wichtigsten Endozytosemechanismus dar. Sie wird durch spezielle Rezeptoren an der Zelloberfläche, die u.a. allgemeine Merkmale vieler Pathogene so wie bakterielle Zellwand Peptidoglykane erkennen, gesteuert. Das Binden eines Bakteriums zu diesen Rezeptoren stimuliert die dendritische Zelle das Pathogen zu verschlingen und es intrazellulär zu degradieren. Durch die Aktivierung reift die dendritische Zelle zu einer hoch effektiven Antigen-präsentierenden Zelle (APC), welche sich wiederum Veränderungen unterzieht die sie dazu ermächtigen T-Lymphozyten zu aktivieren. So findet man zum Beispiel auf unreifen dendritischen Zellen eine hohe Expression des Mannoserezeptors, welcher einen Hauptweg für die Endozytose von Dextran, einem bakteriellen Polysaccharid, ist. Im Gegensatz dazu verlieren gereifte DCs die MRs und somit ihre hochendozytischen Eigenschaften. Darüber hinaus fehlt es auch Monozyten an diesen Rezeptoren. Als Konsequenz, wird die Expression des MR als Differenzierungskennzeichen unreifer DC betrachtet, während Monozyten und reife DC diese Struktur nicht exprimieren.^[479]

So beruht das Prinzip des Phagozytoseassays auf der Anwendung von FITC-konjugiertem Dextran und dessen Aufnahme durch unreife dendritische Zellen.

Jedes FACS Röhrchen sollte 2×10^5 dendritische Zellen in 1000 μl Medium enthalten. 2 Röhrchen pro Probe wurden benötigt, Röhrchen A welches als Kontrolle diente und Röhrchen B. Die B-Röhrchen wurden für 1 bis 1,5 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 pre-inkubiert während die Kontrollröhrchen A bei 4°C in den Kühlschrank kamen. Da DCs nicht in der Kälte phagozytieren diente folglich jedes B-Röhrchen als Negativkontrolle. Nach der Pre-Inkubation wurden 8 μl FITC-Dextran zu jedem Röhrchen gegeben und entsprechend der Beschriftung nochmals 1 Stunde im Inkubator bzw. Kühlschrank inkubiert. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation bei 1200rpm, wurden die Zellen dann 3x mit Isoflow FACS-Puffer gewaschen und anschließend in 300 μl Isoflow aufgenommen und mittels Durchflusszytometer gemessen.

3.8. Gemischte Leukozytenreaktion (MLR)

Werden zwei Populationen allogener Lymphozyten gemischt, resultiert eine T-Zell-Proliferation, die man gemischte Leukozyten-Reaktion (MLR) nennt. Die Zelloberflächenantigene des Hauptgewebeverträglichkeitskomplexes (MHC) stellen die größten Stimuli dar. Humane PBMCs eines Spenders A werden mit aktivierten DCs eines humanen Spenders B inkubiert, die ihre eigenen Alloantigene präsentieren, und somit die

Proliferation alloreaktiver T-Zellen stimulieren.^[484] Die stimulatorische Fähigkeit der DC wird indirekt über die Proliferation der T-Zellen bestimmt. Dazu wird Tritium-markiertes Thymidin ([³H]Thymidin) in die neusynthetisierte DNA eingebaut welche somit quantifiziert werden kann und Rückschlüsse auf die Proliferationsrate der T-Zellen zulässt.

Zur Bestimmung der Proliferation von T-Zellen wurden 1×10^5 PBMCs /100 μ l Medium in jedes Well einer 96 Well Mikrotiterplatte gegeben und allein (Referenz) oder mit verschiedenen DC-Konzentrationen (5×10^4 , 1×10^4 , 1×10^3) kultiviert. Die jeweilige Konzentration an DCs wurde ebenfalls mit 100 μ l Medium in die entsprechenden Wells zu den PBMCs hinzu gegeben

Nach fünf Tagen wurden die Zellen mit [³H]Thymidin (1 μ Ci/Well) markiert und nach 16 h Inkubation gemessen. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert + SEM von vier Versuchen dargestellt. Die Zellen werden anschließend mit einem Zell-Harvester (Scatron) auf einen Sammelfilter geerntet. Das Sammelfilterpapier wird 30 min bei 60 °C getrocknet und die in die DNA eingebaute Radioaktivität mit Hilfe eines Radioaktivitäts-Scanners (Raytest) bestimmt. Die von den Zellen eingebaute Aktivität ist proportional der DNA-Synthese der Zellen während der Inkubationszeit.

3.9. Proteinbiochemische Methoden

3.9.1. Denaturierende Zellyse

Zur Herstellung von Zellysaten wurden Aliquots von mindestens 1×10^6 Zellen der entsprechenden Kulturen benötigt.

Die Zellen wurden zunächst geerntet und zweimal mit eiskaltem PBS (pH 7,0) gewaschen. Das Zellsediment wurde danach in eiskaltem RIPA-Puffer aufgenommen (5×10^6 Zellen/100 μ l) und 30 min auf Eis lysiert. Zur Verhinderung eines unerwünschten Proteinabbaus durch Proteasen und Phosphatasen im Lysat wurden entsprechende Inhibitoren frisch zum Lyse-Puffer hinzugegeben (s. 2. Material).

Zelltrümmer wurden dann 30 Minuten bei 20.000rpm und 4 °C abzentrifugiert. Die resultierenden Überstände wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und ein Aliquot (5 μ l) für die Proteinbestimmung entnommen. Die Lysate wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.9.2. Quantitative Proteinkonzentrationsbestimmung

Proteinbestimmungen wurden mit dem BCA Protein Assay Reagent Kit von Pierce Thermo Scientific durchgeführt. Diese Methode kombiniert die klassische Biuretreaktion mit einer

hochsensitiven, colorimetrischen Detektion mittels Bicinchoninsäure (BCA).^[348] Im ersten Schritt werden zweiwertige Kupferionen, die an die Peptidbindungen von Proteinen angelagert sind, im alkalischen Milieu zu einwertigen Kupferionen reduziert ($\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^{1+}$). Diese wiederum bilden in einem zweiten Schritt einen violetten Komplex mit BCA. Dieser wasserlösliche Komplex zeigt eine starke Absorption bei $\lambda = 562 \text{ nm}$, die mit zunehmender Proteinkonzentration über einen Bereich von 20 - 2000 $\mu\text{g/ml}$ linear ist. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe von BSA bekannter Konzentration hergestellt (s.Tab.3).

Tabelle 3: BSA-Standards zur Proteinkonzentrationsbestimmung

I	II	III	IV	V	VI
2 mg/ml	1,5 mg/ml	0,75 mg/ml	0,38 mg/ml	0,18 mg/ml	0,09 mg/ml

Die zu messenden Proben wurden 1:5 ($5\mu\text{l}+25\mu\text{l}$) in RIPA verdünnt, so dass der Extinktionswert im linearen Teil der Eichkurve lag. Je 10 μl dieser Verdünnungen bzw. der Standards wurden als doppelter Wert in die Kavitäten einer 96-Well Flachbodenplatte pipettiert. Zu je 10 μl von Standard, Probe und RIPA (Blank) wurden 200 μl des BCA-Reagenz (50 Teile Reagenz A + 1 Teil Reagenz B) pipettiert und 30 min lang bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei $\lambda = 562 \text{ nm}$ im Synergy™ 2 Microplate Reader (BIOTek) gemessen. Die Proteinkonzentration wurde nach linearer Regression unter Verwendung der Eichpunkte bestimmt.

3.9.3. Gewinnung von Zellkernextrakten

Zur Herstellung von Kernextrakten wurden die Zellen nach dem Ernten zweimal mit PBS gewaschen und anschließend gezählt. Im weiteren Versuchsverlauf wurden immer 1×10^6 Zellen pro Ansatz verwendet. Nach Zentrifugation (1500rpm, 5min, 4°C) wurde das gewonnene Zellpellet in 400 μl Puffer A resuspendiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde nach der Zugabe von 25 μl NP40 10s gevortext und dann 30s zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbliebene nukleäre Pellet wurde in 500 μl Puffer C resuspendiert und wiederum 15 Minuten auf Eis inkubiert und mehrere Male gevortext um eine vollständige Lösung des Pellets zu erwirken. Nach 5 Minuten Zentrifugation (1500 rpm, 4°C) wurde der Überstand, welcher das Kernextrakt bildet, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C gelagert.

3.9.4. Probenvorbereitung für SDS-PAGE

Der verwendete 3x Probenpuffer folgt einem modifizierten Rezept des Ladepuffers nach Laemmli.^[187] Zellysate wurden entsprechend im Verhältnis 3:1 verdünnt, während Zellkernextrakte 2:1 verdünnt wurden. Die Proben wurden für 5 Minuten bei 95°C denaturiert, kurz zentrifugiert und im Anschluss auf das Gel aufgetragen.

3.9.5. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)

Die SDS-PAGE ermöglicht unter Anwendung eines elektrischen Feldes die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres molekularen Gewichtes. Da viele verschiedene Proteine mit ähnlichem Molekulargewicht aufgrund ihrer Unterschiede bezüglich Sekundär-, Tertiär- und Quaternärstruktur unterschiedlich migrieren können, wird

Natriumdodecylsulfat (SDS), ein anionisches Detergent, in der SDS-PAGE verwendet um Proteine zu ihrer Primärstruktur zu reduzieren (linearisieren) und sie mit einer einheitlichen negativen Ladung zu ummanteln. Das Resultat ist, dass alle Proteine zur Anode migrieren da ihre eigene Ladung durch das SDS abgeschirmt wird.

Basierend auf dem siebenden Effekt der Gelmatrix wandern Proteine mit geringer Masse schneller im Gel als solche die eine größere Masse besitzen. Das Verhältnis von

Bisacrylamid zu Acrylamid, ebenso wie die Gesamtkonzentration beider

Komponenten, beeinflusst die Porengröße und Konsistenz des finalen Gels und als Konsequenz den Bereich der Proteingrößen die erfasst werden können. Acrylamid gemischt mit Bisacrylamid formt ein quervernetztes Polymernetzwerk wenn der

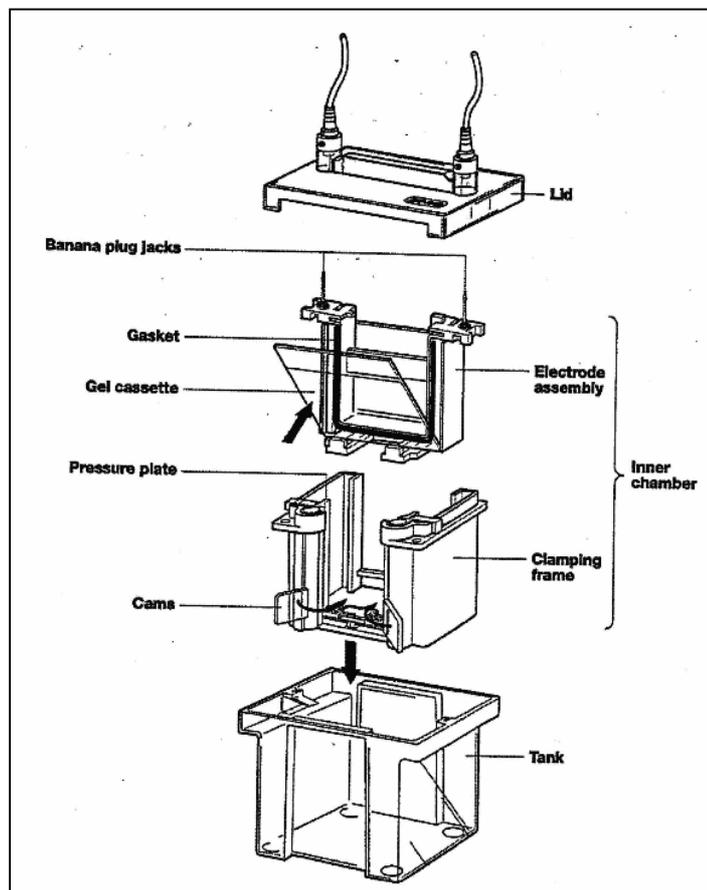


Abbildung 17:
Aufbau eines vertikalen Elektrophoresesystems

Material & Methoden

polymerisierende Stoff, APS, zugegeben wird. TEMED katalysiert die Polymerisationsreaktion durch Förderung der Produktion von freien Radikalen durch APS. Zugabe von Dithiothreitol (DTT) unterstützt den Effekt von SDS. DTT ist ein starkes Reduktionsmittel. Es zerstört die Proteinfaltung durch Reduktion der Disulfidbrückenbindungen, welche die Proteinstruktur stabilisieren.^[187]

Als erstes wurde die Elektrophoresevorrichtung mittels zwei sauberer Glasplatten und 2 100 mm Platzhaltern zusammen gesetzt. Die Platten, zusammen mit den Abstandshaltern wurden in eine Gelgießeinheit gesetzt und befestigt. (Abb. 17) Für die Experimente wurde ein diskontinuierliches Puffersystem in einem vertikalen System verwendet, in welchem Proteine erst in einem Sammelgel fokussiert werden und anschließend in einem Trenngeld separiert werden. Ein Trenngel von 12%, passend für denaturierte Proteine im Rahmen von 12-60 kDa (Sambrook), wurde hergestellt wie in Tab.5 beschrieben. Das Trenngel wurde zwischen die Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überlagert um eine unvollständige Polymerization zu verhindern, um Luftblasen an der Geloberfläche zu beseitigen und um zu versichern dass das Gel nicht austrocknet.

Tabelle 4: Rezeptur eines SDS-Gels mit 12%igem Trenngel und 5%igem Sammelgel

Komponenten	15 ml Trenngel (12%)	5 ml Sammelgel (5%)
Aq.dest	3,2 ml	3 ml
Tris - HCl	5,6 ml 1M; pH8.8	1 ml 2M; pH6.7
Acrylamide / Bis Solution, 37.5:1 (30%(w/v), 2.6%C	6 ml	1 ml
10% SDS Solution	150 µl	100 µl
APS 10%	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	5 µl

Nach Entfernen des Isopropanols wurde ein 5%iges Sammelgel auf das Trenngel gegossen (Tab.4). Der Kamm wurde eingesetzt und ins Gel getaucht um die Taschen zu bilden. Sobald das Gel vollständig polymerisiert hat wurde die Vorrichtung in eine senkrechte Kammer gesetzt, welche mit 1x SDS-Elektrophoresepuffer gefüllt wurde.

Im Anschluss wurde der Kamm entfernt und die Proben auf das Gel beladen. Als Marker wurde PageRuler™ Prestained Protein Ladder angewandt. Dieser Marker besitzt den Vorteil, dass die Proteine von definierter Größe in den Acrylamidgelen, ebenso wie auf den Blotting Membranen, als farbige Banden sichtbar sind.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 80mV (bis zu Erreichen der Sammel-/Trenngelgrenze der Lauffront) bzw. 120 mV und benötigte zwischen 1-2 Stunden.

3.9.6. Coomassie Brilliant Blue Färbung

Mittels des Farbstoffs Coomassie® Brilliant Blue G-250 können nahezu alle Proteine in einem Polyacrylamidgel unspezifisch angefärbt werden. In einem sauren Milieu bindet Coomassie an basische und hydrophobe Reste von Proteinen und färbt sie demzufolge intensiv blau.

Um die Gele zu färben wurden über Nacht bei RT in der Färbelösung (*1 g/L Coomassie® Brilliant Blue G-250; 40% EtOH/MetOH; 10% AcOH*) geschwenkt. Im Anschluss wurden sie in der Entfärbelösung (*40% EtOH; 10% AcOH*) geschwenkt bis nur noch die Linien der Proteinbanden blau gefärbt waren. Nach der Entfärbung folgte ein Waschgang mit ddH₂O und nachfolgender Digitalisierung.

3.9.7. Western Blotting (Immunoblot)

Der Western Blot ist eine analytische Methode um spezifische Proteine innerhalb eines Proteingemisches zu identifizieren und zu quantifizieren. Der spezifische Nachweis wird mittels Antigen-Antikörper-Reaktion erbracht und anhand ihrer Laufeigenschaften im Vergleich zu einem Proteinstandard werden die Proteine charakterisiert. Dementsprechend wird diese Technik auch als Immunoblotten bezeichnet.

Der Western Blot folgt unmittelbar der Gelelektrophorese, welche native oder denaturierte Proteine entsprechend der dreidimensionalen Proteinstruktur (native Elektrophorese) bzw. nach Länge des Polypeptides (denaturierende Elektrophorese) auftrennt. Westernblotting beinhaltet den Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine von einem Gel auf eine dünne Trägermembran, auf der spezifische Proteine innerhalb einer Mischung durch polyklonale (mehrere Epitope eines Proteins) oder monoklonale Antikörper, welche nur ein einzelnes Epitop spezifisch für das jeweilige Protein detektieren, sondiert werden.

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde die TankBlot Variante angewandt. Hierbei handelt es sich um ein vertikales System, welches Elektroden impliziert die in einer vertikalen Konfiguration angeordnet sind. In solch einem System werden Gel und Membran zwischen Puffer-getränktem Filterpapier, das als Ionen-Reservoir dient, eingeklemmt, welches wiederum mit Schwämmchen gepolstert ist und durch ein „Support grid“ zusammengehalten wird. Das zusammengehaltene Gel-Sandwich wird vertikal in den Tank parallel zu den Elektroden positioniert und in Transferpuffer getaucht. (Abb.18)

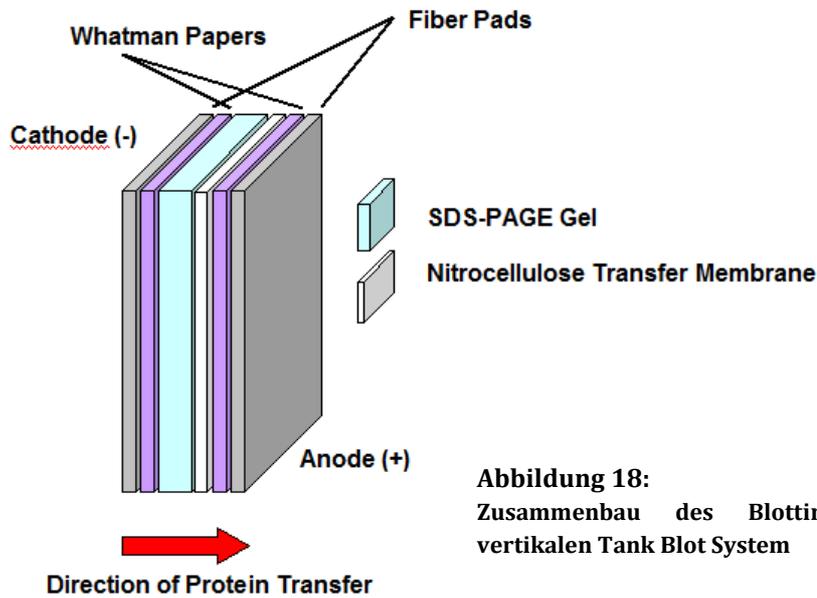


Abbildung 18:
Zusammenbau des Blotting Sandwiches im vertikalen Tank Blot System

Während des elektrophoretischen Transfers, migrieren negativ geladene Moleküle aus dem Gel raus und Richtung Positivelektrode, wobei sie sich auf der Membran deponieren. Das Binden von Proteinen an eine Membran basiert demnach auf hydrophoben Interaktionen so wie geladenen Interaktionen zwischen Membran und Proteinen. Für die Versuche dieser Arbeit wurde eine Nitrozellulose-Membran verwendet, welche zuvor im Blotpuffer äquilibriert wurde. Ebenso wurden die beiden Schwämmchen und 2 Whatman Filterpapiere im Puffer getränkt bevor sie wie oben beschrieben zusammengesetzt wurden. Der Transfer erfolgte bei 250 mA für 70 Minuten.

Nach vollständigem Blotten wurde die Membran für 1 Std bei RT in Blockierungslösung inkubiert um unspezifische Bindungen der Antikörper entgegenzuwirken. Abhängig vom Antikörper, der vorgesehen ist benutzt zu werden, wurden zum Blockieren entweder 5% BSA oder 5% Milchpulver eingesetzt. Der bestimmte Primär-Antikörper wurde dann in einer 1:2.000 Verdünnung zur Membran gegeben und über Nacht bei 4°C geschwenkt. Nach mehreren Waschschritten mit Waschlösung (1x TBS, 0,1% Tween-20) wurde der Sekundär-Antikörper 1:5.000 in Blockierlösung verdünnt, der Membran zugeführt und für 1h bei RT geschwenkt. Wiederum folgten Waschschrritte, zweimal mit TBS-T 0,1% und anschließend 2x mit TBS-Puffer um Tween-Reste zu entfernen, welche das Resultat negativ beeinflussen könnten.

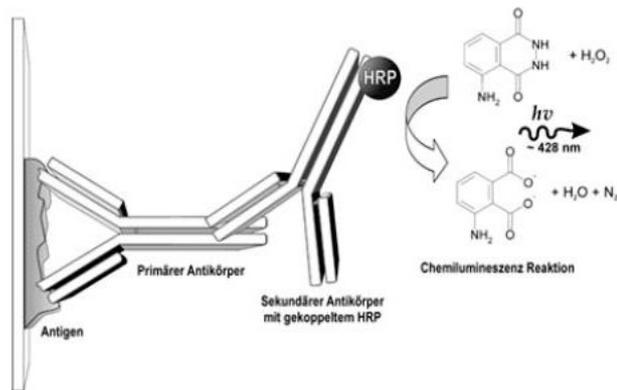


Abbildung 19:
Prinzip der Proteindetektion durch die kombinierte Bindung von Primär- und HRP-konjugiertem Sekundärantikörper an ein AG-Epitop bzw. an die FC-Region des Primär-AK. Außerdem dargestellt: die HRP-medierte Chemilumineszenz-Reaktion

Die Detektion des Protein-AK-AK-Komplexes wird durch das Enzym Merrettichperoxidase (*engl. Horseradish peroxidase; HRP*) ermöglicht welches an den Zweitantikörper gekoppelt ist. Die Nachweisreaktion (*engl. enhanced chemoluminescence reaction; ECL*) beinhaltet die Umsetzung des Substrates Luminol durch die HRP in die Emission von Chemilumineszenz, was nach einer bestimmten Expositionszeit (einige Sekunden bis Minuten) zur Schwärzung eines Röntgenfilms führt.

3.9.8. Ponceau S - Färbung

Nach erfolgtem Blotten von Proteinen (aus Lysaten und Zellkernextrakten) wird der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulose-Membranen durch eine reversible Färbung mit Ponceau S überprüft. Ponceau S ist ein roter Azofarbstoff, welcher unspezifisch alle Proteinbanden visulaisiert. Somit kann nicht nur der Tranfer der Proteine auf die Membran überprüft werden, sondern auch, ob eine gleichmäßige Beladung und erfolgreiche Auftrennung der Proteine vorliegt. Die Färbung der Proteinbanden wird durch kurzes Schwenken der Membran in der Färbelösung (Ponceau S 6mM; Essigsäure 1% in Aqua bidest.) erreicht. Die einzelnen Baden werden durch anschließendes Entfärben mittels Aqua bidest. sichtbar.

3.9.9. Enzyme-linked Immunosorbent Assay; ELISA

Zum Nachweis und zur Quantifizierung sezernerter Zytokine, Chemokine und des GM2-Aktivator Proteins in Kulturüberständen wurde der Sandwich-ELISA angewandt. Diese ELISA-Technik verwendet zwei Antikörper, die beide spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden. Jedoch erkennen und binden sie unterschiedliche Epitope des gleichen Antigens. Der erste Antikörper (*engl. capture antibody*) wird an eine feste Phase (96-well Mikrotiterplatte) gebunden und kann anschließend durch Inkubation mit dem Antigen an das entsprechende Epitop binden. Das Resultat ist ein AG-AK-Komplex, der am Boden der

Kavität haftet. In einem anschließenden Schritt wird der zweite Antikörper zur Detektion (*engl. detection antibody*) zugegeben, der ein anderes Epitop als der *Capture*-Antikörper erkennt. Folglich entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex; das Sandwich. (Abb. 20)

Zur Signalverstärkung inkludieren die verwendeten ELISAs biotinylierte Detektionsantikörper, welche an Streptavidin- bzw. im Falle des GM2A-ELISAs an Avidin-Konjugate gebunden werden. Diese Konjugate bestehen zum einen aus Streptavidin bzw. Avidin und zum anderen aus dem Reporterenzym Merretichperoxidase (HRP). Die HRP katalysiert die Umsetzung des chromogenen Substrats „TMB“, was zu einem messbaren Farbumschlag durch das entstehende Reaktionsprodukt führt.

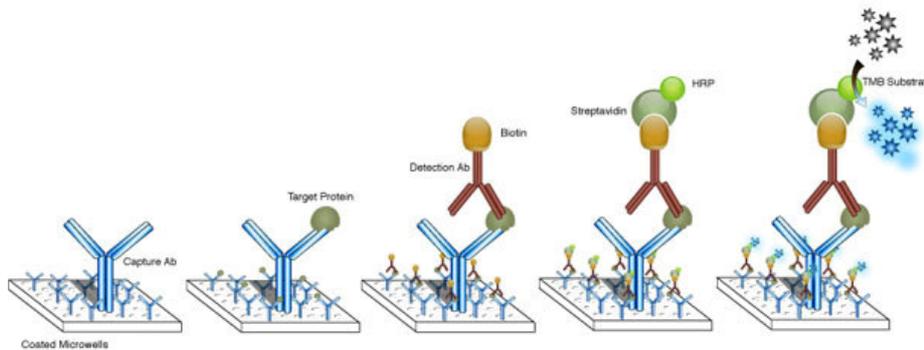


Abbildung 20 : Prinzip eines Sandwich-ELISAs (Q: epitomics)

Für die quantitativen Nachweise wird üblicherweise eine Serie mit bekannten Antigenkonzentrationen (*Standardreihe*), inklusive „Blanks“, hergestellt, um eine Kalibrierungskurve für das gemessene Signal (optische Extinktion, emittierte Intensität) zu erhalten. Anhand eines Vergleichs der ODs lassen sich die Konzentrationen des sezernierten Produktes in den Proben bestimmen.

Die Versuchsdurchführung wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

Für den GM2A-ELISA stellt der Hersteller 96-well Mikrotiterplatten bereit, deren Kavitäten schon mit dem „Capture“ Antikörper belegt wurden. Für die übrigen durchgeführten ELISAs ist eine Vorbereitung der Mikrotiterplatten notwendig. Hierzu wurde die 96-Well Mikrotiterplatte nach Beladung mit 100µl/Well des Capture AKs über Nacht bei RT inkubiert. Es folgten 3 sukzessive Waschschrte mit je 400µl Waschpuffer/Well um überschüssige, nicht-fixierte AKs zu entfernen. Im Anschluss an eine 1-stündige Inkubation (RT) mit je 300µl Reagent Diluent/Well erfolgt ein weiterer 3-facher Waschschrte.

In Abhängigkeit zur zu messenden Substanz wurden individuelle Verdünnungen der jeweiligen Proben, in denen die $mDCs$ vornehmlich mit LPS stimuliert wurden, hergestellt.

Material & Methoden

Die Verdünnungen wurden unter Verwendung des Reagent Diluents hergestellt. Das Flussdiagramm fasst die wesentlichen Schritte zur weiteren Durchführung zusammen. (Abb. 21)

R & D ELISAs		GM2A-ELISA			
100µl Probe bzw. Standard/Well	↓	100µl Probe bzw. Standard/Well	↓		
		2 Std, RT → Waschschrift		2 Std, 37°C → überschüssige Flüssigkeit entfernen (Kein Waschschrift)	
100µl Detection Antibody		2 Std, RT → Waschschrift		100µl Detection Reagent A	1 Std, 37°C → 4x 350µl 1x Wash Solution
100 µl Streptavidin-HRP		20 Min, RT, Dunkeln → Waschschrift		100µl Detection Reagent B	30 Min, 37°C → 5x 350µl 1x Wash Solution
100 µl Substrate Solution		20 Min, RT, Dunkeln		90 µl Substrate Solution	15-25Min, 37°C, Dunkeln
50 µl Stop Solution		50µl Stop Solution			

Abbildung 21:
Flussdiagramm zur Durchführung der Sandwich-ELISA

3.10. Lipidanalyse (in Kooperation mit der Abteilung von Prof. Dr. K. Sandhoff des Life & Medical Sciences Institute (LIMES) im Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn)

Metabolische Markierung von Zellen

Isolierte Monozyten und generierte $MDCs$ wurden in 25 cm²-Kulturflaschen wie unter 3.1. bzw. 3.2. beschrieben kultiviert. Vor Beginn der metabolischen Markierung wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für 72 h mit 1 µCi L-[3-14C] Serin (PerkinElmer)/ml Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch Typsinierung geerntet und die Pellets bei -20°C gelagert.

Lipidextraktion

Eingefrorenen Zellpellets wurden in 1 ml Wasser (bidest.) suspendiert und dreimal jeweils 30 s mit 10 s Pause unter Kühlung mit 120 W Ultraschall homogenisiert. Aus diesem Homogenat wurden Aliquots zur Protein- und Radioaktivitätsbestimmung

Material & Methoden

entnommen. Die Zellsuspension wurde mit 4 ml Methanol versetzt, in einem Vortexmixer gemischt und 15 min sonifiziert. Nach Zugabe von 3 ml Chloroform/Methanol/Wasser (bidest.) 10:5:1 (v/v/v) wurden die Lipide durch eine 24-stündige Inkubation bei 37°C extrahiert. Die ungelösten Zellreste wurden zuerst abzentrifugiert und der Überstand durch Filtration durch Watte gereinigt. Die restlichen Lipide im Schraubkappenglas wurden nach einer 5-minütigen Ultraschallbehandlung mit 2 ml Chloroform/Methanol 1:1 (v/v) heraus gespült und ebenfalls filtriert. Der Gesamtlipidextrakt wurde im Stickstoffstrom eingedampft. Das Eluat wurde im Stickstoffstrom eingeeengt.

Alkalische Methanolyse von Phospholipiden

Phospholipide wurden durch milde alkalische Methanolyse abgebaut. Dazu wurden die eingedampften Lipidextrakte in 1 ml Chloroform/Methanol 1:1 (v/v) aufgenommen, mit dem Vortexmixer gemixt, die Wand des Schraubkappenglases nochmals mit 1,5 ml abgespült. Anschließend wurde für 5 min eine Ultraschallbehandlung durchgeführt. Nach Zugabe von 62,5 µl 4 M Natronlauge wurden die Proben weitere 5 min im Ultraschallbad behandelt und dann 2 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Lösung wurde durch 10 µl Eisessig neutralisiert und unter Stickstoff eingedampft.

Entsalzung der verseiften Extrakte

Die Lipidlösungen wurden durch „reversed phase“ Chromatographie gereinigt (Williams und McCluer, 1980). Die mit 1,5 ml RP-18/Methanol-Suspension 1:1 (w/v) gefüllten Pasteurpipetten wurden zur Entfernung von unter 43 µm großen RP-18-Partikeln und zur Äquilibrierung folgenden Waschschritten unterzogen:

- 1 ml Methanol
- 2 ml Wasser (bidest. entgast)
- 1 ml Methanol
- 2 ml Chloroform/Methanol 1:1 (v/v)
- 1 ml Methanol
- 2 ml Chloroform/Methanol/Wasser (bidest.) (0,1 M KCl) 3:48:47 (v/v/v).

Die im Stickstoffstrom getrockneten Lipide wurden in 1 ml Methanol aufgenommen, 1 min ultrabeschallt und mit 1 ml 300 mM Ammoniumacetatlösung in Wasser (bidest.) versetzt. Diese Lösung wurde sofort auf die Säule gegeben. Das Probenglas wurde mit 1 ml 300 mM Ammoniumacetatlösung in Methanol/Wasser (bidest.) 1:1 (v/v) gewaschen, mit dem

Vortexmixer gemixt. Die restlichen Lipide im Probengefäß wurden mit 1 ml des gleichen Lösungsmittels von der Glaswand gespült und ebenfalls aufgetragen. Die hydrophilen Komponenten wurden mit 6 ml Wasser (bidest.) von den Säulchen eluiert. Zum Phasenabgleich wurde die Säule zuerst mit 0,4 ml Methanol versetzt und der Durchlauf verworfen. Nach Aufgabe von 0,6 ml Methanol eluiert man die Lipide mit 8 x 1 ml Chloroform/Methanol 1:1 (v/v). Das Eluat wurde unter Stickstoff eingedampft.

Trennung von anionischen und neutralen Lipiden mittels Anionen-Austausch-Chromatographie

Die Trennung von anionischen und ungeladenen Lipiden erfolgte mittels Anionenaustauschchromatographie auf DEAE-Sepharose A25. Die neutralen, nicht geladenen Lipide binden nicht an das Säulenmaterial und sind im Durchlauf enthalten. Während die anionischen geladene Lipide binden und erst durch Ammoniumacetat-Lösung eluiert werden.

Zunächst mußte die Chloridform der DEAE-Sepharose in die Acetatform überführt werden. Dazu wurde das Säulenmaterial auf einem Filterpapier in einem Büchnertrichter nacheinander mit Methanol und Wasser (bidest.) gewaschen. Anschließend wäscht man solange mit einer 1 M Ammoniumacetat-Lösung, bis kein Chlorid mehr im Durchlauf nachweisbar war. Für den Chlorid-Nachweis versetzt man den Durchlauf mit Silbernitrat-Lösung. Der entstehende weiße Niederschlag löst sich nach Zugabe von Salpetersäure auf, wenn die Lösung kein Chlorid mehr enthält.

Nach gründlichem Waschen des Säulenmaterials mit Methanol und Wasser (bidest.) lagert man die Acetatform als eine 1:1-Suspension in Methanol.

Zur Lipidtrennung wurde eine Pasteurpipette mit 1 ml DEAE-Sepharose-Suspension gefüllt und mit 3 ml Chloroform/Methanol/Wasser (bidest.) 3:7:1 (v/v/v) äquilibriert. Der Lipidextrakt wurde in 1 ml des gleichen Lösungsmittel aufgenommen, 1 min sonifiziert, auf die Säule gegeben und mit weiteren 5 ml Chloroform/Methanol/Wasser (bidest.) 3:7:1 (v/v/v) gespült. Das Eluat enthält die neutralen Lipide. Die anionischen Lipide wurden anschließend mit 8 ml Chloroform/Methanol/0,8 M wässrige Ammoniumacetat-Lösung 3:7:1 (v/v/v) eluiert. Die Eluate wurden unter Stickstoff eingedampft und anschließend wurde die anionische Fraktion wie vorher beschrieben entsalzt.

Trennung & Identifizierung der Lipide mittels eindimensionaler

Dünnschichtchromatographie

Die Lipideluat wurden in 1 ml Chloroform/Methanol 1:1 (v/v) gelöst, Je nach Versuch wurden entweder gleiche Mengen an Radioaktivität, Protein oder Trockengewichte

entnommen, in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und unter Stickstoff eingedampft. Danach wurden die Proben in 40 µl Chloroform/Methanol 1:1 (v/v) aufgenommen und mit dem Linomaten IV, oder bei radioaktiv markierten Proben mit feinen Glas-Kapillaren auf Dünnschichtchromatographie (TLC)-Kieselgelplatten oder HPTLC-Platten aufgetragen. Die Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden zuerst mit 25 µl und dann mit 10 µl Chloroform/Methanol 1:1 (v/v) nachgespült und die Extrakte aufgetragen. Die DC-Platten wurden im Vakuum über Kaliumhydroxid getrocknet.

Große TLC-Platten (20x20 cm) wurden in konventionelle, mit Filterpapier ausgekleidete Glaskammern chromatographiert. Alle Laufmittel wurden zur Äquilibration mindestens 1 h vor Beginn der Chromatographie in den Tank gegeben. HLTL-Platten wurden in einer Horizontalentwicklungskammer mit Kammersättigung chromatographiert. Vor dem Start wurden die HPTLC-Platten 15 min im gleichen Laufmittel äquilibriert.

Zur Trennung von verschiedenen Lipiden wurden folgende Laufmittelgemische verwendet (Mischungsverhältnisse sind in Volumenanteilen angegeben):

Neutrale Glykosphingolipide	Chloroform/Methanol/Wasser	60:25:4
Anionische Glykosphingolipide	Chloroform/Methanol/0,22% CaCl ₂	55:45:10

Die Detektion der metabolisch markierten Lipide erfolgte durch Visualisierung mittels eines Radioscanners.

3.11. Molekularbiologische Methoden

3.11.1. Isolierung von RNA

Zur Untersuchung der Expression verschiedener Gene auf transkriptioneller Ebene ist es notwendig die RNA aus der jeweiligen Zelle zu isolieren und zu quantifizieren.

Die Isolation erfolgt mittels des RNeasy Kits von Qiagen und entsprechend der Herstellerangaben. So wurde ein Zellpellet von 1×10^6 Zellen in 600 µl RLT-β-ME-Mischung (RLT-Puffer: β-mercapthoethanol; 100:1) resuspendiert und anschließend mit 600 µl 70% Ethanol durch mehrmaliges auf und abpipettieren vermischt. Dies führt zur Lyse der Zellen und macht sie RNA somit frei zugänglich.

In einem doppelt durchgeführten Schritt wurde das Gemisch auf eine Mini-Spin-Säule gegeben und bei 8000xg für 20 sec zentrifugiert. Hierbei bindet die RNA an die Anionen-Austauschsäule während sie von übrigen Bestandteilen aus dem Zellysate gereinigt wird. Der Durchfluss wurde verworfen und 700 µl RW1-Puffer wurden auf die Säule gegeben.

Anschließend wurde nach nochmaligem Zentrifugieren (8000xg; 20sec) wieder der Durchfluss verworfen.

Nachdem die Mini-Spin-Säule auf ein neues 2ml-Auffanggefäß gesetzt wurde, erfolgte ein Wascschritt mit 500 µl RPE-Puffer. Dieser wurde noch einmal wiederholt gefolgt von einem Zentrifugationsschritt um auch die letzten Reste des RPE-Puffers zu entfernen.

Im letzten Schritt wurde die RNA von der Säule eluiert. Dazu setzte man diese auf ein neues 1,5ml-Reaktionsgefäß und gibt 50µl DEPC-Wasser auf die Membran. Nach Zentrifugation wurde der Durchfluss erneut auf die Membran pipetiert und abermals zentrifugiert um eine möglichst hohe und genaue Ausbeute der aufgereinigten RNA zu erlangen. Die RNA-Konzentration kann wie unter 3.9.6. beschrieben ermittelt werden. Die RNA kann bei -80°C gelagert werden.

3.11.2. Generierung von cDNA (*engl. Reverse Transcription; RT-PCR*)

Die RT-PCR bietet die Möglichkeit Genexpression gezielt auf transkriptioneller Ebene nachzuweisen. In einem zweistufigen Prozess katalysieren Reverse Transkriptasen, welche RNA-abhängige DNA-Polymerasen sind, zunächst die Umschreibung von RNA in cDNA. Im Anschluss findet während der Polymerasekettenreaktion eine Amplifikation der cDNA durch thermostabile DNA-abhängige Polymerasen statt.

Unter Verwendung des Superscript™ First-Strand Synthesis Kit von Invitrogen wurde mittels der SuperScript™ II RT (50 U/µl) die cDNA-Synthese nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur cDNA-Synthese wurde 1µg aufgereinigte RNA als Template verwendet und zu einem Volumen von 8µl mit RNase-freiem DEPC-Wasser aufgefüllt.

Anschließend wurden Oligo-dt-Primer und ein Mix aus dNTPs der RNA zugeführt und für auf 65°C erhitzt um eine optimale Anlagerung der Primer zu erreichen. Nach 5 Minuten wurden die Reaktionsgefäße auf Eis gestellt.

Mastermix I (10µl/Reaktionsgefäß) :

8 µl RNA
1 µl Oligo-dt-Primer
1 µl dNTP-Mix

Annealing → 5min, 65°C

Mastermix II (10µl/Reaktionsgefäß) :

2 µl 10x RT-Puffer
4 µl 25 mM MgCl₂
2 µl 0,1 M DTT
1 µl RNase-OUT

Elongation → 50min, 50°C:
Denaturierung → 5min, 85°C

Ein zweiter Mastermix (s.o.) wurde vorbereitet und zu Mastermix I gegeben. Die cDNA-Synthese, bzw. Elongation, fand für 50 Minuten bei 50°C statt, gefolgt von einem 5-

minütigen Denaturierungsprozess der RT bei 85°C. Die gewonnene cDNA kann bei -20°C gelagert werden.

3.11.3. Polymerasekettenreaktion (engl. Polymerase chain reaction; PCR)

Für analytische und präperative Amplifikationen, wurde eine rekombinante Taq DNA Polymerase (Fermentas), welche ursprünglich von *Thermus aquaticus* isoliert wurde, verwendet. Wiederholte Zyklen aus Denaturierung, Anlagerung und Elongation ermöglichen die exponentielle Synthese einer bestimmten DNA-Sequenz. Die Reaktion verläuft automatisiert im *Mastercycler gradient* ab. Die Parameter werden für jede PCR-Reaktion eingestellt. Dies beinhaltet die Beachtung der Schmelztemperatur (T_m) der Oligonukleotide, Eigenschaften der Polymerase und Größe des Produkts. Dementsprechend wurde für unbekannte Primer-Paare eine Gradienten-PCR zur Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur angewandt (55°C-57°C-59°C-61°C-63°C-65°C). Nach Beendigung wurde der Reaktionsmix auf 4°C gekühlt. Die experimentellen Konditionen für eine Standard-PCR wie sie während dieser Arbeit angewandt wurde sind unten aufgeführt:

PCR Standard Programm

Initial Denaturation	95°C	10 min	
Denaturation	95°C	1 min	} 25 Zyklen
Annealing	55-65 °C	1 min	
Elongation	72°C	90 sec	
Fill-in synthesis	72°C	10 min	

Jeder Reaktionsmix von 25 µl enthielt die folgenden Komponenten :

PCR Reaction Mix

12,5 µl	DreamTaq Green PCR Mastermix: DreamTaq DNA polymerase (5U/µl), 2x DreamTaq Green Puffer, 4 mM MgCl ₂ , dNTPs (0,4 mM per dNTP)
1 µl	10 µM forward primer
1 µl	10 µM reverse primer
1 µl	DNA template
15,5 µl	
+ 9,5 µl	dH ₂ O

Pro PCR enthielten drei Reaktionen jeweils nur einen von beiden möglichen Primern oder dH₂O an Stelle des DNA-Templates um als Kontrollen zu fungieren. So konnten unspezifische Primerbindungen oder Kontaminationen mit fremder DNA ausgeschlossen werden. Eine weitere Kontrolle bot die Verwendung von β2-Mikroglobulin-spezifischen

Primern (Postivkontrolle). Der Erfolg der Amplifikationen wurde über eine Agarosegelelektrophorese verifiziert. Zur weiteren Verwendung konnten DNA-Fragmente aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt werden.

3.11.4. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung negativ-geladener DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe. Zur Auftrennung der DNA-Fragmente von Interesse (PCR-Produkte), wurden 1x TAE-Gele, welche 0,8% Agarose enthielten gegossen und verwendet. Die spätere Visualisierung der DNA-Banden erfolgte durch Zugabe von Ethidiumbromid (0,1 µg/ml), welches ein interkalierender Farbstoff ist und durch Bestrahlung mit UV-Licht leuchtet. Proben wurden mit 6x DNA Ladepuffer in einem 1:5 Verhältnis versehen und anschließend bei 5 Volt/cm elektrophoretisch aufgetrennt. 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas) und 100bp DNA Ladder (Invitrogen) dienten als Molekulargewicht-Standards zur Bestimmung der Fragmentlänge.

3.11.5. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zum Beseitigen von Salzen, Proteinen, Nukleotiden, Template oder Vektor-DNA, welche möglicherweise mit nachfolgenden Anwendungen interferieren könnten, werden PCR-Produkte oder DNA-Fragmente über Downstream Processing aufgereinigt.

Nach Verifizierung der Fragment-Präsenz bzw. eines erfolgreich amplifizierten PCR-Produktes via Agarosegelelektrophorese, wird das entsprechende DNA-Produkt mittels eines Skalpells und Visualisierung durch UV-Licht ausgeschnitten. Die DNA-Extraktion und Aufreinigung wurde mit Hilfe des "PCR clean-up Gel Extraction NucleoSpin® Extract II Kit" von Macherey & Nagel entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt.

Zur Quantifizierung der DNA wurde eine photometrische Messung durchgeführt.

3.11.6. Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von RNA und DNA in wässrigen Lösungen erfolgte UV-photometrisch durch Messung der optischen Dichte (OD) mittels Spektralphotometer bei Extinktionswerten von 260nm und 280nm. Hierzu wurde zunächst die Extinktion von DEPC-Wasser (50µl) als Referenzwert gemessen und im Anschluss 2µl des RNA-Eluats bzw. des aufgereinigten PCR(DNA)-Produktes zugefügt (Verdünnung: 50+2).

Die Konzentrationen wurden nach dem Labert-Beerschen-Gesetz ermittelt (Extinktionswert bei 260nm und DNA- bzw. RNA-Absorptionsrate: 1.0 OD 260nm = 50µg/ml DNA bzw. 40µg/mlRNA) und in µg/µl angegeben. Eine Absorption von 1.0 bei

260nm korrespondiert mit einer Konzentration von 50µg/ml doppelsträngige DNA und 40µg/ml RNA.

Die Reinheit der Nukleinsäuren lässt sich über das Verhältnis A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230} ermitteln. Dabei zeugen Werte zwischen 1,8 bis 2,0 bzw. von 2,0 bis 2,2 von guter DNA- bzw. RNA- Qualität mit nur sehr geringen Protein- oder DNA-Verunreinigungen. Genaugenommen liegt der Quotient für eine DNA-Lösungen bei 1.8 und bei 2.0 für RNA-Lösungen. Werte < 1.8 weisen auf die Präsenz von Proteinen oder unvollständig beseitigtem Phenol hin.

3.11.7. Sequenzierung und Sequenzanalyse

Zur Sequenzierung und Sequenzanalyse wurden erfolgreich amplifizierte PCR-Produkte an die 4base lab GmbH (Reutlingen) geschickt.

3.12. Datenverarbeitung

3.12.1. Datenbankanalyse

Um Gene und ihre jeweiligen Genprodukte anhand der Analyse der Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen *in silico* zu untersuchen wurde von unterschiedlichen Programmen, die auf dem *Expasy Server* (<http://expasy.org/>) verfügbar sind Gebrauch gemacht. Dabei wurden unter anderem Sequenz-Alignments in verschiedenen Datenbank via BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) durchgeführt. Dabei wurde die UniProtKB- und die National Center for Biotechnology Information (NCBI)- Datenbank genutzt.

3.12.2. Bildverarbeitung und Software

Coomassie-gefärbte SDS-Polyacrylamidgele wurden zur Digitalisierung eingescannt Western Blot-Membranen wurden mittels ImageQuant LAS 4000 digitalisiert oder auf Röntgenfilme übertragen, die im Anschluss eingescannt wurden.

Agarosegele wurden während ihrer Illumination mit UV-Licht fotografiert und digitalisiert. Die Bildbearbeitung wurde unter Anwendung der Softwares ImageJ64, Gimp 2.8 und ImageQuant TL bewerkstelligt. Zur Auswertung von ELISAs, Proteinkonzentrationsbestimmungen etc. wurde MS Office Excel verwendet.

3.12.3. Statistische Auswertung

Zur Berechnung der statistischen Signifikanz erzielter Daten wurde der Mann-Whitney-U-Test (<http://elegans.swmed.edu/~leon/stats/utest.cgi>) angewandt.

4. Ergebnisse

4.1. Vorarbeiten

4.1.1. Identifizierung des GM2A in dendritischen Zellen

Das monomerische GM2A Aktivatorprotein konnte bereits in unterschiedlichen humanen Geweben, wie Leber, Niere und hochkonzentriert im zentralen Nervensystem (ZNS), nachgewiesen werden.^[415]

Im Rahmen einer Analyse differentiell exprimierter Gene in dendritischen Zellen wurde mittels einer subtraktiven cDNA Bibliothek aus Monozyten und aus diesen generierten dendritischen Zellen ($mDCs$) anhand von DNA-Hybridisierungen Transkripte des Glykosphingolipid GM2 Aktivatorproteins erstmalig in $mDCs$ identifiziert. In Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe konnte das GM2 Aktivatorprotein bereits auf cDNA-Ebene in myeloiden CD1c (BDCA-1)⁺, als auch in plasmazytoiden CD303 (BDCA-2)⁺ DC-Populationen des peripheren Blutes nachgewiesen werden (Seltman, unveröffentlicht).

4.1.2. Eine fortschreitende DC-Differenzierung geht mit einem kontinuierlichen Anstieg der GM2A Expression einher

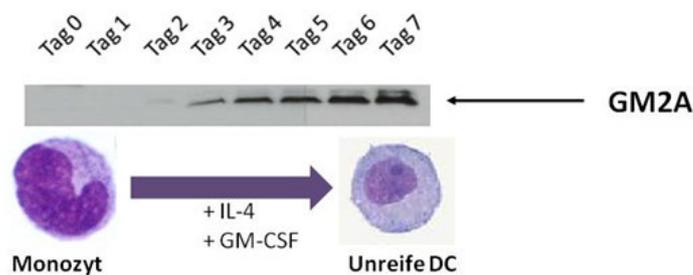


Abbildung 22:
GM2A-Expression im Laufe der DC-Differenzierung aus Monozyten (Q: Bringmann, unveröffentlicht)

Für einen zeitabhängigen Nachweis der GM2A Expression während der IL-4- und Gm-CSF-abhängigen Generierung von dendritischen Zellen aus Monozyten wurden täglich entnommene Aliquots über einen Zeitraum von 7 Tagen zur Gewinnung von Zelllysaten genutzt. Die Proteinlysate wurden elektrophoretisch aufgetrennt und nach anschließendem Western Blotting konnte das GM2-Aktivatorprotein via Immundetektion nachgewiesen.

Die Abbildung zeigt eine kontinuierlich steigende Expression des GM2A in Abhängigkeit zum Fortschreiten der mDC -Differenzierung. In den CD14⁺Monozyten ist der GM2A auf Proteinebene nicht nachweisbar. Es lässt sich annehmen, dass die Expression des GM2A vom Differenzierungsgrad der Zelle abhängt und unter Umständen an diesem Prozess beteiligt und essentiell für die Zelle ist.

4.1.3. (PUGNAc-)Inhibitorverträglichkeit von dendritischen Zellen

Der in dieser Arbeit angewandte chemische Inhibitor der HexA wurde in einer vorhergehenden Arbeit auf seine Verträglichkeit gegenüber den $mDCs$ getestet.

Um zytotoxische Effekte auszuschließen wurden die zur Anwendung geplanten und letztendlich auch benutzten Konzentrationen des Inhibitors (10, 100, 200 μM) den DC-Kulturen zugefügt und anschließend deren Überleben mittels durchflusszytometrischer Ermittlung der Apoptoserate festgestellt.

Durch eine Doppelfärbung mittels Annexin V und 7-AAD wurde eine Apoptoserate von unter 4,5% nachgewiesen. Mit einer durchschnittlichen Überlebensrate der dendritischen Zellen von 95% kann eine zytotoxische Wirkung von PUGNAc in den angewandten Konzentrationen ausgeschlossen werden. (Seltmann, unveröffentlicht, Daten nicht aufgeführt)

4.2.1. PUGNAc beeinflusst die Regulation der Proteinexpression von GM2A und HexA

Da PUGNAc als Inhibitor der HexA fungiert und diese funktionell in einem transienten Komplex mit dem GM2-Aktivatorprotein interagiert, wurde die Expression beider Komponenten nach Inhibitor-Behandlung untersucht.

Hierzu wurden Monozyten wie unter 3.1.-3.3 beschrieben 7 Tage kultiviert und alle 2 Tage mit IL-4/Gm-CSF bzw. LPS an Tag 7 und gleichzeitig mit entsprechenden Konzentrationen des Inhibitors stimuliert. Der Nachweis wurde mittels Western Blot Analyse der Zelllysate erbracht.

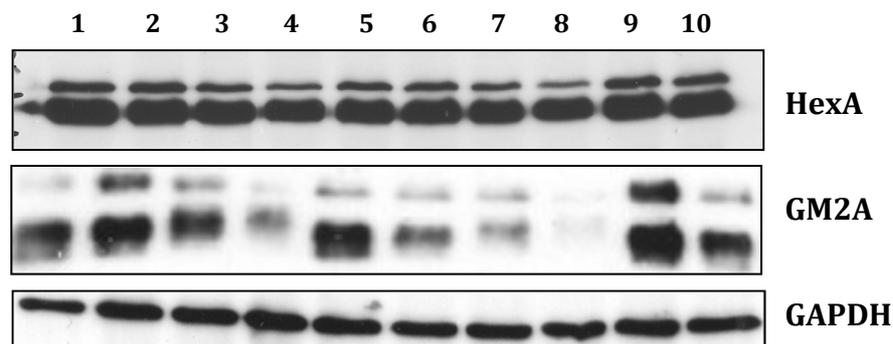


Abbildung 23:

DCs wurden durch Zugabe von IL-4/Gm-CSF über 7 Tage aus Monozyten generiert (Lane 1-4; 9) und gegebenenfalls mit LPS zur Ausreifung gebracht (Lane 5-8; 10). Unreife und LPS-gereifte $mDCs$ wurden während ihrer Generierung parallel mit verschiedenen Konzentrationen PUGNAc behandelt (Lanes 2+6 10 μM , 3+7 100 μM ; 4+8 200 μM). Als Kontrolle dienen DMSO-behandelte Zellen (Lanes 1 + 5) bzw. unbehandelte Zellen (Lanes 9 +10). 20 μg Lysat/Lane wurden mittels eines HexA- bzw. GM2A-spezifischen Antikörpers im Western Blot visualisiert. GAPDH fungiert als Ladekontrolle.

Für die HexA konnten zwei spezifische Banden entsprechend 67kDa und 54kDa detektiert werden. Die Größere korrespondiert mit dem Vorläuferprotein („Precursor“) der HexA. Die dickere 54kDa-Bande entspricht dem reifen funktionsfähigen Enzym („Mature“). Auch für die immunologische Detektion des GM2A sind zwei Banden nachweisbar. Es handelt sich hierbei möglicherweise um die beiden Transkriptvarianten des Aktivatorproteins, welche durch alternatives Splicing entstehen.

Abbildung 23 zeigt deutlich, dass sowohl die Expression der HexA als auch die des GM2A mit zunehmender Inhibitorkonzentration abnimmt, wobei im Falle des GM2AP eine weitaus prägnantere Abnahme zu vermerken ist. Eine optisch gut erkennbare Reduktion der HexA Expression ist erst bei einer PUGNAc-Konzentration von 200µm vorliegend. Die konzentrationsabhängige Expressionsabnahme ist unabhängig davon, ob es sich um unreife oder LPS-gereifte m DCs handelt. Der GM2 Aktivator wird jedoch in unreifen m DCs stärker exprimiert als in LPS-gereiften (Abb. 23, Lanes 9 + 10). Die Expression der HexA zeigt eine nur sehr geringfügig sichtbare Differenz zwischen unreifen und reifen m DCs, die fast zu vernachlässigen ist.

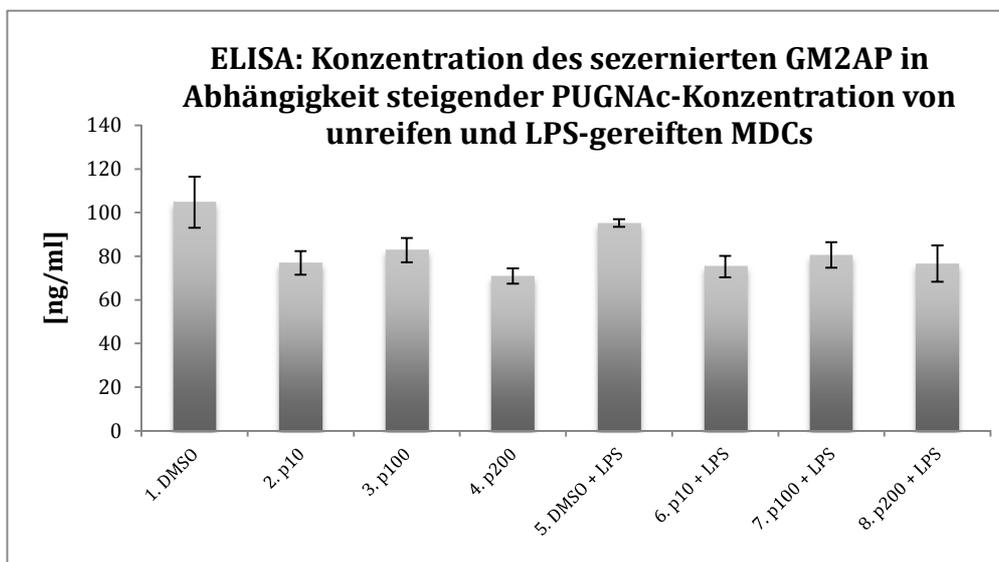


Abbildung 24: Expressionsprofil des sezernierten GM2AP von unreifen und LPS-gereiften MDCs nach Zugabe von 10 µM, 100 µM und 200 µM PUGNAc. DMSO dient als Negativkontrolle. Die GM2AP-Konzentration wurde im Zellkulturüberstand mittels ELISA nachgewiesen. Mittelwerte ergeben sich aus mindestens 3 unabhängig voneinander ausgeführten Experimenten.

Das GM2-Aktivatorprotein übernimmt in sezernierter Form u.a. eine Aufgabe als Transportprotein. Um zu überprüfen, ob die Konzentration des sezernierten GM2AP im Medium durch das Einwirken des PUGNAc-Inhibitors beeinflusst wird, wurde mittels

ELISA die Konzentration des sezernierten Aktivatorproteins in Abhängigkeit zur angewandten PUGNAc-Konzentration bestimmt. (Abb. 24)

In Korrespondenz zur im Western Blot nachgewiesenen geringeren GM2AP-Expression in LPS-gereiften $mDCs$ gegenüber unreifen $mDCs$, ist die nachgewiesenen Konzentration an sezerniertem Aktivator im Zellkulturüberstand ebenfalls geringfügig niedriger in LPS-gereiften $mDCs$. Durch Anwendung des Inhibitors kommt es zu einer leichten Senkung der GM2AP-Sekretion sowohl in unreifen und reifen $mDCs$, die jedoch nicht konzentrationsabhängig ist.

4.2.2. PUGNAc beeinflusst die Regulation der Proteinexpression von lysosomalen Enzymen

Aufgrund der Annahme, dass es durch die DC-Differenzierung zu einem allgemeinen Anstieg der lysosomalen Proteinexpression und damit einhergehend einer höheren Enzymaktivität kommt, wurden neben dem GM2A-Aktivatorprotein die Proteinexpressionen von 3 lysosomalen Enzymen – Sphingomyelinase, Glucocerebrosidase und Ceramidase –, welche ebenfalls am Glykosphingolipidstoffwechsel beteiligt sind, mittels WB in unreifen und LPS-gereiften $mDCs$ nachgewiesen. Auch hier wurden die Auswirkungen verschiedener Inhibitorkonzentrationen auf die Expression der verschiedenen Enzyme untersucht.

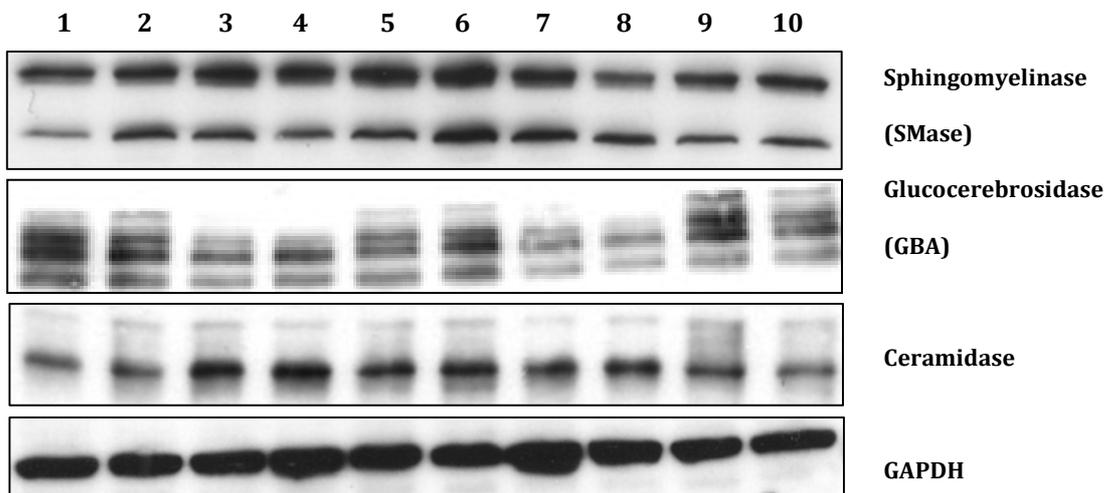


Abbildung 25:

DCs wurden durch Zugabe von IL-4/Gm-CSF über 7 Tage aus Monozyten generiert (Lanes 1-4; 9) und gegebenenfalls mit LPS zur Ausreifung gebracht (Lanes 5-8; 10). Unreife und LPS-gereifte $mDCs$ wurden während ihrer Generierung parallel mit verschiedenen Konzentrationen PUGNAc behandelt (Lanes 2+6 10 μ m, 3+7 100 μ m; 4+8 200 μ m). Als Kontrolle dienen DMSO-behandelt Zellen (Lanes 1 + 5) bzw. unbehandelte Zellen (Lanes 9 +10). 20 μ g Lysat/Lane wurden mittels spezifischer Antikörper im Western Blot visualisiert. GAPDH fungiert als Ladekontrolle.

Für die immunologische Detektion der Sphingomyelinase (SMase) im Western Blot (WB) lassen sich zwei Banden bei $\approx 72\text{kDa}$ und $\approx 57\text{kDa}$ nachweisen. Die SMase scheint in LPS-gereiften mDCs minimal stärker exprimiert zu werden als in unreifen mDCs , wobei Bei Zugabe von PUGNAc wird die 72kDa-Bande mit zunehmender Konzentration in unreifen mDCs stärker, während sie umgekehrter Weise in LPS-gereiften mDCs konzentrationsabhängig schwächer wird. Für die 57kDa-Bande, entsprechend des „mature“ Proteins, kann keine konzentrationsabhängige Alteration der Bandenstärke nachgewiesen werden. Hier konnten lediglich für moderate Inhibitorkonzentrationen (p10, p100) leicht stärkere Banden für unreife und reife mDCs nachgewiesen werden. Die beobachteten minimalen Expressionsunterschiede sollte jedoch nicht überinterpretiert werden.

Auch für die Glucocerebrosidase (GBA) lassen sich mehrere Banden im WB nachweisen. Im WB konnten 4 Banden bei 56kDa, 59kDa, 63kDa und 66kDa, entsprechend den Prozessierungs- und Glykosilierungsstufen der GBA-Synthese, nachgewiesen werden. In unreifen mDCs wird die GBA stärker exprimiert als in LPS-gereiften (Abb.25; Lanes 9+10). Durch Einwirken des PUGNAc-Inhibitors wird die GBA-Expression in unreifen und reifen mDCs konzentrationsabhängig gemindert. Insbesondere die oberste Bande (66kDa) lässt sich bei einer PUGNAc-Konzentration von $100\mu\text{m}$ kaum noch und bei $200\mu\text{m}$ nicht mehr nachweisen.

Die Expression der Ceramidase in unreifen mDCs verbleibt gegenüber reifen mDCs unverändert. Wie bei der Smase sind auch hier nur minimale Unterschiede ersichtlich. Auch führt die Behandlung der mDCs mit PUGNAc bei der Ceramidase zu den gleichen Auswirkungen wie bei der SMase; eine kaum merkliche konzentrationsabhängige Zunahme der Bandenintensität in unreifen und Abnahme in reifen mDCs .

4.2.3. PUGNAc beeinflusst die Regulierung der Aktivierung der MAP-Kinasen

Aufgrund ihrer Bedeutung in der Einleitung proinflammatorischer Prozesse und der damit einhergehenden Bedeutung für die Funktion der dendritischen Zelle wurde auch hier die Auswirkung des Inhibitors auf die Phosphorylierung der ERK- und p38-Kinasen in unreifen und reifen mDCs mittels Western Blot untersucht. Des Weiteren wurde die Expression von c-Jun als „Downstream“-Komponente der JNK-Aktivierung (bzw. JNK-unabhängig) in Zellkernextrakten untersucht. (Abb.26)

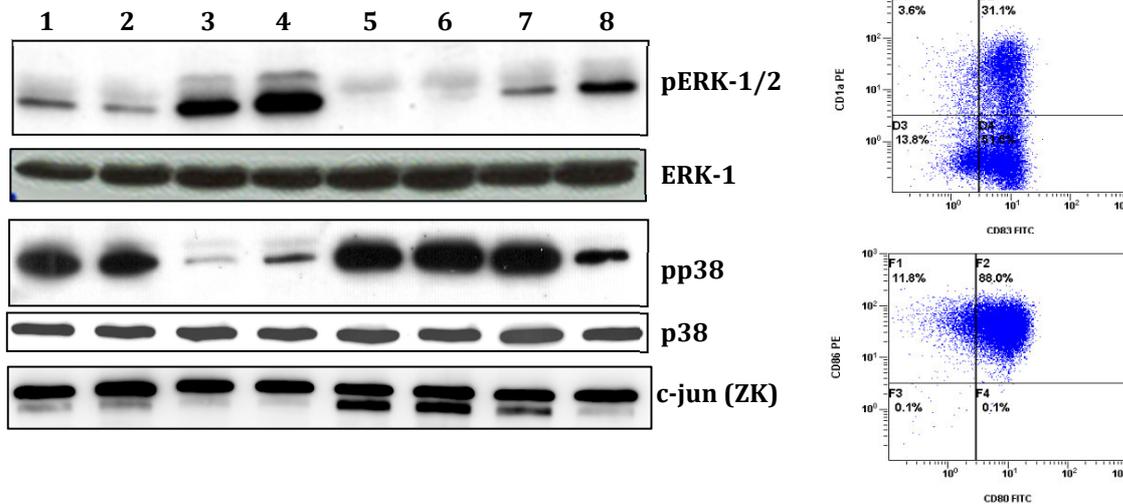


Abbildung 26:

DCs wurden durch Zugabe von IL-4/Gm-CSF über 7 Tage aus Monozyten generiert (Lanes 1-4) und gegebenenfalls mit LPS zur Ausreifung gebracht (Lanes 5-8). Unreife und LPS-gereifte $mDCs$ wurden während ihrer Generierung parallel mit verschiedenen Konzentrationen PUGNAc behandelt (Lanes 2+6 10 μ m, 3+7 100 μ m; 4+8 200 μ m). Als Kontrolle dienen DMSO-behandelt Zellen (Lanes 1 + 5). 20 μ g Lysat/Lane wurde mittels spezifischer Antikörper im Western Blot visualisiert. c-jun wurde mittels spezifischem AK in Zellkernextrakten nachgewiesen. Aliquots LPS-stimulierter $mDCs$ wurden mittels FACS auf ihre Expression von CD1a, CD80, CD83 und CD86 hin überprüft.

Parallel zur Durchführung des Western Blots wurde eine Überprüfung der LPS-bedingten Reifung der $mDCs$ mittels FACS durchgeführt. Die Hochregulierung des Reifemarkers CD83 auf 82,6% verifiziert die DC-Reifung durch LPS-Stimulation. Des Weiteren steigt die Expression von CD86 auf nahezu 100% an und \approx 83% der $mDCs$ exprimieren CD80. (Abb. 26) Die Expression von phosphoryliertem p38 ist in LPS-gereiften $mDCs$ vergleichsweise viel höher als in unreifen $mDCs$. Unabhängig davon weist die p38-Phosphorylierung einen konzentrationsabhängigen Abfall bei Zugabe des Inhibitors auf.

Interessanterweise offenbart die Betrachtung von ERK-1 und ERK-2 ein exakt konträres Ergebnis. Es konnte reproduzierbar nachgewiesen werden, dass unreife $mDCs$ einen höheren Grad an ERK-1/2-Phosphorylierungen aufweisen als LPS-gereifte $mDCs$ und, dass ein Anstieg der Inhibitorkonzentration in den $mDCs$ einen Anstieg der ERK-Phosphorylierung zur Folge hat. Dabei ist die jeweilige Bande entsprechend dem kleineren pERK-2 bei 42 kDa um ein vielfaches stärker ausgeprägt als die größere 44kDa-Bande des phosphorylierten ERK-1. Auch konnte in einigen WB lediglich die Expression von pERK-2 nachgewiesen werden (Daten nicht aufgeführt).

Die nachgewiesenen Expression von c-jun im WB verhält sich gegenüber der LPS-Stimulation und des Inhibitoreinflusses identisch zur Phosphorylierung von p38; Durch LPS-Stimulation steigt die Expression, während sie in unreifen als auch in reifen $mDCs$ gleichermaßen konzentrationsabhängig durch Einwirken des Inhibitors abnimmt.

4.2.4. PUGNac beeinflusst die Expression verschiedener nuklearer Proteine

Die LPS-induzierte „klassische“ DC-Reifung ist ein koordinierter Prozess, der unter anderem durch Nuclear factor (NF)- κ B Aktivierung reguliert wird. Neben RelB gehören p50, p52, RelA und c-Rel zur NF- κ B-Familie. LPS fungiert als PAMP und führt über Erkennung durch den PRR TLR4 zur Aktivierung einer Signalkaskade, welche die Translokation von NF- κ B in den Zellkern bewirkt.

Mitglieder der IRF-Familie besitzen eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Funktion dendritischer Zellen. Die Regulatorische Aktivität der IRFs findet über eine Translokation in den Zellkern statt, wo sie mit anderen Proteinen – wie z.B. PU.1 – assoziieren können.

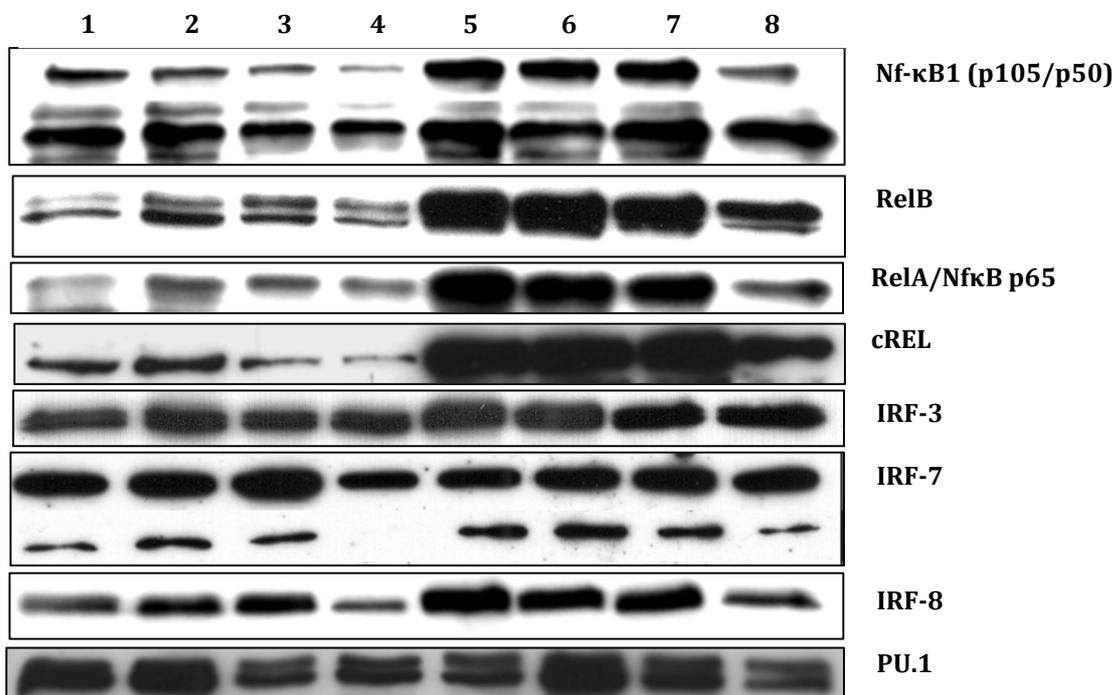


Abbildung 27:

DCs wurden durch Zugabe von IL-4/Gm-CSF über 7 Tage aus Monozyten generiert (Lanes 1-4) und gegebenenfalls mit LPS zur Ausreifung gebracht (Lanes 5-8). Unreife und LPS-gereifte mDCs wurden während ihrer Generierung parallel mit verschiedenen Konzentrationen PUGNac behandelt (Lanes 2+6 10 μ m, 3+7 100 μ m; 4+8 200 μ m). Als Kontrolle dienen DMSO-behandelt Zellen (Lanes 1 + 5). Zellkernextrakte wurden mittels spezifischer Antikörper im Western Blot visualisiert. Die gleichmäßige Beladung mit Protein wurde mittels Ponceau S -Färbung sichergestellt.

Die Analyse der Zellkernextrakte der PUGNac-behandelten unreifen und LPS-gereiften mDCs im Western Blot, weist für die Expression der Mitglieder der NF- κ B-Familie eine erhebliche Steigerung nach LPS-Stimulation und eine konzentrationsabhängige Expressionsminderung in unreifen und reifen mDCs bei Behandlung mit steigender PUGNac-Konzentration auf. (Abb. 27, Zeilen 1-4)

Die Auswirkungen von PUGNAc auf die Expression der Interferon-regulatorischen Faktoren (IRFs) ist weniger prägnant. (Abb. 27, Zeilen 5-7) Durch Stimulation mit LPS kommt es auch hier zu einem Anstieg der IRF-3-, IRF-7- und IRF-8-Expression im Zellkern, jedoch ist erst bei einer Inhibitorkonzentration von 200µm eine Minderung der Expression von IRF-8 gut erkennbar nachzuweisen. IRF-3 bleibt unbeeinträchtigt durch die steigenden Konzentrationen des Inhibitors. Der Nachweis der IRF-7-Expression wird durch eine Bande bei 63kDa und 21kDa erbracht. Für IRF-7 lässt sich insbesondere durch die kleinere 21kDa-Bande ein negativ-regulatorischer Einfluss des Inhibitors nachweisen. Eine leichte konzentrationsabhängige Dezimierung ist erkennbar. Bei Anwendung einer Konzentration von 200µm ist die IRF-7 Expression im Zellkern unreifer $mDCs$ im WB nicht mehr nachweisbar. In den LPS-gereiften $mDCs$ kann noch eine sehr geringe Expression nachgewiesen werden.

Während die Mitglieder der NF- κ B-Familie und der IRFs nach LPS-Stimulation eine erhöhte Proteinexpression im Zellkern aufweisen, konnte dies nicht für den Transkriptionsfaktor PU.1 gezeigt werden. PU.1 wird in unreifen und reifen $mDCs$ relativ gleichbleibend exprimiert mit einer leichten Tendenz eher in unreifen $mDCs$ stärker exprimiert zu werden. PUGNAc-Konzentrationen ab 100µm+ führen auch bei PU.1 zu einer Expressionsminderung in unreifen $mDCs$ und $mDCs$, welche mit dem TLR4-Liganden LPS kultiviert wurden. (Abb. 27, Zeile 8) Eine gleichmäßige Proteinbeladung der Nitrocellulose-Membranen wurde stets durch eine Ponceau-Färbung überprüft.

4.3. Elektrotransfektion von $mDCs$ mittels GM2A-spezifischer siRNA

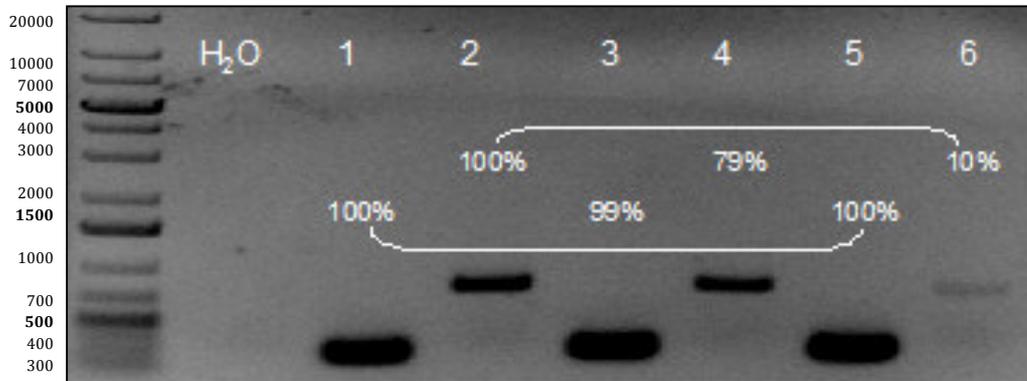
Das GM2-Aktivatorprotein ist neben der β -Hexoaminidase A essentieller Bestandteil des GM2-Gangliosid-abbauenden Komplexes. Ein gestörter GM2-Gangliosidabbau führt nachweislich zu neurodegenerativen Stoffwechselerkrankungen. Um die Auswirkungen einer GM2A-Inhibition mit entsprechend folgendem GM2-Gangliosidabbauarrests auf dendritische Zellen zu untersuchen wurde mittels Einschleusen einer GM2A-spezifischen siRNA dessen Expression unterdrückt.

4.3.1a. Nachweis der GM2A-Inhibition durch siRNA mittels RT-PCR

Um den Erfolg der Elektrotransfektion mittels der GM2A-spezifischen siRNA zu verifizieren wurde mittels RT-PCR die Transkription des GM2-Aktivatorproteins überprüft. Hierzu wurde die RNA aus unreifen $mDCs$ isoliert und in cDNA umgeschrieben. Nach PCR-Amplifikation der GM2AP-cDNA – bzw. β 2-Mikroglobulin-cDNA als Kontrolle –

Ergebnisse

wurden die Banden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und durch Bestrahlung des interkalierenden Ethidiumbromids mit UV-Licht visualisiert.



Probe	Peak Area	Prozentuales
H ₂ O-Kontrolle: DCs (IL-4/Gm-CSF) H ₂ O	-	-
1: DCs (IL4/Gm-CSF); B2-M	27.717.794	100%
2: DCs (IL4/Gm-CSF)	16.344.146	100%
3: DCs (IL4/Gm-CSF); Negativ Kontrolle 200nM; B2-M	27.489.652	99,1769114
4: DCs (IL4/Gm-CSF); Negativ Kontrolle 200nM	12.832.953	78,5171217
5: DCs (IL4/Gm-CSF) GM2A siRNA1 200nM; B2-M	27.670.430	99,8291206
6: DCs (IL4/Gm-CSF) GM2A siRNA1 200nM	1.639.497	10,0310962

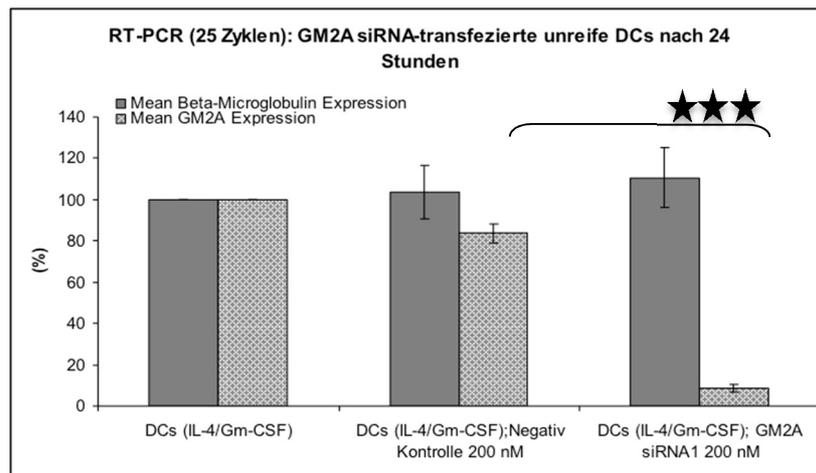


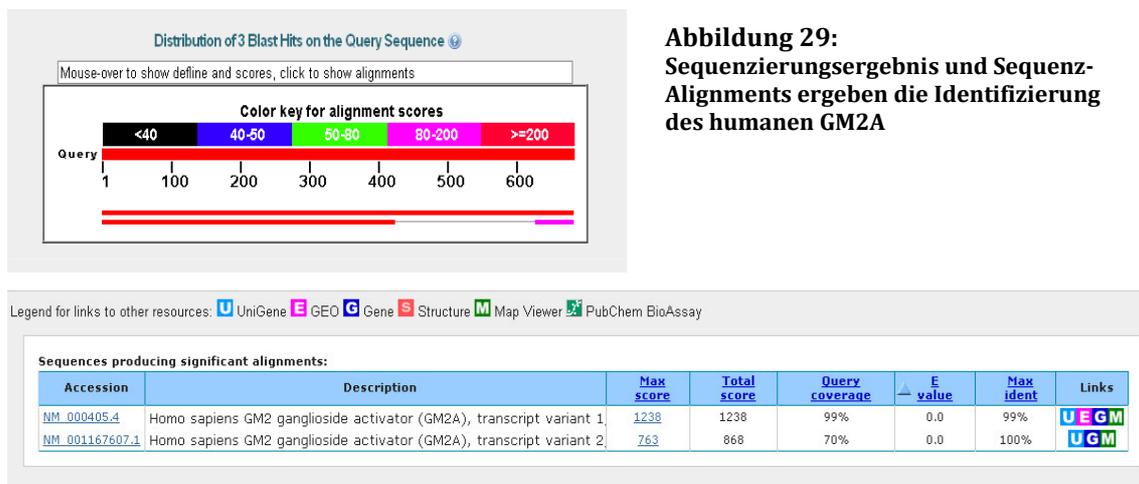
Abbildung 28:

RT-PCR von GM2A-siRNA-transfizierten unreifen mDCs: B2-M dient als Positivkontrolle, unreife mDCs, transfiziert mit „Scramble“-siRNA, dienen als Negativkontrolle; H₂O als Template dient als interne Kontrolle der RT-PCR; oben: Auftrennung der PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese, Standard: GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder ; unten: Graphische Darstellung der Mittelwerte aus mind. 2 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, Mann-Withney-U-Test: p < 0,001

Nach erfolgreicher Transfektion der MDCs mit der GM2A-spezifischen siRNA konnte eine 90%ige Reduktion der GM2A-cDNA nachgewiesen werden. Eine gänzliche Inhibition von GM2A auf RNA-Ebene wurde nicht erreicht. (Abb. 28)

4.3.1b. Ergebnis der Sequenzierung

Um eine eindeutige Identifizierung des erhaltenen PCR-Produktes zu ermöglichen wurden aufgereinigte PCR-Produkte an 4base-lab verschickt.



Die erhaltene Sequenz ergab eine 99%ige Übereinstimmung mit der Sequenz der Transkriptvariante 1 des humanen GM2A und eine 70%ige Übereinstimmung mit Transkriptvariante 2 des humanen GM2A.

4.3.2. Nachweis der GM2A-Inhibition durch siRNA mittels WB

Die Inhibition des GM2AP wurde auf Proteinebene im Western Blot analysiert. Lysate der elektrotransferten Zellen wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine im Anschluss auf eine Membran übertragen und immobilisiert. Der Nachweis der GM2A-Proteinexpression wurde durch Inkubation mit einem spezifischen Antikörper erbracht.

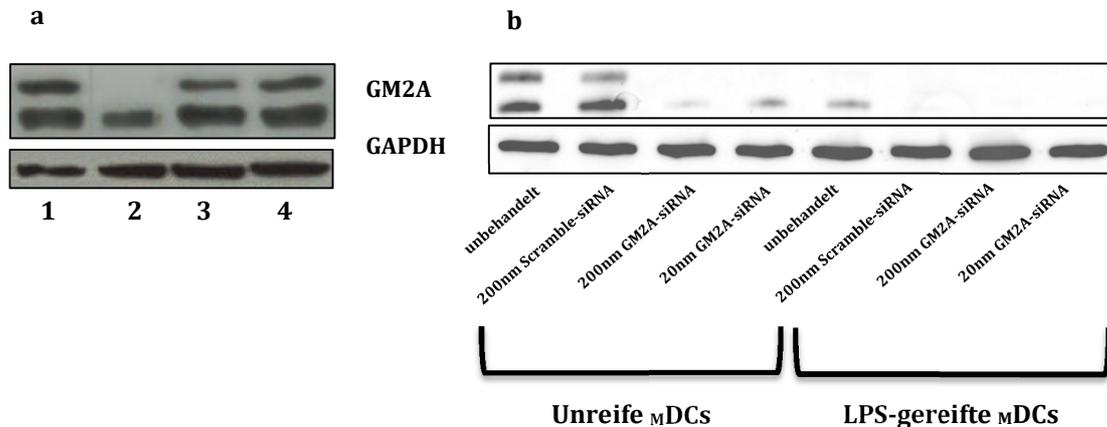


Abbildung 30:

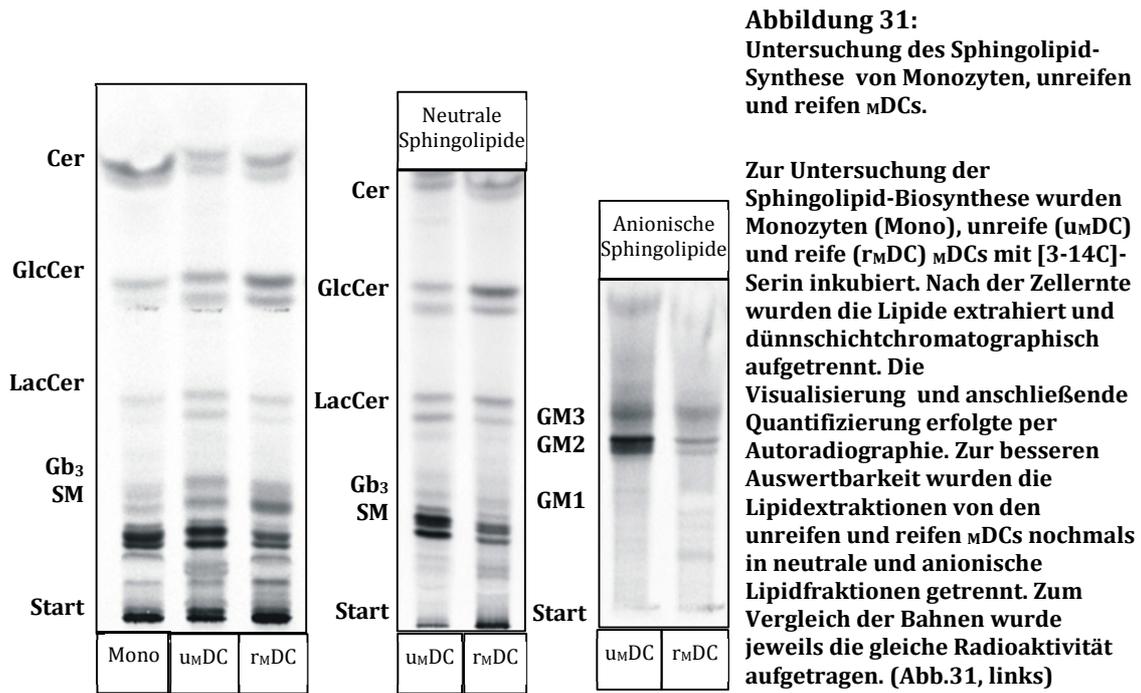
mDCs wurden bei 1450V, 20ms und 1 Puls elektrotransfiziert und immunologisch mittels WB analysiert; a.) unreife mDCs; 1:unbehandelt; 2: EP mit 200nm GM2A-siRNA; 3: EP mit 200nm Scramble-siRNA; 4: EP mit H₂O; b.) unreife und LPS-gereifte mDCs

Im Western Blot sind 2 spezifische Banden des GM2AP nachzuweisen. Die Spezifität beider demonstrierten Banden wurde unter Anwendung eines Blocking-Peptides (ab127733; abcam) verifiziert. (Daten nicht aufgeführt) Die Bande, korrespondierend zu einem größeren MW, wird schwächer exprimiert als die Bande, welche einem kleineren MW entspricht. (Abb. 30) Beide Banden werden in LPS-stimulierten mDCs schwächer exprimiert als in unreifen mDCs, wobei insbesondere die Expression der oberen Bande in einigen Western Blots nicht nachweisbar war. (Abb. 30b.) Die GM2A-siRNA führt im WB zu einer vollständigen Inhibition der oberen Bande sowohl in unreifen als auch in LPS-gereiften mDCs. (Abb.30a; Lane 2; Abb.29b; Lanes 3, 4, 7, 8) Die untere Bande bleibt, vor allem in den unreifen mDCs, oftmals noch geringfügig nachweisbar.

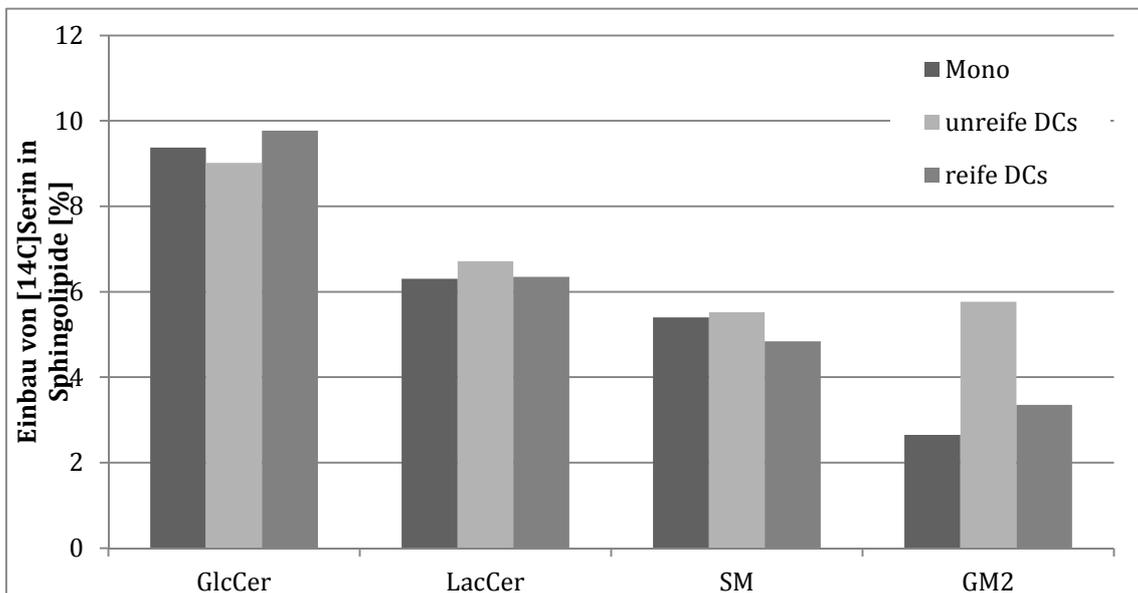
4.4. Lipidanalyse von Monozyten, unreifen und LPS-gereiften mDCs im Vergleich

Über die Kooperation mit der Arbeitsgruppe „Biochemie der Lipide“ von Prof. Dr. rer. nat. Konrad Sandhoff des LIMES-Institutes (c/o Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie, Bonn) war es möglich eine Lipidanalyse in unreifen und LPS-gereiften mDCs, ebenso wie in Monozyten durchzuführen.

Um die Abhängigkeit der Differenzierung von Monozyten zu unreifen bzw. reifen mDCs auf die Biosynthese der Glykosphingolipide zu untersuchen, wurden die Sphingolipide mit [3-14C]-Serin metabolisch markiert.



Die Ergebnisse der Quantifizierung sind im Diagramm dargestellt (Abb. 31, unten). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte (n=2).
 Cer: Ceramid; GlcCer: Glucosylceramid, LacCer: Lactosylceramid, Gb3: Globotriaosylceramid, SM: Sphingomyelin



Die ersten erzielten Ergebnisse weisen bereits auf deutliche Unterschiede in der Lipidzusammensetzung von Monozyten, unreifen mDCs und reifen mDCs hin.

In unreifen mDCs lässt sich eine deutlich höhere Menge des GM2-Gangliosides nachweisen als in LPS-gereiften mDCs. In den unreifen mDCs wird die doppelte Menge GM2 gebildet als in den Monozyten. Bei den reifen mDCs ist die Biosynthese dann nur noch um 26% erhöht.

Auch die neutralen Sphingolipide weisen eine differentielle Expression in unreifen und reifen $mDCs$ auf; beispielsweise ist in unreifen $mDCs$ eine höhere Konzentration an Sphingomyelin vorzufinden als in reifen $mDCs$. (Abb.31)

4.5. Durchflusszytometrie

4.5.1. Einfluss des PUGNAc Inhibitors auf die Zellgröße Dendritischer Zellen

In den Dot-Plots zeigt sich, dass es mit ansteigender PUGNAc-Zugabe zu einer verminderten Zellgröße sowohl der unreifen als auch der LPS-gereiften $mDCs$ kommt.

Des Weiteren scheint es zur Entwicklung eines einheitlicheren Phänotyps zu kommen; die DC-Population, die rund 35 - 40% der im FACS gemessenen Zellen ausmacht, wächst mit ansteigender PUGNAc-Konzentration auf ungefähr 70% an.

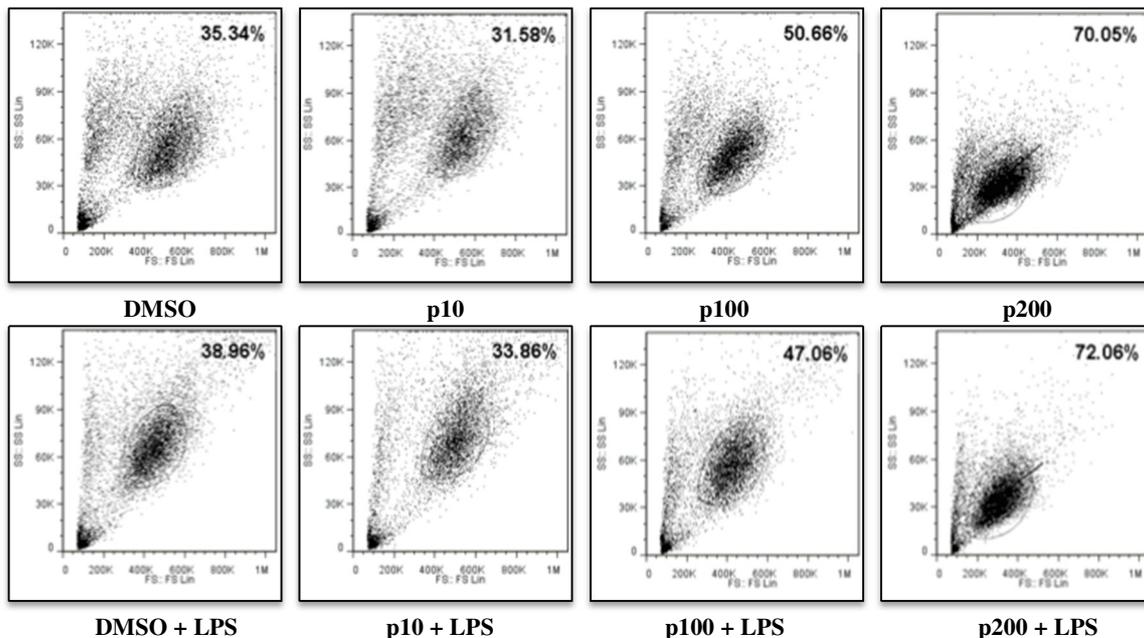


Abbildung 32:

Unreife und LPS-gereifte $mDCs$ wurden wie beschrieben in einer 7-tägigen Kultur aus Monozyten generiert und parallel mit DMSO oder unterschiedlichen Konzentrationen PUGNAc behandelt. Nach dem Ernten und wiederholtem Waschen in PBS wurden die Zellen in Isoflow aufgenommen und durchflusszytometrisch gemessen.

4.5.2. Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmorphologie der $mDCs$

Eine phänotypische Charakterisierung einer Zelle hämatopoietischen Ursprungs kann durch Untersuchung des zu einem jeglichen bestimmten Zeitpunkt exprimierten Musters von CD-Markern realisiert werden. Die Expression bestimmter CD-Moleküle ist dabei charakteristisch für den jeweiligen Zelltyp und dessen Differenzierungsstatus zum

gegebenen Zeitpunkt. So ergibt sich aus dem Expressionsmuster Zelllinien-spezifischer Oberflächenmoleküle die Möglichkeit zur Klassifizierung von Leukozyten in Untergruppen.

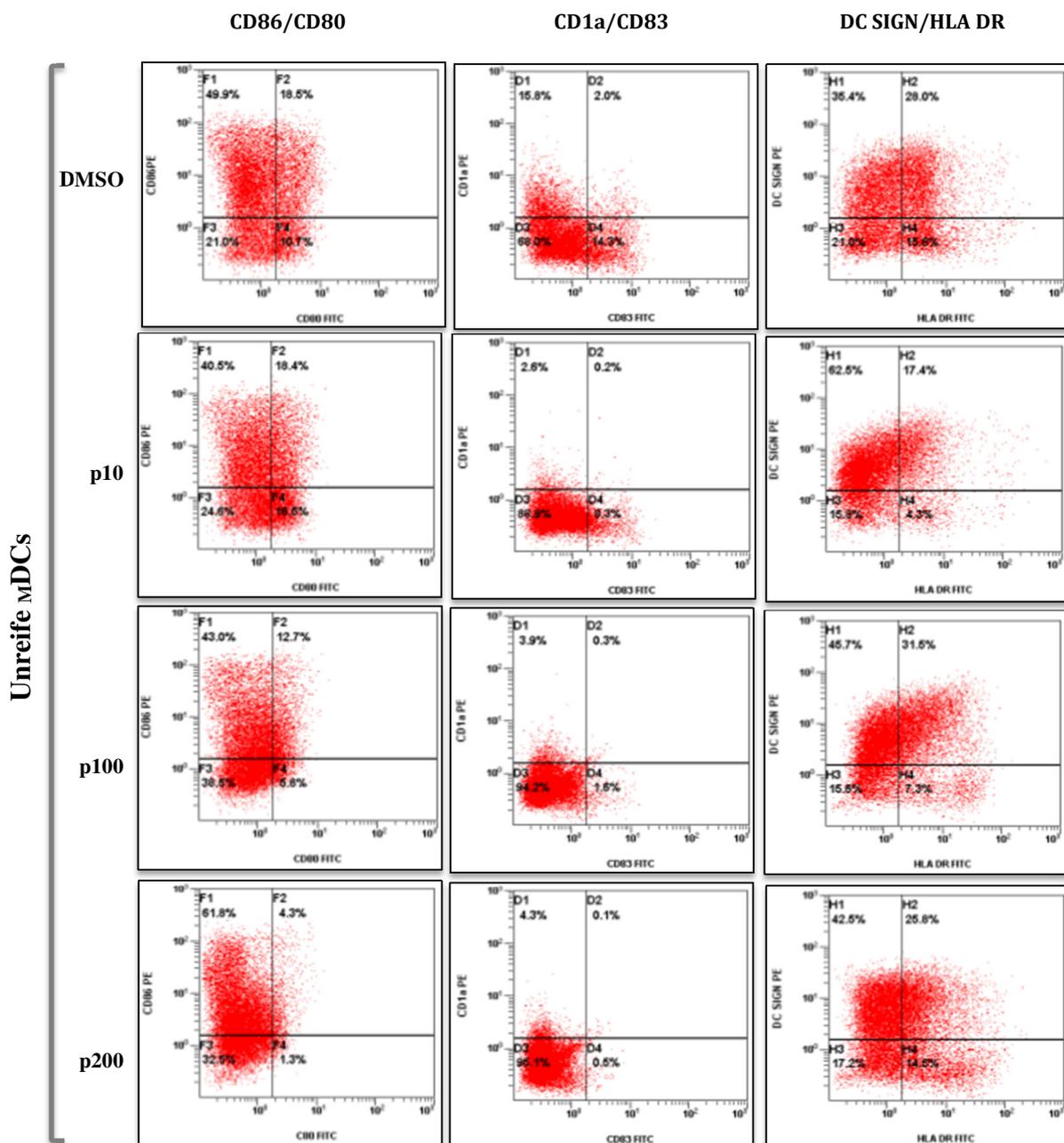
Standardmäßige Analysen humaner $mDCs$ beinhalten die Untersuchung der Expression der Oberflächenmoleküle CD14, CD1a, HLA-DR, CD80, CD83 und CD86. Dabei unterscheidet sich das charakteristische Expressionsmuster dieser CD-Moleküle abhängig vom Reifegrad der $mDCs$. [130, 190] In Ergänzung zu den oben aufgeführten CD-Markern wurde die Expression von CD40, CD54, DC-SIGN (CD209), Mannoserezeptor CD206 und CCR7 auf unreifen $mDCs$ und LPS-gereiften $mDCs$ mit und ohne PUGNAc-Behandlung oder GM2A-siRNA-Transfektion im Vergleich untersucht.

Tabelle 5: Funktion und Liganden der untersuchten CD-Marker

Oberflächenmarker „Cluster of Differentiation“	Ligand	Funktion
CCR7 / CD197	CCL19, CCL21	DC-Migration; erhöhte Expression auf reifen DCs
CD1a	Antigene	AG-Aufnahme und Präsentation
CD14	Antigene; LPS	Monozytenmarker; LPS-Rezeptor-Komponent
CD40	CD40L (CD154)	Co-Rezeptor für Lymphozyten; fördert Wachstum, Differenzierung, Isotyp-Switch von B-Zellen, Zytokinproduktion von Makrophagen und DCs
CD54 / ICAM-1	LFA-1 (CD11a/CD18 Integrin); Mac-1 (CD11b/CD18 Integrin)	Adhäsion/Migration; Stabilisierung von Zell-Zell-Interaktionen
CD80 (B7-1)	CD28, CTLA4	Co-Stimulator bzw. Modulation der BCR/TCR-Aktivierung
CD83		DC-Reifemarker;
CD86 (B7-1)	CD28, CTLA4	Aktivierung naiver T-Zellen, Co-Stimulator bzw. Regulator der BCR/TCR-Aktivierung
CD206	Mannose, N-Acetylglucosamin auf pathogenen Oberflächen (Bakterien, Pilze)	C-Typ-Lektin-Rezeptor (PPR), Aktivierung des Komplementsystems; Rezeptor-vermittelte Endozytose
CD209 (DC-SIGN)	ICAM-2; ICAM-3	PPR; Regulation von Adhäsionsprozessen, e.g. DC Trafficking über ICAM-2-Interaktion und T-Zell-Synapsenbildung über Bindung von ICAM-3
HLA DR	Antigene	MHC Klasse II; AG-Präsentation und Prozessierung

4.5.2.1. Einfluss von PUGNac auf das Expressionsmusters der CD-Moleküle von unreifen und LPS-gereiften $mDCs$

Um den Einfluss der HexA-Inhibition durch PUGNac auf das Expressionsmuster der CD-Moleküle von unreifen und LPS-gereiften $mDCs$ zu untersuchen, wurde eine immunologische Charakterisierung mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper durchgeführt.



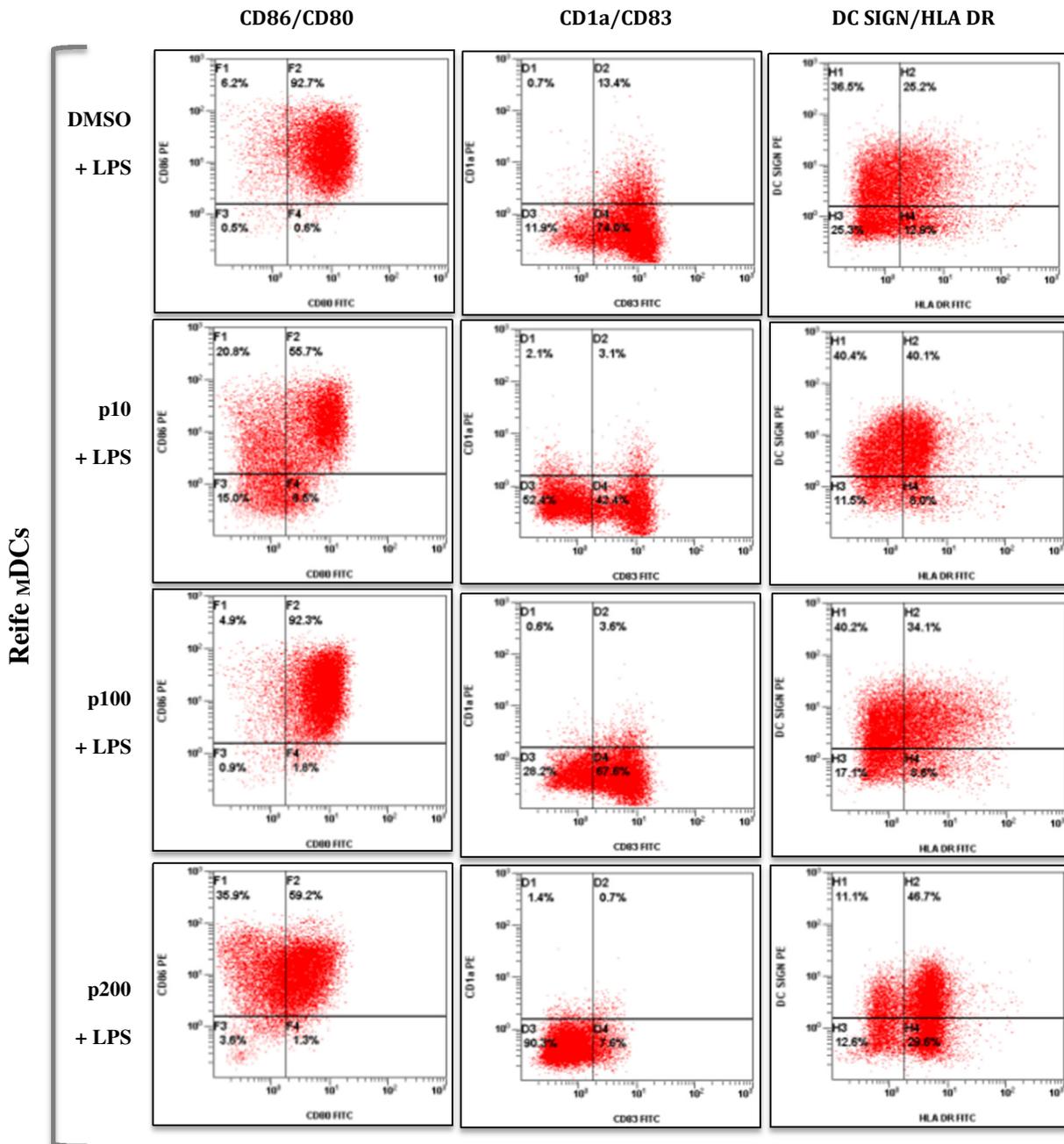


Abbildung 33a:

Unreife und LPS-gereifte mDCs wurden wie beschrieben in einer 7-tägigen Kultur aus Monozyten generiert und parallel mit DMSO oder unterschiedlichen Konzentrationen PUGNAc behandelt. Nach dem Ernten und wiederholtem Waschen in PBS wurden die Zellen in Isoflow aufgenommen und durchflusszytometrisch gemessen. Mittels Fluoreszenz-markierter AKs (FITC/PE) wurde die Expression von CD1a, CD80, CD83, CD86 HLA-DR und DC-SIGN untersucht. Dot-Plots sind exemplarisch für mind. 8 unabhängig durchgeführte Experimente dargestellt.

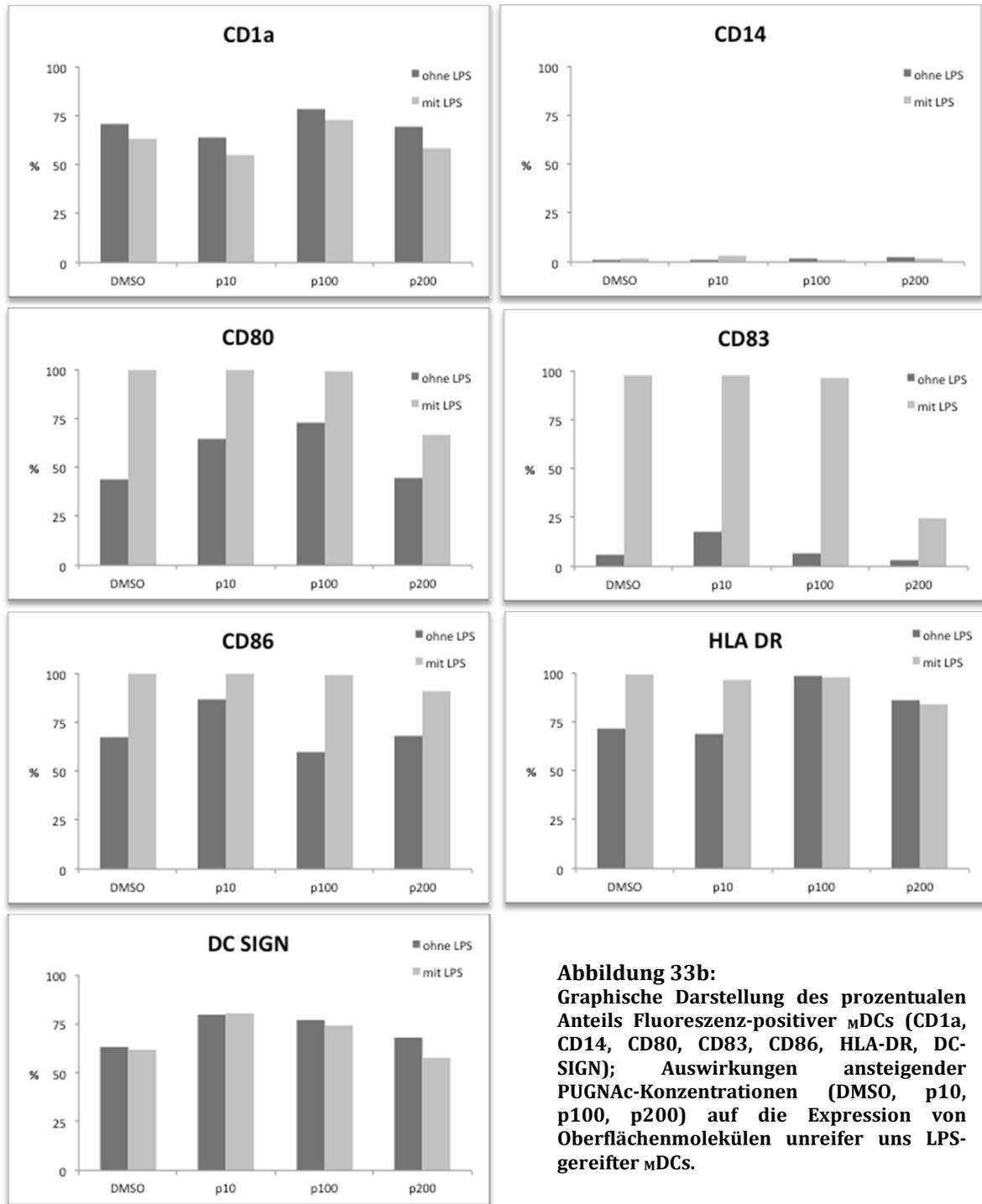


Abbildung 33b: Graphische Darstellung des prozentualen Anteils Fluoreszenz-positiver mDCs (CD1a, CD14, CD80, CD83, CD86, HLA-DR, DC-SIGN); Auswirkungen ansteigender PUGNAc-Konzentrationen (DMSO, p10, p100, p200) auf die Expression von Oberflächenmolekülen unreifer und LPS-gereifter mDCs.

Die Expression der untersuchten CD-Oberflächenmoleküle von unreifen mDCs und LPS-gereiften mDCs im Vergleich entspricht weitestgehend den Erwartungen.

Während CD1a und DC-SIGN gleichbleibend moderat exprimiert werden, steigen die Expressionen von CD80 und CD83 in LPS-gereiften mDCs um mindestens 50% verglichen zu ihrer Expression auf der Oberfläche unreifer mDCs an. Auch eine ca. 30%ige Steigerung der CD86- und HLA-DR-Expression lässt sich durch LPS induzieren. Der Monozytenmarker

CD14 wird mit unter 10% nur von einer Minderheit der unreifen und reifen $mDCs$ exprimiert. (Abb. 33a./b.)

Durch Einwirken von PUGNAc kommt es zu einer Reduktion der CD80- und CD83-exprimierenden LPS-gereiften $mDCs$. Diese Reduktion konnte in allen durchgeführten Experimenten demonstriert werden, zeigte sich jedoch variabel bezüglich ihrer Ausprägung in Abhängigkeit vom jeweiligen Spender. So wie auch in diesem Beispiel zu erkennen ist, kam es bei moderaten PUGNAc-Konzentrationen (p10, p100) zu einer nur geringen bzw. manchmal auch nicht-signifikanten Reduktion der Fluoreszenz-positiven $mDCs$ mit einer abrupten starken und teilweise 50% übersteigenden Minderung positiver Zellen bei 200 μ m PUGNAc. (Abb.33b)

Entsprechend lässt sich annehmen, dass PUGNAc-induzierte Expressionsminderungen der jeweiligen CD-Moleküle konzentrationsabhängig sind, jedoch eine Art Schwelle zwischen 100 μ m und 200 μ m liegt.

Anhand der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität lässt sich neben der reduzierten CD80- und CD83-Expression erkennen, dass CD1a und CD86 ebenfalls konzentrationsabhängig durch die Hemmung der HexA mittels PUGNAc negativ-regulatorisch beeinflusst werden. (Abb. 34; Abb. 35)

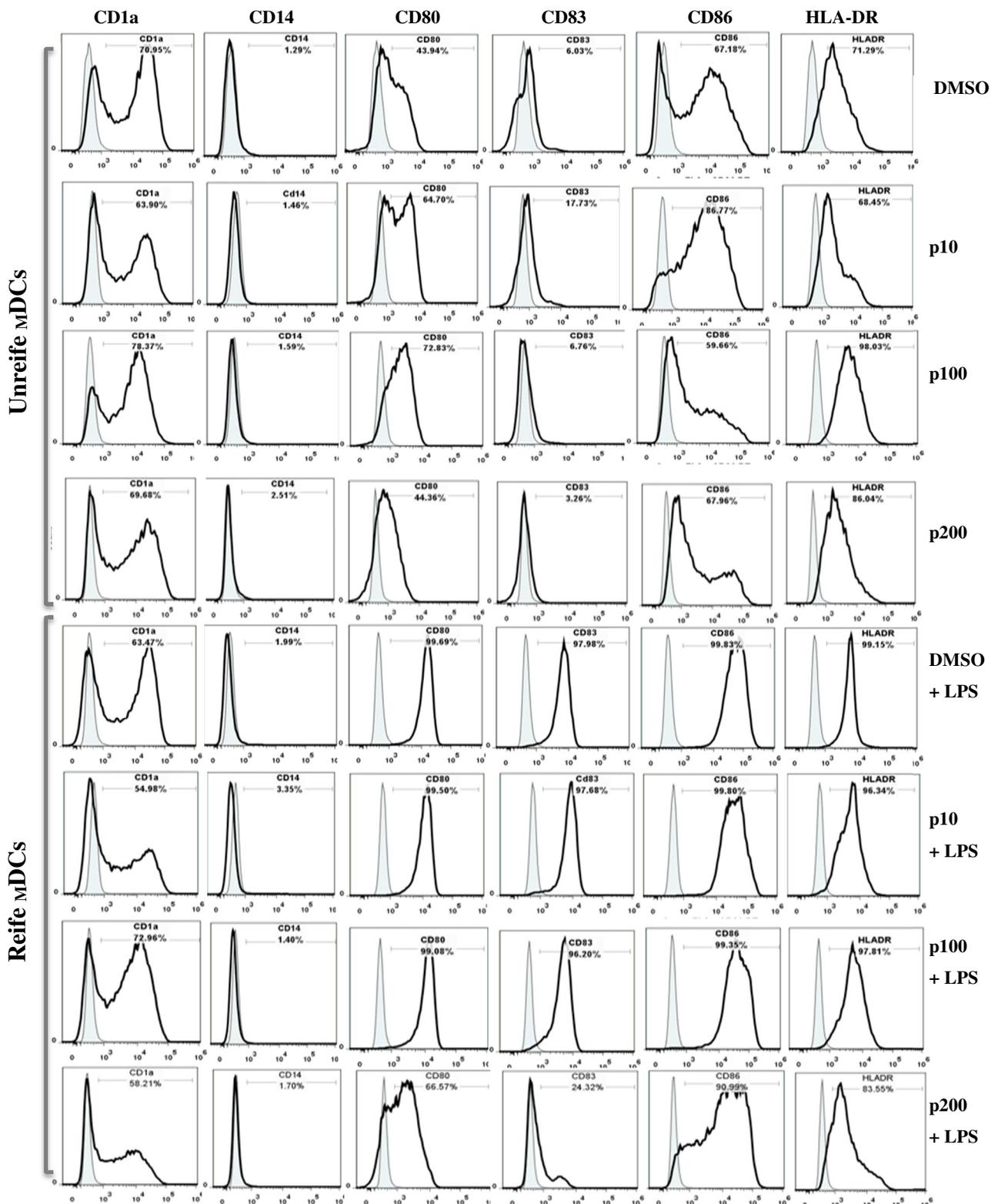


Abbildung 34:

Expressionsmuster von CD1a, CD14, CD80, CD83, CD86 und HLA-DR auf unreifen und LPS-gereiften mDCs nach paralleler Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen PUGNAc (p10, p100, p200). Die Zugabe von DMSO dient als Kontrolle. Die Zellen wurden mittels spezifischer Fluorochrom-gekoppelter Antikörper gefärbt und per FACS analysiert. Die abgebildeten Histogramme zeigen die MFI repräsentativ für >10 unabhängig durchgeführte Experimente.

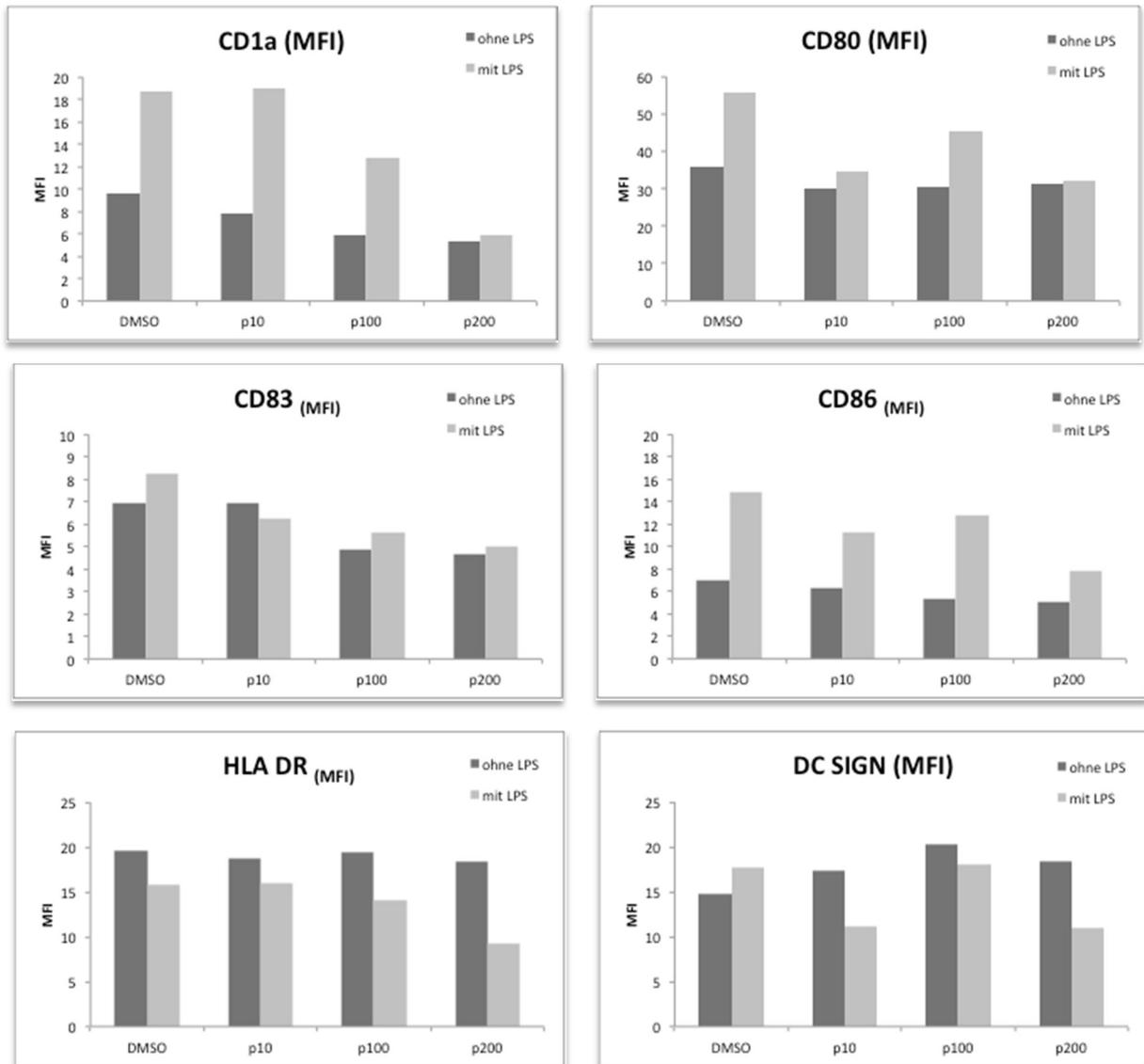


Abbildung 35:

Graphische Darstellung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (MFI) der mDCs, deren Markierung mit dem entsprechend spezifischen Antikörper für das jeweilige CD-Molekül per FACS nachgewiesen werden konnte. Unreife und LPS-gereifte mDCs wurden mit ansteigenden Konzentrationen PUGNAc (p10, p100, p200) hinsichtlich ihrer Expression bestimmter Oberflächenmoleküle (CD1a, CD14, CD80, CD83, CD86, HLA-DR, DC-SIGN) untersucht. Unreife und LPS-gereifte DMSO-behandelte mDCs dienen als Kontrolle. Die dargestellten Ergebnisse der durchgeführten Messungen dienen exemplarisch für >5 unabhängig durchgeführte Experimente.

4.5.2.2. Durchflusszytometrische Untersuchung elektrotransfekzierter $mDCs$ mit GM2A-spezifischer siRNA

4.5.2.2.1. Etablierung der Elektrotransfektion

Da die Anwendung eines elektrischen Feldes eine Porenbildung in der zytoplasmatischen Membran mit sich führt und diese zum Zelltod führen kann, was als Ausschlusskriterium für diese Methode gelten würde, wurden elektroporierte $mDCs$ auf ihre Vitalität hin untersucht. Die Lebendzellzahl wurde durchflusszytometrisch durch Verwendung von Propidium Iodid bestimmt. Um die optimalen Einstellungen für u.a. Spannung, Pulslänge und -frequenz zu ermitteln und somit einen Standard für die Elektrotransfektion von $mDCs$ zu etablieren, wurde zunächst eine non-silencing-AlexaFluor₄₈₈-gekoppelte siRNA zur Testung verschiedener Einstellungen und zur Ermittlung der Apoptoserate gewählt.

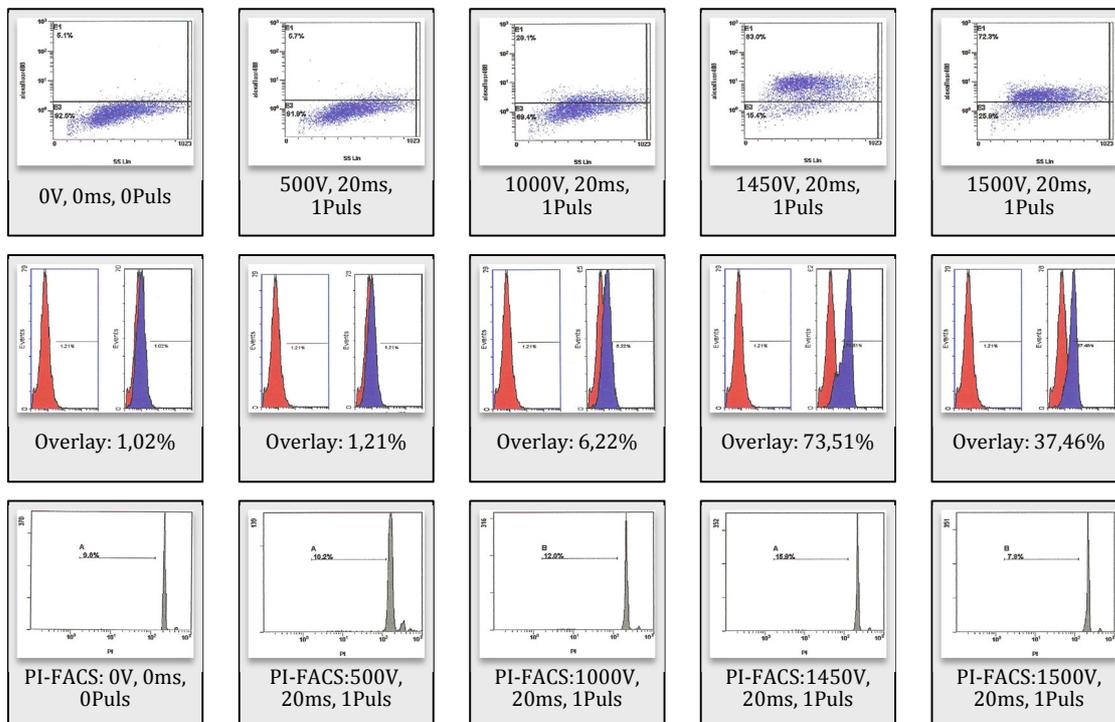


Abbildung 36a:

Bestimmung der Transfektionseffizienz und Apoptoserate elektrotransfekzierter $mDCs$. Aus Monozyten generierte $mDCs$ wurden mit einem Puls bei einer gleichbleibenden Pulslänge von 20ms bei steigender Voltzahl (500V, 1000V, 1450V, 1500V) mit einer non-silencing AlexaFluor₄₈₈-siRNA transfiziert. Die Diagramme in den oberen beiden Reihen der Graphik zeigen die elektroporierten $mDCs$ in Dot Plots und Overlay Plots. Die Diagramme der untersten Reihe zeigen die Bestimmung der Apoptoserate in Abhängigkeit zur jeweilig gewählten Voltzahl im PI-Facs. Nicht-elektroporierte $mDCs$ dienen als Kontrolle

Aus den Diagrammen geht hervor, dass mit ansteigender Spannung die Effektivität der Transfektion steigt. Bei einer Voltzahl von 500 konnte die siRNA nur in weniger als 10%

der $mDCs$ eingeschleust werden. Die höchste Transfektionsrate wurde mit 83% transfezierten Zellen bei 1450V erzielt. Eine weitere Steigerung der Spannung führte zu einer Senkung der AlexaFluor₄₈₈-positiven $mDCs$. Des Weiteren konnte durch die Elektroporation keine wesentlich erhöhte Apoptoserate gemessen werden. Im Vergleich zu nicht-elektroporierten $mDCs$ kann die geringfügige Steigung von $\pm 5\%$ vernachlässigt werden.

Nach Elektrotransfektion der nach 3.1/3.2. generierten $mDCs$ wurden diese über einen Zeitraum von maximal 96 Stunden weiterkultiviert. Dabei wurden im Abstand von 24 Stunden der prozentuale Anteil AlexaFluor₄₈₈-positiver Zellen und deren durchschnittliche Fluoreszenzintensität ermittelt.

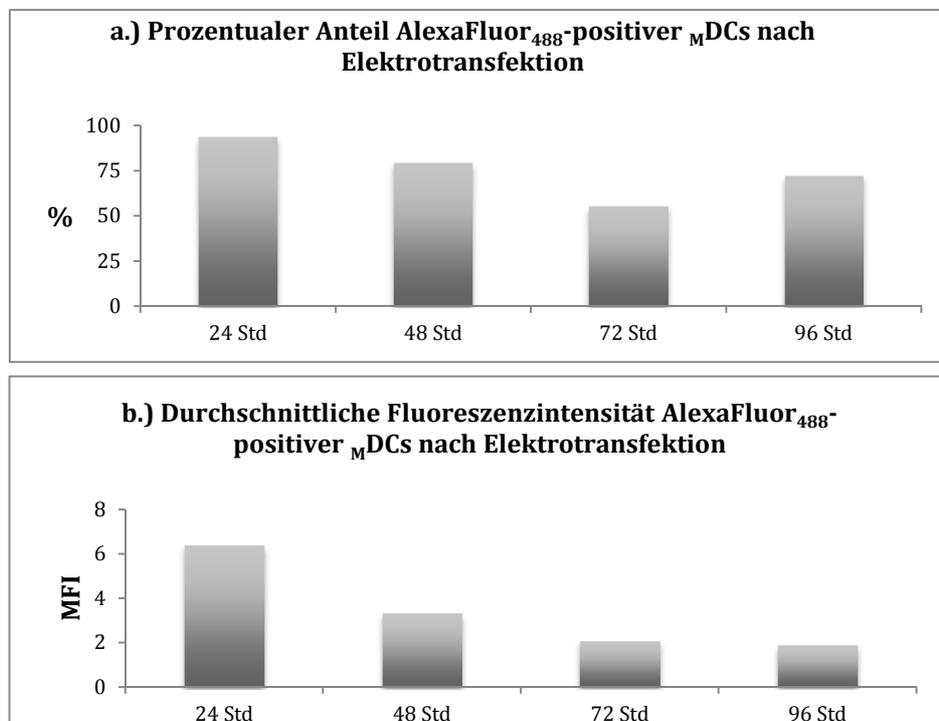


Abbildung 36b.:
Graphische Darstellung des prozentualen Anteils AlexaFluor₄₈₈-positiver $mDCs$ (a.) und der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (b.) gemessen über einen Zeitraum von 96 Stunden in 4 Messungen in Abständen von jeweils 24 Stunden (24Std, 48Std, 72Std, 96Std)

Aus den Diagrammen geht hervor, dass in Abhängigkeit der Zeit sowohl der Anteil fluoreszierender Zellen als auch die durchschnittliche Fluoreszenzintensität mit der Ausnahme eines leichten Anstiegs der AlexaFluor₄₈₈-positiven Zellen, der nach 96 Stunden zu vermerken ist, kontinuierlich abnimmt.

Basierend auf den Ergebnissen der Vorversuche zur Optimierung der Elektrotransfektion, wurden alle folgenden Transfektionen durch Elektroporation bei 1450V, 20ms und 1 Puls durchgeführt. Elektroporierte $mDCs$ wurden für weitere 24 Stunden kultiviert und im Anschluss für Experimente verwendet.

4.5.2.2.2. Einfluss der EP mit GM2A-siRNA auf das Expressionsmusters der CD-Moleküle von unreifen und LPS-gereiften $mDCs$

Die Expression bestimmter Oberflächenmarker zu bestimmten Zeitpunkten in der DC-Entwicklung spielen eine große Rolle für ihre Aufgabe als APC. Während unreife DCs vornehmlich CD-Moleküle exprimieren, welche zur Antigenaufnahme von Nutzen sind, unterliegen diese Zellen nach Antreffen entsprechender Reifestimuli wie z.B. LPS, einer immensen Umstrukturierung, welche die Hochregulierung bestimmter CD-Moleküle mit sich zieht um eine effektive Antigen-Präsentation zu gewährleisten.

Um den Einfluss der GM2A-siRNA Transfektion auf das Expressionsmuster der CD-Moleküle zu untersuchen, wurde eine immunologische Charakterisierung mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper durchgeführt.

Ergebnisse

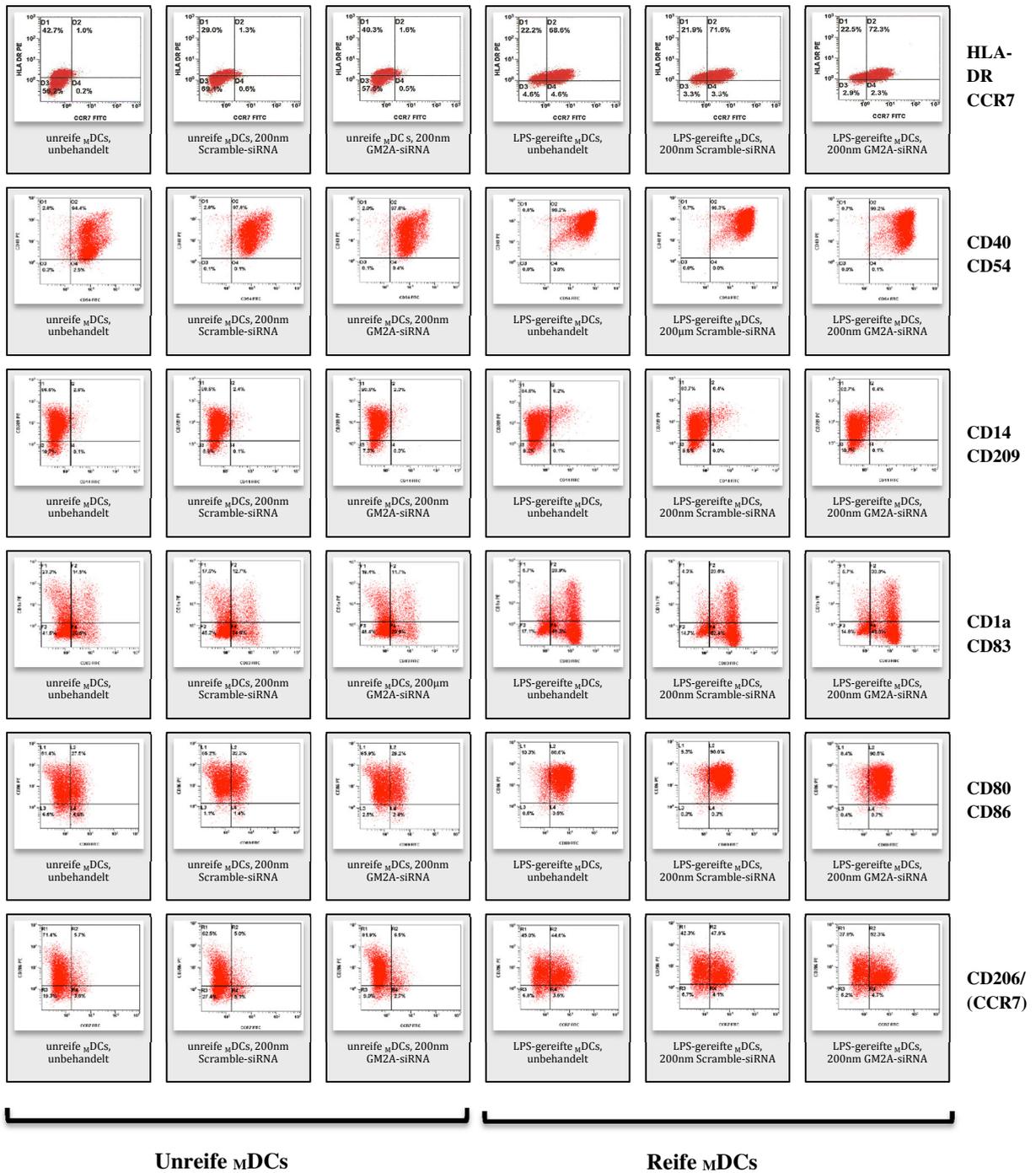


Abbildung 37a:

Unreife und LPS-gereifte mDCs wurden nach Elektrotransfektion mit entweder 200µm Scramble-siRNA oder 200µm GM2A-spezifischer siRNA hinsichtlich ihrer Expression bestimmter Oberflächenmoleküle (HLA DR; CD40/CD54; CD14/CD209; CD1a/CD83; CD80/CD86; CD206/CCR7) untersucht. Unreife und LPS-gereifte unbehandelte mDCs dienen als Kontrolle. Eine immunologische Markierung der jeweiligen CD-Moleküle wurde mittels FITC- oder PE-gekoppelter Antikörper im Durchflusszytometer nachgewiesen. Die dargestellten Ergebnisse der durchgeführten Messungen dienen exemplarisch für >5 unabhängig durchgeführte Experimente.

Die Expression der untersuchten CD-Oberflächenmoleküle von unreifen $mDCs$ und LPS-gereiften $mDCs$ im Vergleich entspricht wie zuvor weitestgehend den Erwartungen.

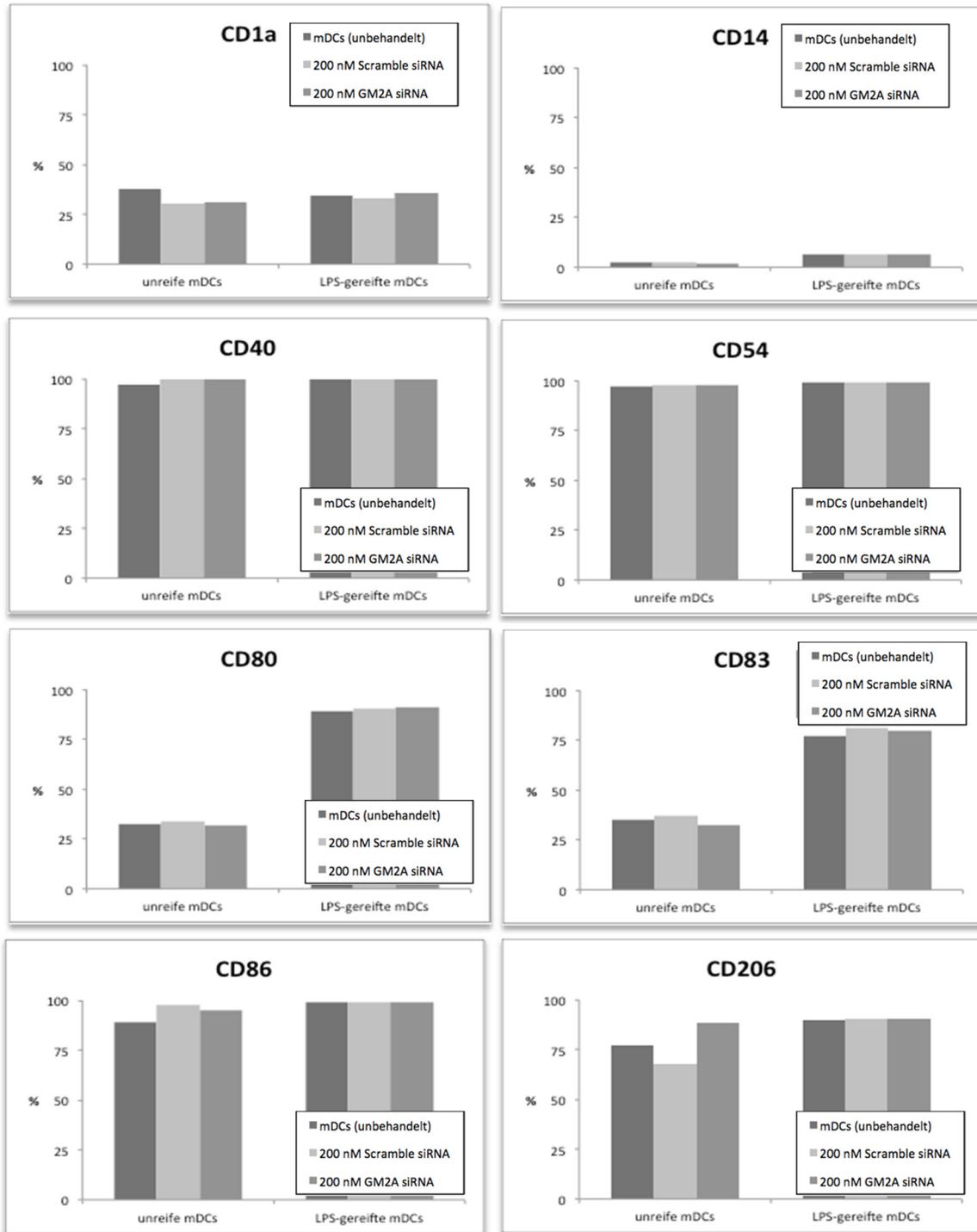
Während CD40, CD54, CD86, CD206 und CD209 permanent auf einem sehr hohen Niveau zwischen 80-100% exprimiert werden, steigen die Expressionen von HLA-DR, CD80, CD83 und CCR7 in LPS-gereiften $mDCs$ um mindestens 50% - verglichen zu ihrer Expression auf der Oberfläche unreifer $mDCs$ - an.

Der Monozytenmarker CD14 wird mit unter 10% nur von einer Minderheit der unreifen und reifen $mDCs$ exprimiert. Der Anteil CD14-exprimierender $mDCs$ steigt nach LPS-Stimulation minimal an. Die moderate Expression von CD1a auf den unreifen $mDCs$ bleibt relativ unveränderlich auf den LPS-gereiften $mDCs$. (Abb. 37a./b.)

In einer Mehrzahl unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, konnte schon bei unreifen $mDCs$ eine >90%ige CD80-Expression, die bei LPS-gereiften $mDCs$ konstant hochreguliert blieb, nachgewiesen werden. Stattdessen exprimierte nur ein geringfügiger Anteil der unreifen $mDCs$ CD86, welcher sich jedoch nach LPS-Stimulation auf >90% verdoppelte. (Daten nicht aufgeführt) Des Weiteren gab es relativ starke Variationen in der Expression von HLA DR und CD1a in Abhängigkeit vom jeweiligen Spender.

Die Transfektion unreifer und LPS-gereifter $mDCs$ durch EP mit GM2A-siRNA führt bei der durchflusszytometrischen Untersuchung zu keinen nachweislichen Alterationen des Expressionsmusters der CD-Oberflächenmoleküle. (Abb.37a./b.) Um eventuelle Einflüsse des Elektroporationsvorganges auf das Expressionsmuster der CD-Antigene auszuschließen, wurden parallel zur GM2A-siRNA zusätzliche Ansätze mit einer „Scramble“-siRNA elektroporiert. Eine durch Elektroporation verursachte Modifikation des Expressionsmusters ist demnach auszuschließen.

Ergebnisse



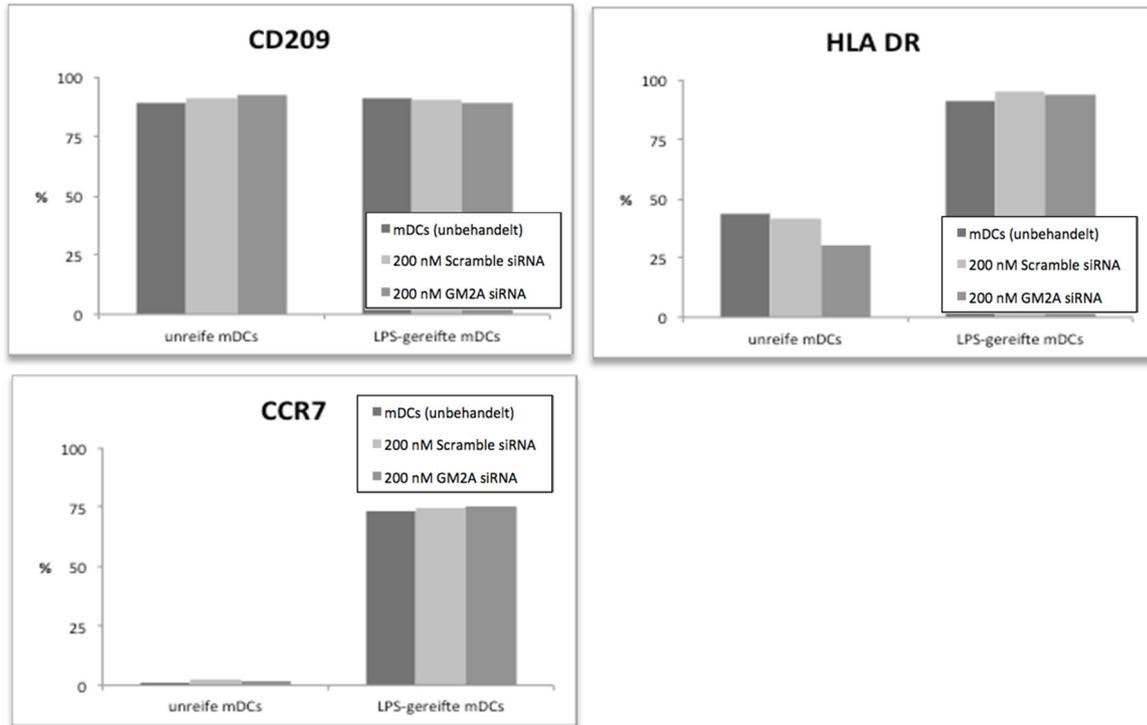


Abbildung 37b:

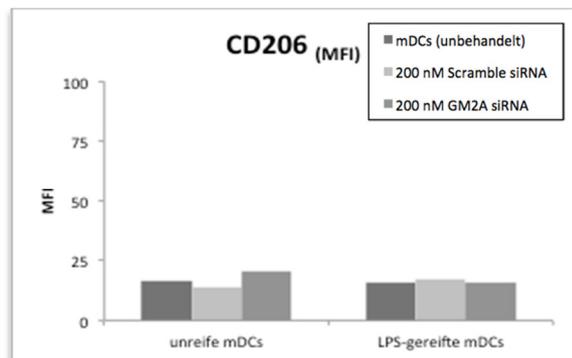
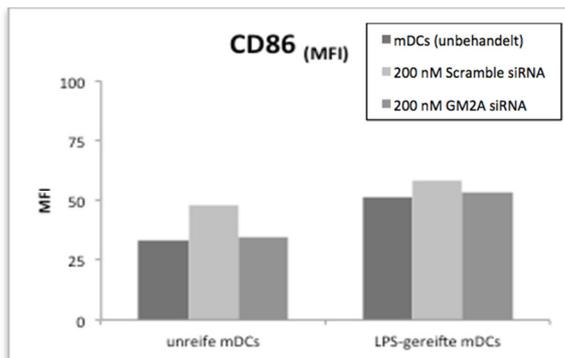
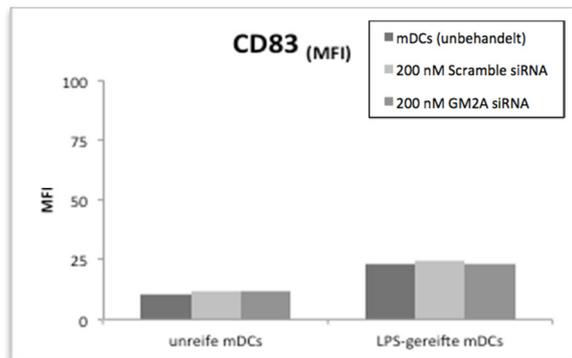
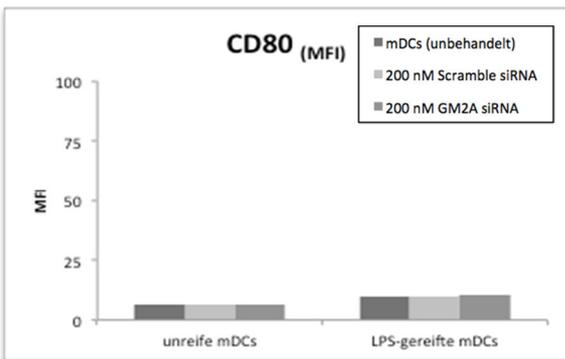
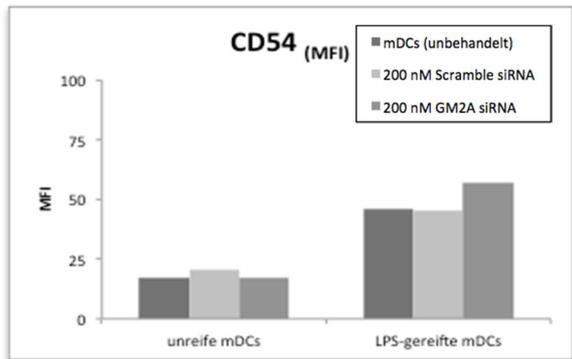
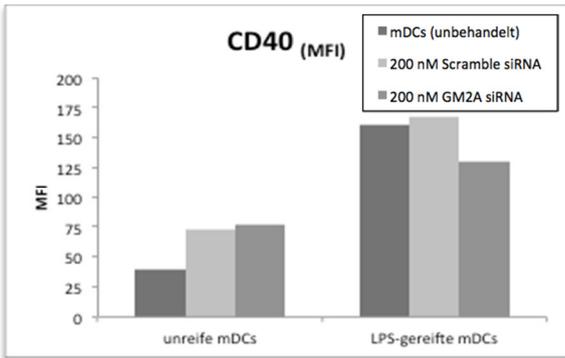
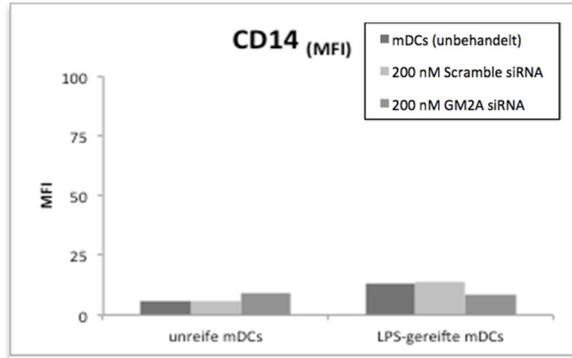
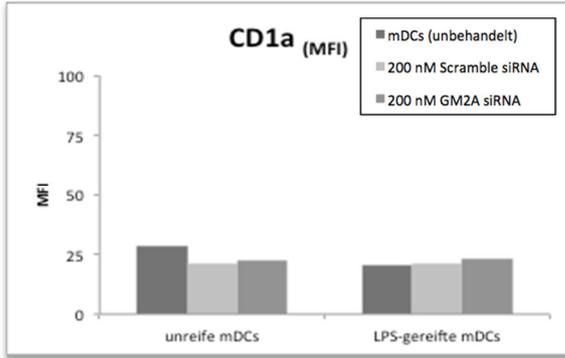
Graphische Darstellung des prozentualen Anteils der mDCs, deren Markierung mit dem entsprechend spezifischen Antikörper für das jeweilige CD-Molekül per FACS nachgewiesen werden konnte. Unreife und LPS-gereifte mDCs wurden nach Elektrotransfektion mit entweder 200nm Scramble-siRNA oder 200nm GM2A-spezifischer siRNA hinsichtlich ihrer Expression bestimmter Oberflächenmoleküle (CD1a, CD14, CD40, CD54, CD80, CD83, CD86, CD206, CD209, HLA DR, CCR7) untersucht. Unreife und LPS-gereifte unbehandelte mDCs dienen als Kontrolle. Die dargestellten Ergebnisse der durchgeführten Messungen dienen exemplarisch für >5 unabhängig durchgeführte Experimente.

Obwohl CD40 und CD54 zu jedem Zeitpunkt der mDC-Differenzierung auf nahezu 100% der Zellen exprimiert wird, sieht man anhand der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität eine auf LPS-Stimulation basierende Hochregulierung der Expression dieser CD-Antigene auf der Oberfläche der gereiften mDCs. (Abb.37c.)

Auch die durchschnittliche Fluoreszenzintensität von CD83 und CD86 steigt nach LPS-Stimulation der mDCs an. (Abb. 37c.)

Die intensivste Steigerung erfolgt für CD40 um ein 4-faches (MFI:160,9) gefolgt von CD54 (3-fach; MFI:45,7) und CD86 (1,5-fach; MFI:51). CD83 steigert sich um das doppelte und erreicht einen vergleichsweise niedrigen MFI von 23,4.

Ergebnisse



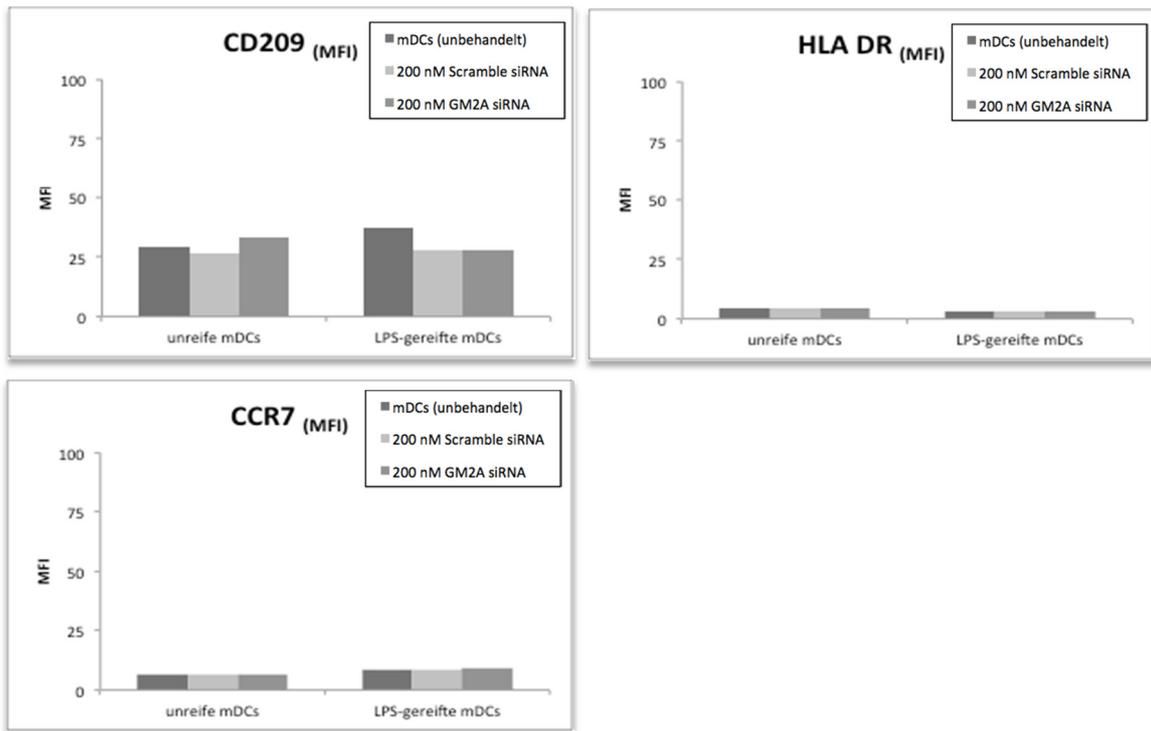


Abbildung 37c:

Graphische Darstellung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität der mDCs, deren Markierung mit dem entsprechend spezifischen Antikörper für das jeweilige CD-Molekül per FACS nachgewiesen werden konnte. Unreife und LPS-gereifte mDCs wurden nach Elektrotransfektion mit entweder 200nm Scramble-siRNA oder 200nm GM2A-spezifischer siRNA hinsichtlich ihrer Expression bestimmter Oberflächenmoleküle (CD1a, CD14, CD40, CD54, CD80, CD83, CD86, CD206, CD209, HLA DR, CCR7) untersucht. Unreife und LPS-gereifte unbehandelte mDCs dienen als Kontrolle. Die dargestellten Ergebnisse der durchgeführten Messungen dienen exemplarisch für >5 unabhängig durchgeführte Experimente.

Elektrotransfizierte mDCs weisen Veränderungen im Expressionsprofil von CD40, CD54, CD86 und CD209 auf. (Abb. 37c.) Während die Konzentration der CD40-Moleküle auf unreifen elektrotransfizierten mDCs steigt, sinkt sie bei den GM2A-siRNA-transfizierten LPS-gereiften mDCs im Vergleich zur Konzentration auf den LPS-gereiften Kontrollzellen (unbehandelt; Scramble-siRNA). Während dem Elektroporationsvorgang an sich die Steigerung der CD40-Konzentration auf den unreifen mDCs zu Grunde liegt (MFI-Differenz: 33), ist die Minderung der CD40-Expression bei den LPS-gereiften mDCs nur bei den GM2A-siRNA-transfizierten Zellen nachweisbar (MFI-Differenz: 30). Obwohl sich die leichte Minderung der CD40-Konzentration auf LPS-gereiften GM2A-siRNA-transfizierten mDCs in zwei weiteren unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten reproduzieren ließ (Daten nicht aufgeführt), konnte dieser Effekt in der Mehrheit der Experimente nicht nachgewiesen werden.

Die durchschnittliche Expression von CD54 auf der Zelloberfläche der GM2A-siRNA-transfizierten LPS-gereiften mDCs steigt minimal um 10 an. Da diese Steigung lediglich

geringfügig ist und in keinem der anderen durchgeführten Experimente wiederholt zu beobachten war, scheint sie nicht von Bedeutung zu sein und einem Meßfehler zu Grunde zu liegen.

Auch sind die Veränderungen im Expressionsprofi von CD86 und CD209 zu uneinheitlich, als dass sie der GM2A-Inhibition durch siRNA zu Grunde lägen. Mit hoher Wahrscheinlichkeit wurden sie durch mechanische Reize beim Handling oder/und durch dem Elektroporationsvorgang verursacht.

Es bleibt festzuhalten, dass die Stilllegung des GM2AP-Gens durch Elektrotransfektion mit einer spezifischen siRNA weder das quantitative noch das qualitative Expressionsprofil der CD-Antigene unreifer und LPS-gereifter $mDCs$ beeinflusst, und dass gemessene Schwankungen andere Ursachen haben.

4.6. Migration

Im Laufe ihres Lebens treffen dendritische Zellen auf Antigene, welche im Zuge ihrer Reifung prozessiert und auf ihrer Zelloberfläche präsentiert werden. Um eine Immunreaktion auszulösen müssen die DCs aus den peripheren Geweben zu den sekundären lymphatischen Organen wandern, wo sie auf Zellen des adaptiven Immunsystems treffen. Erst durch den Antigenkontakt entwickeln DCs migratorisches Potential indem sie entsprechende Rezeptoren ausbilden um anhand eines Chemokingradienten zu den Lymphknoten und/oder der Milz etc. zu gelangen.

4.6.1. Inhibition der HexA durch PUGNAc beeinflusst die mDC -Migration

Im Rahmen der funktionellen Untersuchungen der $mDCs$ wurden die Auswirkungen des PUGNAc-Inhibitors auf deren Migrationsverhalten mittels eines entsprechenden Migrationsassays durchgeführt. Hierbei wurden die verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors in Kombination mit LPS als Reifestimulus wie unter 3.2/3.3. beschrieben, verabreicht. Die Messungen der DMSO-Kontrollen vor und nach LPS-Zugabe im Vergleich entsprachen im Ergebnis den Erwartungen; Ansätze ohne LPS-Zugabe, also unreife $mDCs$, wiesen eine lediglich geringe Migrationsrate auf. LPS-gereifte $mDCs$ migrierten im Transwell-Assay um ein vielfaches stärker in Richtung des Chemokines Mip-3 β (Abb.38).

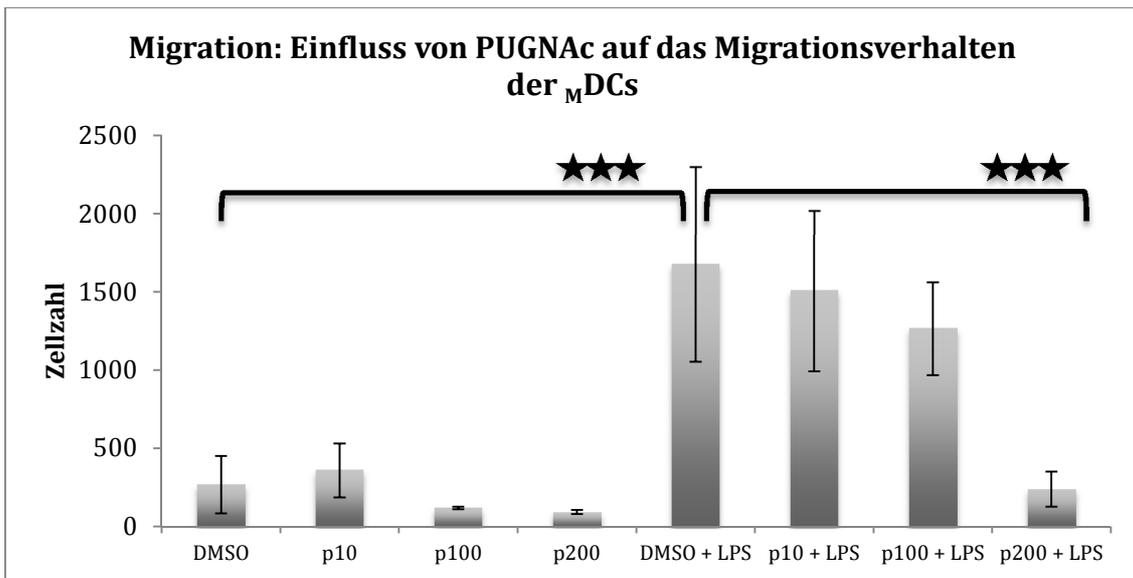


Abbildung 38:

Die Migrationsfähigkeit von unreifen und LPS-gereiften $mDCs$ wurde nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen PUGNac (p10, p100, p200) mittels Erzeugung eines Mip-3 β -Chemokingradienten analysiert. DMSO-behandelte Zellen dienen als Kontrolle. LPS-stimulierte $mDCs$ weisen eine hochsignifikante 6fache Steigerung gegenüber unreifen $mDCs$ auf (DMSO : DMSO + LPS ; $p < 0,001$); Die Balken repräsentieren die Zellzahl migrierter $mDCs$ und sind Durchschnittswerte aus 12 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten \pm SD. Signifikanzen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelt.

Durch die Zugabe von PUGNac wird die geringfügige Migrationsrate der unreifen $mDCs$ nicht beeinflusst. Den Erwartungen entsprechend ist der erzielte Wert um ein 6faches niedriger als die Anzahl migrationsfähiger Zellen, welche durch LPS-Stimulation gereift sind (Abb.38; vergl. DMSO : DMSO + LPS). Durch die Zugabe von PUGNac wird die Migrationsrate der LPS-gereiften $mDCs$ beeinträchtigt. Es ist eine Entwicklung ersichtlich, in der mit ansteigender PUGNac Konzentration die reifen $mDCs$ zunehmend ihre Migrationsfähigkeit verlieren. Bei einer Konzentration von 200 μ M war die Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (DMSO + LPS) um durchschnittlich 86% verringert.

4.6.2. Einfluss der GM2A-Inhibition durch siRNA auf das Migrationsverhalten von $mDCs$

Nach der Elektroporation unreifer und LPS-gereifter $mDCs$ mit GM2A-spezifischer siRNA (s. 3.6.) wurde zur Analyse eines möglichen, daraus resultierenden Effektes auf das Migrationsverhalten der Zellen, ein entsprechender Test durchgeführt.

Wie zuvor beschrieben, weisen die Kontrollansätze auch hier eine \approx 87% höhere Migrationsrate der LPS-gereiften $mDCs$ gegenüber den unreifen $mDCs$ auf. (Abb.39)

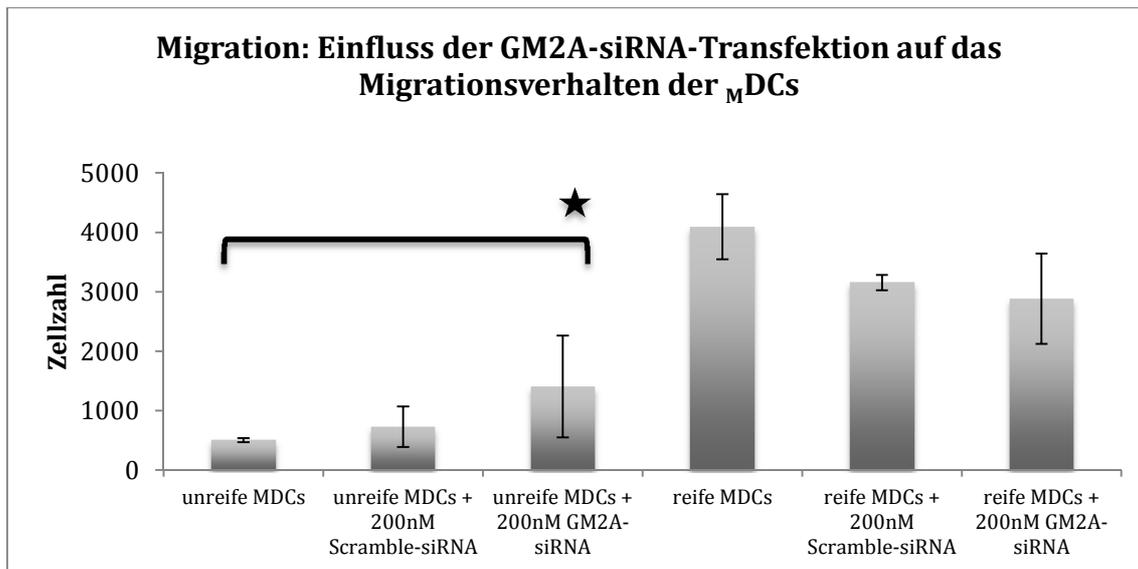


Abbildung 39:

Die Migrationsfähigkeit von unreifen und LPS-gereiften $MDCs$ wurde nach EP mit GM2A-spezifischer siRNA mittels Erzeugung eines Mip-3 β -Chemokingradienten analysiert. unbehandelte bzw. Scramble-siRNA-elektrotransfizierte Zellen dienen als Kontrolle. LPS-stimulierte $MDCs$ weisen eine hochsignifikante 8fache Steigerung gegenüber unreifen $MDCs$ auf ($p < 0,001$); Die Balken repräsentieren die Zellzahl migrierter $MDCs$ und sind Durchschnittswerte aus 6 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten \pm SD. Signifikanzen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelt.

Der Graphik ist zu entnehmen, dass es nach Elektroporation der unreifen $MDCs$ mit der GM2A-spezifischen siRNA zu einem leichten Migrationsanstieg – der jedoch bestenfalls marginal signifikant ist – kommt. Des Weiteren wird im Vergleich der mit Scramble-siRNA elektroporierten und der GM2A-siRNA-transfizierten unreifen $MDCs$ ersichtlich, dass nicht der Einsatz der GM2A-spezifischen siRNA, sondern viel eher der Elektroporationsvorgang an sich eine Steigerung der Rate zu Folge hat. (keine Signifikanz; unreife $MDCs$: scramble-siRNA-transfizierte unreife $MDCs$; $p > 0,05$)

Die Transfektion der LPS-gereiften $MDCs$ weist genau gegenteiliges Phänomen auf; die elektroporierten Zellen migrieren etwas schwächer als die unbehandelten. Eine Signifikanz ließ sich nicht ermitteln ($p > 0,05$).

4.7. Phagozytose

Unreife DCs patrouillieren in den peripheren Geweben um via Phagozytose/Endozytose antigenes Material zu erkennen und internalisieren. In ihrer Funktion als Initiator einer antigenspezifischen Immunreaktion spielt dieses Vermögen eine zentrale Rolle. Nach einem Antigenkontakt kommt es in der jeweiligen dendritischen Zelle zu einer Umstrukturierung; einhergehend damit verliert die dendritische Zelle ihre phagozytotische Kapazität. ^[450]

In diesem Funktionsassay wurde das Phagozytoseverhalten unreifer und reifer mDCs anhand der Aufnahme von FITC-gekoppeltem Dextran untersucht. Das Homoglykan Dextran fungiert als potentes Antigen und lässt sich über die Koppelung an FITC leicht mittels Durchflusszytometrie in den Zellen nachweisen, wenn es von diesen aufgenommen wurde.

4.7.1 Inhibition der HexA durch PUGNac führt zu einer reduzierten Phagozytose der unreifen mDCs

Zunächst kann man anhand der DMSO-Kontrollen im Vergleich feststellen, dass durch unreife mDCs mehr FITC-Dextran aufgenommen wurde als durch die LPS-gereiften. Mit einer ungefähr doppelt so hohen Phagozytoserate der unreifen mDCs gegenüber der Reifen ergibt sich eine signifikante Differenz bezüglich dieser Aktivität in Hinblick auf den Einfluss von LPS als Reifestimulus.

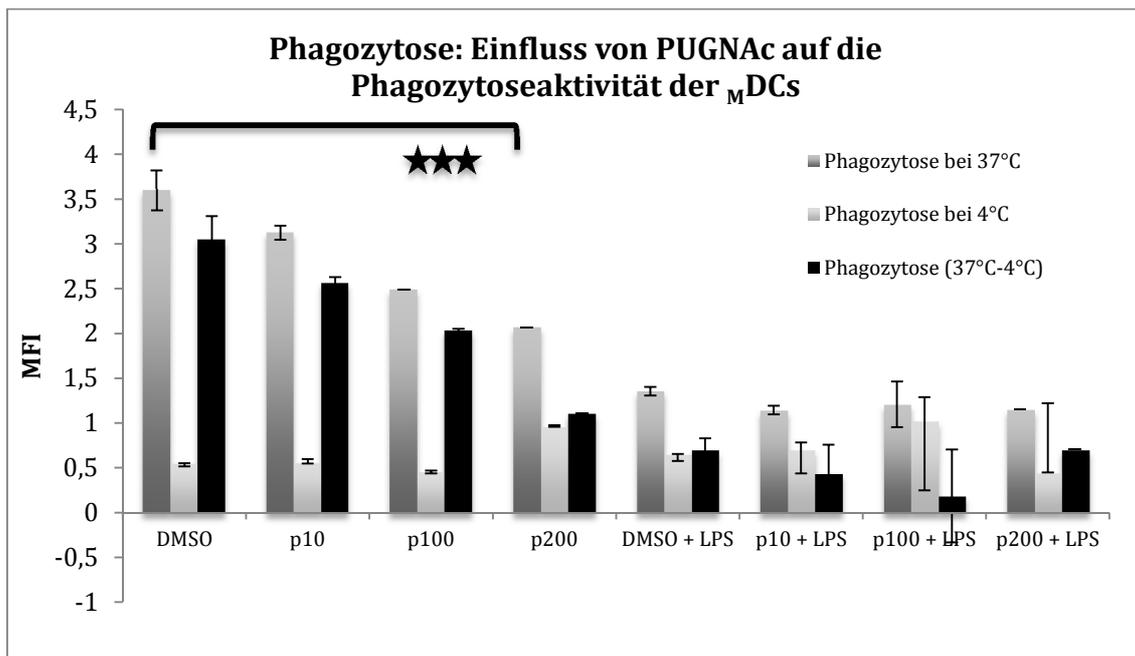
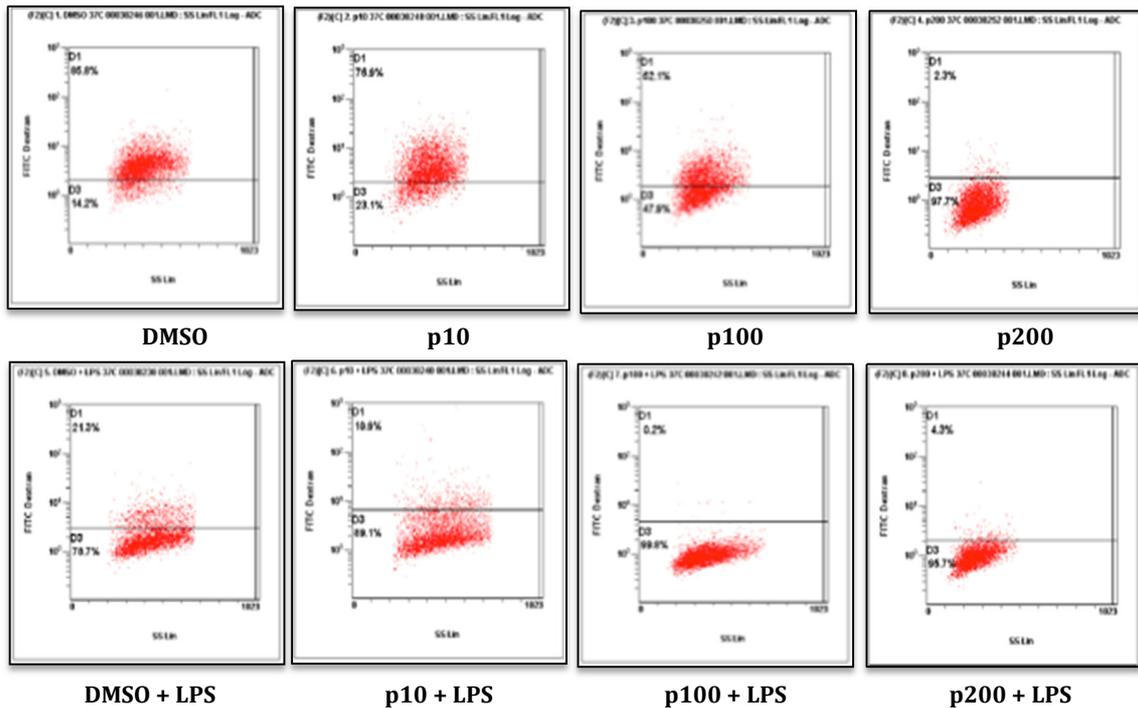


Abbildung 40:

(oben): Die Phagozytoseaktivität von unreifen und LPS-gereiften mDCs wurde nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen PUGNac (p10, p100, p200) durch Phagozytose von FITC-Dextran analysiert. DMSO-behandelte Zellen dienen als Kontrolle. Messungen wurden bei 4°C bzw. 37°C durchgeführt und die Differenz berechnet. Unreife mDCs weisen eine 2,6fache Steigerung gegenüber LPS-gereiften mDCs auf (DMSO : DMSO + LPS ; $p < 0,001$); Die Balken repräsentieren die MFI und sind Durchschnittswerte aus 9 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten \pm SD. Signifikanzen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelt. (unten): Exemplarische Darstellung der Phagozytose in Dot Plots bei 37°C



Um eventuelle Einflüsse des PUGNac Inhibitors auf diese Eigenschaft zu untersuchen, wurde dieser in ansteigenden Konzentrationen (10 μ M, 100 μ M und 200 μ M) den Zellen verabreicht. In den Messungen ergab sich trotz sehr hoher Standardabweichungen eine signifikante konzentrationsabhängige Minderung ($p < 0,001$) der Phagozytoserate der unreifen $mDCs$ um bis zu 65% bei 200 μ M PUGNac. Bei den LPS-gereiften $mDCs$ verbleibt die Rate annähernd auf dem Niveau der DMSO-Kontrolle.

4.7.2. Einfluss der GM2A-Inhibition durch siRNA auf die Phagozytose von $mDCs$

Das Diagramm zeigt, dass die gemessene Menge des phagozytierten FITC-Dextrans in unreifen $mDCs$ ungefähr doppelt so hoch ist gegenüber der nachweisbaren Menge in LPS-gereiften $mDCs$.

Die Transfektion mit GM2A-spezifischer siRNA hat keine Auswirkungen auf das Phagozytoseverhalten von $mDCs$. Unabhängig von ihrem Reifegrad (unreif / LPS-gereift) bleibt die gemessenen durchschnittliche Fluoreszenzintensität auf gleichem Level wie die jeweilige Kontrolle. Die EP hat ebenfalls keinen Einfluss auf die Phagozytoserate (Abb.41; s. Scramble-siRNA).

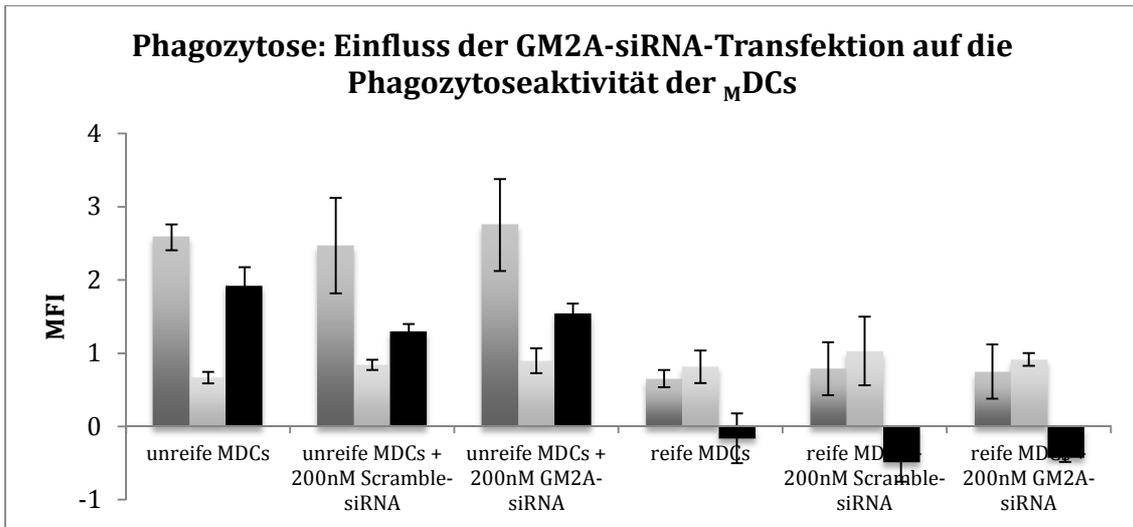
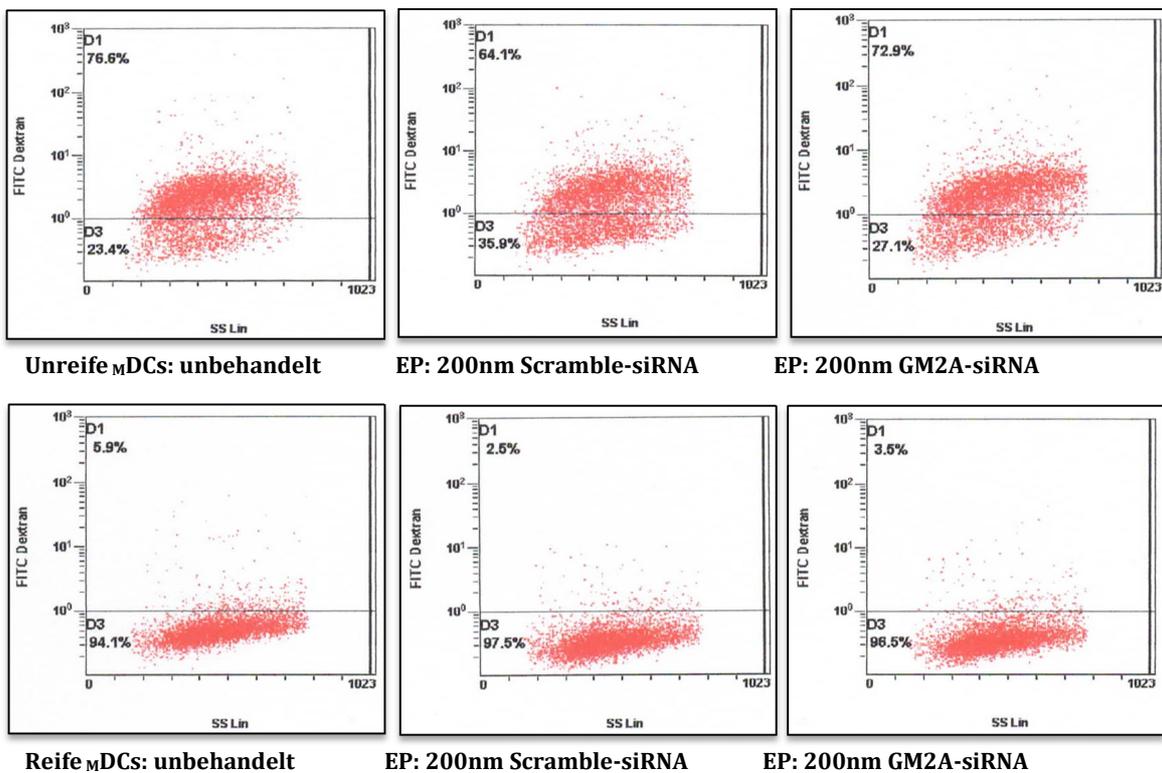


Abbildung 41:

(oben): Die Phagozytoseaktivität von unreifen und LPS-gereiften $mDCs$ wurde nach EP mit GM2A-spezifischer siRNA durch Phagozytose von FITC-Dextran analysiert. Unbehandelte bzw. Scramble-siRNA-elektrotransfizierte Zellen dienen als Kontrolle. Messungen wurden bei 4°C bzw. 37°C durchgeführt und die Differenz berechnet. Unreife $mDCs$ weisen eine 3,7fache Steigerung gegenüber LPS-gereiften $mDCs$ auf. Die Balken repräsentieren die MFI und sind Durchschnittswerte aus 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten \pm SD. Signifikanzen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelt. (unten): Exemplarische Darstellung der Phagozytose in Dot Plots bei 37°C



4.8. MLR (Mixed-Lymphocyte-Reaction)

Reife DCs haben die Kapazität T-Zellen zu stimulieren und diese zur Proliferation anzuregen. Mit dieser Fähigkeit gelten sie als der zentrale Verankerungspunkt zwischen angeborener und adaptiver Immunreaktion. Um einen möglichen Einfluss des Inhibitors auf diese Stimulationsfähigkeit zu eruieren, wurde anhand einer gemischten Lymphozyten-Reaktion (*engl. mixed lymphocyte reaction; MLR*) die allostimulatorische Kapazität der $mDCs$ bestimmt. Im MLR werden $mDCs$ eines Spenders mit Lymphozyten eines anderen Spenders gemischt. Die DC-induzierte Proliferationsrate der T-Zellen wird durch den Einbau von Tritium-markiertem Thymidin in die DNA bestimmt.

4.8.1. Inhibierung von HexA mindert die allostimulatorische Kapazität von $mDCs$

Da die MHC Moleküle der $mDCs$ als Antigene erkannt werden, wenn sie fremde Peptide wie LPS präsentieren, beginnen die T Zellen nach Kontakt mit LPS-gereiften $mDCs$ zu differenzieren und proliferieren (Abb.42; vergl. DMSO : DMSO+LPS).

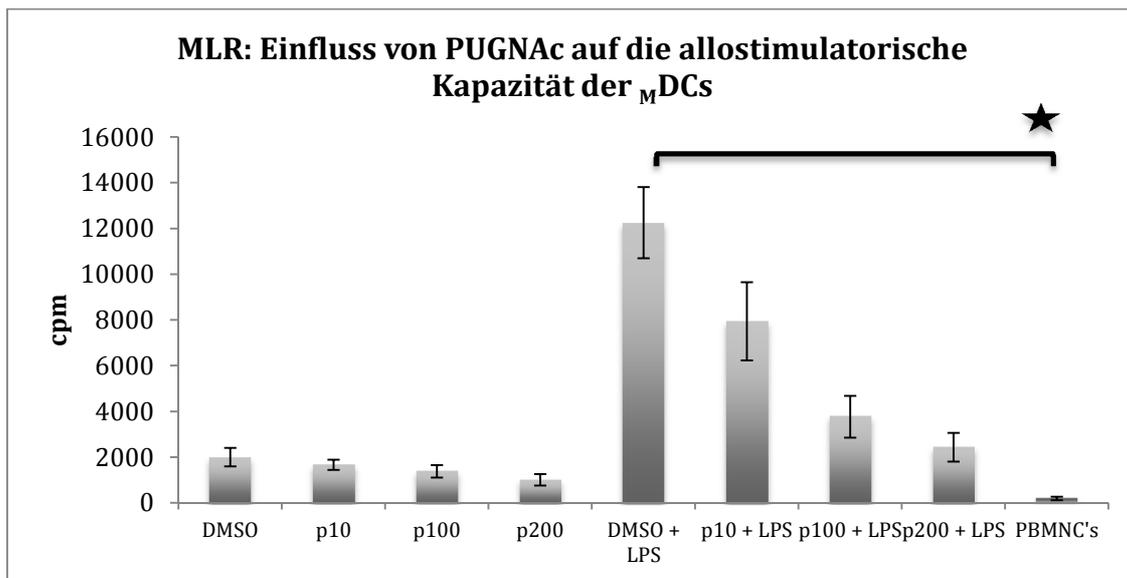


Abbildung 42:

Die allostimulatorische Kapazität von unreifen und LPS-gereiften $mDCs$ wurde nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen PUGNAc (p10, p100, p200) durch eine gemischte Lymphozytenreaktion (MLR) analysiert. $mDCs$ wurden zusammen mit PBMCs in 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät und für 72Std. kultiviert. Zellen wurden dann mit (^3H) -Thymidin für 24Std gepulst, geerntet und die Filter wurden gezählt. DMSO-behandelte Zellen dienen als Kontrolle, PBMCs als Referenz. LPS-gereifte $mDCs$ weisen eine 6fache Steigerung gegenüber unreifen $mDCs$ auf; Die Balken repräsentieren die Zählung/Min. (cpm) und sind Durchschnittswerte aus 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten \pm SD. Signifikanzen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelt.

Die Tatsache, dass T-Lymphozyten nach entsprechender Stimulation durch DCs beginnen zu differenzieren und proliferieren, spiegelt sich hier im Diagramm wieder; bei

Betrachtung der DMSO Kontrollen der unreifen und reifen $mDCs$ im Vergleich zeigt sich, dass die Proliferationsrate der T Zellen um ein 6-faches durch Stimulation mittels reifer $mDCs$ gesteigert ist. Unter Einfluss des Inhibitors sinkt die Proliferationsrate rapide um bis zu 80% ab. (Marginale Signifikanz; $p < 0,05$)

4.8.2. Einfluss der GM2A-Inhibition durch siRNA auf die allostimulatorische Kapazität von $mDCs$

Mit einer 30%igen Steigerung der gezählten T-Lymphozyten pro Minute bei Stimulation durch LPS-gereifte $mDCs$ gegenüber unreifen $mDCs$ ergibt sich lediglich eine marginal signifikante Steigerung der allostimulatorischen Kapazität der LPS-gereiften $mDCs$.

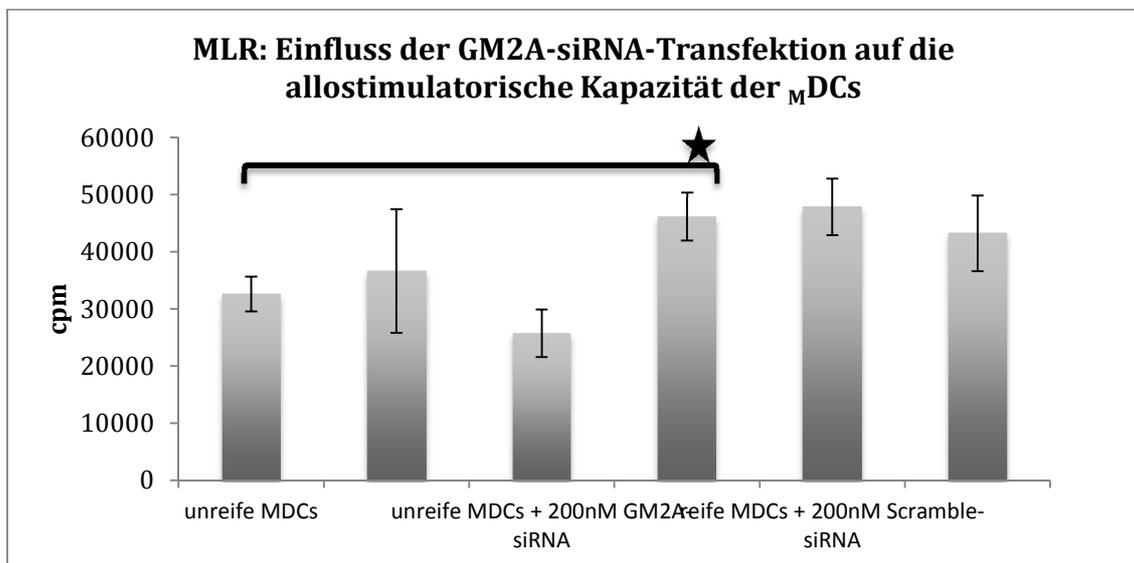


Abbildung 43:

Die allostimulatorische Kapazität von unreifen und LPS-gereiften $mDCs$ wurde nach EP mit GM2A-spezifischer siRNA durch eine gemischte Lymphozytenreaktion (MLR) analysiert. $mDCs$ wurden zusammen mit PBMCs in 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät und für 72Std. kultiviert. Zellen wurden dann mit 3H -Thymidin für 24Std gepulst, geerntet und die Filter wurden gezählt. Unbehandelte bzw. Scramble-siRNA-elektrotransfizierte Zellen dienen als Kontrolle, PBMCs als Referenz. LPS-gereifte $mDCs$ weisen nur eine 1,4fache Steigerung gegenüber unreifen $mDCs$ auf; Die Balken repräsentieren die Zählung/Min. (cpm) und sind Durchschnittswerte aus 8 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten \pm SD. Signifikanzen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelt.

Die EP der unreifen und LPS-gereiften $mDCs$ mit entweder Scramble-siRNA oder GM2A-spezifischer siRNA bewirkt keine ersichtliche Änderung in Hinblick auf die T-Zell-Stimulationsfähigkeit der $mDCs$.

4.9. Veränderungen des Zytokinsekretionsprofils von $mDCs$ nach PUGNAc-Exposition

Zytokine sind kleine lösliche Proteine und Glykoproteine, welche durch diverse Zelltypen in nano- oder pico-molaren Konzentrationen freigesetzt werden – üblicherweise durch einen aktivierenden Stimulus – und durch Bindung an spezifische Rezeptoren entsprechende Immun- und Entzündungsreaktionen auslösen bzw. modulieren und die Hämatopoiese medieren. Sie können dabei in einer autokrinen, parakrinen oder sogar endokrinen Art und Weise wirken indem sie auf die Zelle, durch welche sie freigesetzt werden, einwirken oder Einfluss auf benachbarte Zellen oder entlegene Zellen nehmen. Anhand dieser Wirkungsweise spiegelt sich ihre zentrale Rolle als Kommunikationsmittel bei der Regulation von Immunantworten wider.

Im Körper kommt es nach Antreffen eines Antigens durch z.B. DCs zur Ausschüttung großer Zytokinmengen mit subsequenter Einleitung und Steuerung der Immunzellproliferation und -differenzierung. In Kultur beginnen $mDCs$ nach LPS-Stimulation mit der Produktion und Sekretion verschiedener pro- (u.a. TNF- α , IL-6) und anti- (u.a. IL-10) inflammatorischer Zytokine inklusive Mitgliedern aus der Familie der Chemokine (bsp. RANTES, MIP-1 α). Um zu untersuchen, ob der verwendete Inhibitor und damit indirekt die Verstoffwechslung des GM2-Gangliosides eine mögliche Beteiligung an der *de novo*-Synthese der Zytokine haben, wurden Messungen mittels ELISA durchgeführt. Bei allen gemessenen Zytokinen lässt sich ein erheblicher Anstieg der Sekretion nach LPS-Stimulation vermerken. Größtenteils befindet sich die Zytokinproduktion unreifer $mDCs$ auf einem Level unterhalb der Nachweisgrenze der ELISAs. Die LPS-Stimulation führt zu einem immensen Anstieg der Zytokinkonzentration in allen Fällen.

Einen besonders hohen Konzentrationsanstieg weisen TNF- α und Mip-1 α mit 69.107 pg/ml und 50.955 pg/ml auf, gefolgt von IL-6 (41.453 pg/ml) und RANTES (22099 pg/ml). (s. Abb.44; Vergl. DMSO : DMSO + LPS) Während es bei den pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α zu einer wesentlichen Konzentrationssteigerung auf über 60.000 pg/ml kommt, lässt sich für das anti-inflammatorische IL-10 ein vergleichsweise sehr geringer Anstieg von ≈ 4600 pg/ml vermerken.

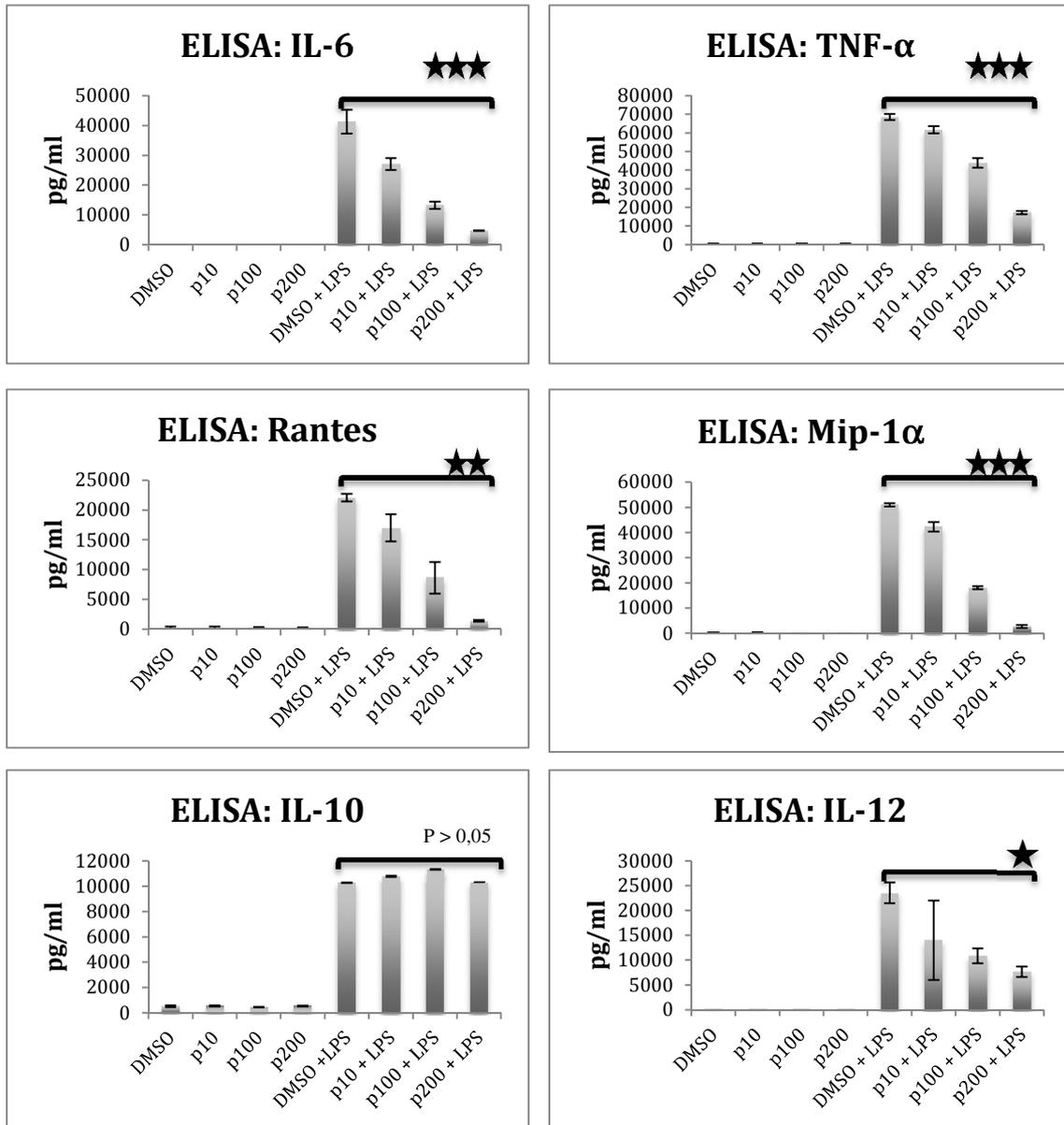


Abbildung 44:

Zytokinexpressionsprofil von unreifen und LPS-gereiften $mDCs$ nach Zugabe von 10 μM , 100 μM und 200 μM PUGNac. DMSO dient als Negativkontrolle. Die Zytokinkonzentration wurde im Zellkulturüberstand mittels ELISA nachgewiesen. Mittelwerte ergeben sich aus mindestens 3 unabhängig voneinander ausgeführten Experimenten und Signifikanzen wurden mittels Durchführung des Mann-Whitney U Test ermittelt ($\star = 0,05 > p$; $\star\star = 0,01 > p$; $\star\star\star = 0,001 > p$).

Ergebnisse

	DMSO	DMSO + LPS	p10 + LPS	p100 + LPS	p200 + LPS
IL-6	0,10 (±0,00)	41,45 (±4,18)	27,04 (±1,97)	13,19 (±1,17)	4,68 (±0,07)
TNF- α	0,36 (±0,01)	69,11 (±1,55)	61,71 (±1,93)	43,93 (±2,62)	17,25 (±0,86)
RANTES	0,22 (±0,21)	22,10 (±0,66)	16,99 (±2,28)	8,61 (±2,67)	1,41 (±0,15)
Mip-1 α	0,31 (±0,00)	50,95 (±0,66)	42,27 (±1,90)	18,11 (±0,60)	2,67 (±0,63)
IL-10	0,52(±0,07)	10,30(±0,04)	10,83(±0,05)	11,34(±0,03)	10,35(±0,03)
IL-12	0,17 (±0,00)	23,60 (±2,15)	13,97 (±8,00)	10,85 (±1,50)	7,65 (±1,04)

***1.000 (pg/ml)**

Die Zugabe des β -Hexoaminidase A- Inhibitors führt bei der LPS-induzierten Sekretion von Mip-1 α , RANTES und IL-6 zu einer konzentrationsabhängigen Minderung der sezernierten Zytokinmenge, die mittels ELISA im Zellüberstand nachgewiesen werden konnte. Bei einer PUGNAc-Konzentration von 200 μ M sinkt die Sekretionsrate bei Mip-1 α fast um das 20-fache gegenüber dem Kontrollwert. Die gemessenen Raten für RANTES und IL-6 um das 16- und 9-fache.

Auch für TNF- α und IL-12 konnte eine Senkung der Sekretionsraten festgestellt werden. Im Vergleich zu den Differenzen zwischen der DMSO-Kontrolle und der höchsten verabreichten Inhibitorkonzentration von 200 μ M der obengenannten Zytokine, ergaben sich jedoch weitaus weniger drastische Senkungen um das 4- bzw. 3-fache.

Das anti-inflammatorische IL-10 behält eine weitgehend konstante relativ geringe Sekretionsrate, die abhängig von einer 200 μ M Inhibitorkonzentration um das doppelte sinkt. Bemerkenswert ist hier die Konzentrationssteigerung von IL-10 bei 10 μ M PUGNAc.

5. Diskussion

Dendritische Zellen stellen das Zentrum des Immunsystems und damit konvergierend einen essentiellen Verankerungspunkt zwischen innater und adaptiver Immunität dar.

Dank ihrer einzigartigen Fähigkeit eine primäre antigenspezifische Immunantwort zu induzieren und zu unterhalten einerseits und andererseits die immunologische Toleranz zu kontrollieren, gelten sie als potenteste Kandidaten für immuntherapeutische Vakzinierungen. Insbesondere bei Tumorerkrankungen kommen DC-basierte Vakzinierungen zum Einsatz.^[269]

In Krebspatienten durchgeführte Studien mit *ex vivo* generierten DCs (aus Monozyten oder hämatopoietischen Vorläufern) belegen, dass DC-basierte Vakzine unbedenklich sind und tatsächlich eine Expansion zirkulierender tumorantigenspezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten induzieren.^[269]

Die komplexen molekularen und zellulären Mechanismen, welche die DC-Immunogenität steuern und beeinflussen sind bis dato weitgehend unverstanden, jedoch notwendig für jeden vernünftigen Entwurf einer Vakzinierung. Darüber hinaus sind schon nach heutigem Wissenstand eine Vielzahl von Variablen zu beachten, welche die Immunogenität des exogen zugeführten Antigens effektiv fördern; dazu zählen vor allem die passenden Reifestimuli (pro-inflammatorische Zytokine und Prostaglandine), die einer möglichen Toleranzbildung vorbeugen, so wie Konditionen, welche die Migration der DCs in die lymphoiden Organe unterstützen.^[13]

Bisherige Versuche durch DC-Vakzinierung Tumor-spezifische Effektorzellen zu induzieren benötigen jedoch weitere Optimierung um eine spezifische Reduktion der Tumormasse und Induktion eines immunologischen Gedächtnisses herbeizuführen und Tumor-Rezidive zu kontrollieren. Problematiken ergeben sich aus dem immunsuppressiven Mikromilieu des malignen Gewebes. Neben dem Herbeiführen einer antigenspezifischen Anergie der DCs durch Freisetzung biologisch aktiver Wirksubstanzen wie IL-10, VEGF und TGF- β ^[100, 106], können bestimmte Faktoren abberant gereifte „pro-Tumor“ DCs erschaffen, welche das Wachstum von malignem Gewebe dann sogar unterstützen.^[11, 88, 359]

In unabhängigen Studien konnte Krebspatienten allgemein ein signifikant reduziertes Vorkommen von vor allem myeloiden zirkulierenden DCs in Tumorumgebung, dem peripheren Blut und sekundären Lymphorganen nachgewiesen werden. Gleichzeitig lässt sich eine Akkumulation von DCs mit unreifem Phänotyp feststellen. Diese DCs haben eine verminderte allostimulatorische Aktivität und exprimieren entsprechend geringe Level co-stimulatorischer Moleküle wie CD80 oder CD86, welche sich auch *in vitro* nicht mehr mittels der entsprechenden Zytokine induzieren lassen.^[79, 256, 277, 387]

Diskussion

Neben der „Cluster of Differentiation“, deren Beteiligung essentiell für die Ausführung einer effektiven Immunantwort ist, haben sich Glykosphingolipide, insbesondere Ganglioside, in sogenannten „Lipid Rafts“ der Zellmembranen als äußerst potente Immunmodulatoren etabliert.^[278] Ebenso wie die CD-Moleküle beeinflussen und steuern sie die Signaltransduktion^[98] Zelldifferenzierung und -proliferation^[427] als auch Apoptose.^[55] Sie sind in Zell-Zell-Erkennungsprozessen^[84] und Interaktionen wie Adhäsion^[51] involviert.

Ganglioside existieren nicht nur in Zell-assoziierten Formen, sondern auch im Plasma - zumeist LDL-gebunden^[335] - und anderen Körperflüssigkeiten. Das Gangliosid-Spektrum in gesunden Menschen ist dabei bemerkenswert stabil mit nur geringfügigen Abweichungen. Das dominierende Gangliosid ist GM3, gefolgt von GD3 und GD1a, dem sich GM2 anschließt.^[335] Die obligatorische Verteilung der Ganglioside im Plasma verweist auf eine strenge Regulation und spricht derer Einhaltung eine besondere Wichtigkeit zu.

Unter pathologischen Zuständen wie Krebs ist das Spektrum der Ganglioside im Plasma durch erhöhte Level und eine veränderte qualitative Verteilung charakterisiert. Beispielsweise lassen sich im Serum Brustkrebs- und Magenkrebs-erkrankter Patienten erhöhte GD3 Level nachweisen.^[350]

Jede differenzierte Zelllinie präsentiert ein einzigartiges Gangliosidmuster. Die dramatischen mit onkogener Transformation assoziierten Änderungen des Metabolismus der Ganglioside und ihrer Zusammensetzung, implizieren für diese Glykolipide eine spezifische Rolle in der Regulation von Zellinteraktionen und des Zellwachstums.^[280] Diese Modifikationen der spezifischen Gangliosidmuster werden mittels unterschiedlicher Mechanismen, wie u.a. der Blockade der Synthese, herbeigeführt.^[120] Die jeweiligen Änderungen in der Gangliosidkomposition sind spezifisch für verschiedenen Tumorzelltypen. Es besteht eine starke Verbindung zwischen gewissen Gangliosidspezies und dem Verhalten der entsprechenden Tumore.^[135] Zum Beispiel überexprimieren maligne Melanome GM3, GM2, GD3 und GD2.^[303] Neuroblastome sind charakterisiert durch Akkumulationen von GM2 und GD2.^[135, 185, 203] Nierenzellkarzinome wiederum haben erhöhte GD1a, GM1 und GM2 Level.^[141]

Es wurde gezeigt, dass Tumor-abstammende Ganglioside die Funktion von Lymphozyten inhibieren.^[114, 181] Die Generierung von zytotoxischen T Lymphozyten^[238] und die Aktivierung und Proliferation von T-Helferzellen^[265] wird unterdrückt. Die Funktion der Monozyten^[184] und die Differenzierung und Reifung von Dendritischen Zellen^[24, 41, 344] unterliegen Modifikationen, die eine effektive Immunantwort beeinträchtigen.

Eine Modulation der Gangliosidexpression kann grundlegende Effekte auf Rezeptor-vermittelte Signale haben, insbesondere die Rezeptor-Tyrosinkinasen Insulin, EGF und

VEGF, welche alle durch Ganglioside reguliert werden. Auf diesem Wege agieren Ganglioside als regulatorische Elemente im Immun- und Nervensystem, in der Stoffwechselregulation und eben auch der Krebsprogression.^[216]

GM2-Metabolismus als Ansatzpunkt zur Anti-Krebstherapie

Entsprechend der vorhergegangenen Ausführungen bietet sich eine Manipulation des Gangliosidmetabolismus in dendritischen Zellen als vielversprechendes Target hinsichtlich einer effektiven Anti-Krebs-Immuntherapie an.

Durch die Erkenntnisse aus der Literatur und den Ergebnissen aus den Vorstudien, in denen sich eine Progression der GM2-Expression in der Entwicklung von Monozyten zu Dendritischen Zellen zeigte (s. 4.1.2.), lässt sich eine essentielle Rolle des GM2 Gangliosides während der Differenzierung annehmen und eine eventuelle immunregulatorische Funktion in den $mDCs$.

Forschungsergebnisse von 2012 haben gezeigt dass GM2-defiziente T-Zellen sich nicht zu CD8⁺-T-Zellen aktivieren lassen.^[246] So wird die Vermutung suggeriert, dass spezifische Gangliosidexpressionen bestimmte Immunfunktionen definieren.

Mit der Hemmung des GM2-Aktivatorproteins einerseits und der β -Hexoaminidase A andererseits wurde im Rahmen dieser Arbeit auf direktem Wege in den Gangliosidmetabolismus, u.a. aber auch in die Funktion des GM2AP als Gangliosidtransporter, der $mDCs$ eingegriffen.

Der erfolgreiche Nachweis des GM2-Aktivatorproteins in humanen dendritischen Zellen gelang erstmalig in dieser Arbeitsgruppe mithilfe einer cDNA-Bibliothek und dem Prinzip der Hybridisierung. Die anschließenden Untersuchungen ergaben eine mit zunehmenden Differenzierungsgrad der $mDCs$ konvergierende, ansteigende Expression des GM2-Aktivatorproteins. (s. 4.1.1.; 4.1.2.) In LPS-gereiften $mDCs$ konnte aber interessanterweise gezeigt werden, dass die Proteinexpression des GM2AP wieder niedriger ist als in unreifen $mDCs$.(Abb.23) Bei gleichzeitig nachgewiesenem Ausbleiben einer Expression dieses Proteins in Monozyten (Abb.22) ist von einer Bedeutung des GM2AP bei immunologischen Prozessen der DCs in ihrer Rolle als APCs auszugehen und gibt damit Anlass zur Erhärtung der Annahme einen möglichen Angriffspunkt zur gezielten Beeinflussung von DC-Funktionen entdeckt zu haben.

Grade bei der Konversion von Monozyten zu DCs und bei der Differenzierung von unreifen zu reifen DCs findet eine ausgedehnte Genregulation statt, welche eine komplette Umstrukturierung der Zelle zur Folge hat. Gerade Gene, welche mit Zelladhäsion und – motilität, Wachstumskontrolle, Regulation der Immunantwort, Antigenpräsentation und dem Lipidmetabolismus verknüpft sind, wurden in ausgedehnten Gen-Expressions-

Analysen (Microarrays, SAGE) in Verbindung mit proteomischen Untersuchungen als differentiell exprimiert identifiziert.^[130, 190]

Durch Nachweis des GM2AP in myeloiden und plasmazytoiden DC-Populationen kann zudem ausgeschlossen werden, dass es sich lediglich in unter *in vitro*-Bedingungen generierten μ DCs finden lässt. (Seltmann, unveröffentlicht)

HexA-Inhibition durch PUGNAc problematisch durch OGA-Inhibition

Beide Strategien, die in dieser Arbeit zur Anwendung kamen um eine Unterbrechung bzw. Minderung des GM2-Metabolismus zu erwirken, erwiesen sich als effektiv. Es gilt jedoch einige Nachteile bzw. Einschränkungen zu beachten, welche einen nicht unerheblich Einfluss auf die erzielten Ergebnisse und deren Deutung haben.

Im Menschen existieren 3 Enzyme, welche terminale β -gebundene N-Acetylhexosaminreste von Glykokonjugaten abspalten. Dazu zählen die beiden dimerischen Isozyme Hexosaminidase A und B (HexA und HexB), welche Mitglieder der Glykosid-Hydrolase Familie 20 (GH20) sind. HexA und HexB sind im Lysosom lokalisiert, wo sie terminale N-Acetylglucosamin- und N-Acetylgalactosaminreste von Glykosphingolipiden wie dem GM2 Gangliosid, welches ein Tetrasaccharid beinhaltet, dass am nicht-reduzierten Ende mit einem N-Acetylgalactosaminrest endet, hydrolisieren.^[170, 224, 369]

Die andere humane Glykosidhydrolase, welche endständige β -gebundene N-Acetylglucosaminreste spaltet ist ein Mitglied der Familie 84 der Glykosid-Hydrolasen und wird O-GlcNAcase (OGA) genannt. Dieses Enzym reguliert zusammen mit der O-GlcNAc Transferase (OGT) die posttranslationale Modifikation vieler eukaryotischer nukleoplasmatischer Glykoproteine durch O-GlcNAcylation an Serin und Threonin.^[383] Torres und Hart entdeckten 1984 die O-linked N-acetylglucosamin (O-GlcNAc) Modifikationen, welche sich als wichtig für die Regulation des Zellzykluses, die DNA Transkription und Translation, Insulinsensitivität und den Abbau von Proteinen erwiesen haben.^[217, 435]

Aufgrund ihrer Beteiligung an u.a. Signalprozessen weist die O-GlcNAc-Modifikation Ähnlichkeiten zur Proteinphosphorylierung auf. Des Weiteren verwendet sie gleiche oder angrenzende Bindungsstellen der Serin-/Threoninreste.^[76, 129, 306, 434]

Vererbbare Mutationen, die zu Beeinträchtigungen der HexA oder HexB führen, resultieren in die neurodegenerativen Erkrankungen Tay-Sachs und Sandhoff, welche aus den Folgen einer Akkumulation von GM2 im Gehirn hervorgehen. Die Konsequenzen einer verminderten O-GlcNAcase-Expression bleiben noch zu erforschen; eine fehlgesteuerte O-GlcNAcylation wird jedoch mit Typ II Diabetes und Alzheimer assoziiert.^[129, 199, 403, 435]

Diskussion

Obwohl O-GlcNAcase und die lysosomalen β -Hexosaminidasen auf unterschiedliche Substrate einwirken und in verschiedenen zellulären Kompartimenten lokalisiert sind, implizieren die katalytischen Mechanismen dieser Enzyme in beiden Fällen eine nukleophile Beteiligung der 2-Acetoamidogruppe der jeweiligen Substrate.^[171, 222, 380] Dieser gemeinsame katalytische Mechanismus erschwert die Entwicklung spezifischer selektiver Inhibitoren für entweder O-GlcNAcase oder HexA.

PUGNAc, als chemischer Inhibitor der HexA, fungiert somit ebenso als Inhibitor der HexB und der O-GlcNAcase (OGA).^[125, 142]

Die Inhibition von OGA durch Anwendung von PUGNAc und der daraus resultierende Anstieg des O-GlcNAc Levels in der Zelle wurden bereits exzessiv untersucht.^[125, 142] Veröffentlichungen zum Einfluss des Inhibitors auf die HexA sind jedoch mehr als dürftig. Obwohl in dieser Arbeit keine wesentliche Reduktion der HexA auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte (Abb.23), ist dennoch davon auszugehen, dass der Einsatz von PUGNAc eine effektive konzentrationsabhängig Inhibition des Enzyms bewirkt hat. Dorfmueller *et al.* beschreiben, dass sich PUGNAc als Antagonist in das aktive Zentrum der HexA setzt und somit durch kompetitive Hemmung die intrinsische Aktivität des Enzyms blockiert.^[76]

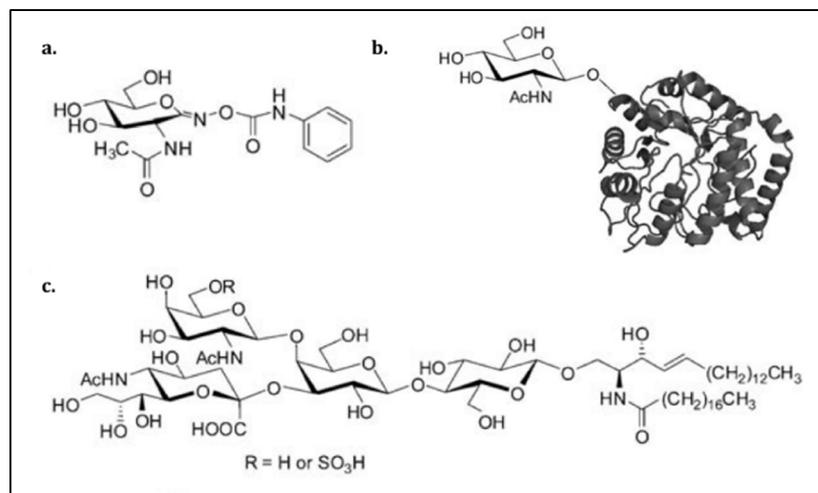


Abbildung 45:
Strukturformeln von a.) PUGNAc, b.) O-GlcNAc und c.) GM2

Nach diesem Prinzip lassen sich auch die konzentrationsabhängigen Veränderungen, die in dieser Arbeit beobachtet werden konnten erklären. (s. 4.Ergebnisse) Da der Antagonist mit dem Agonisten, in diesem Falle nämlich GM2, um die Bindungsstelle im aktiven Zentrum der HexA konkurriert muss dieser entsprechend dem Massenwirkungsgesetz eine größere Affinität besitzen oder in höherer Konzentration vorliegen. Zusätzlich lässt sich annehmen, dass die nachgewiesene konzentrationsabhängige Negativregulation der GM2AP-Expression (Abb.23) indirekt mit der HexA-Inhibition einhergeht. Es lässt sich

davon ausgehen, dass zwischen HexA und GM2AP, als Co-Faktor beim Abbau von GM2, eine Kommunikation stattfindet, welche durch PUGNAc unterbrochen oder negativ moduliert wird.

Aufgrund der differentiellen Regulation von Transkription und Translation^[330], würde sich eine Analyse der HexA auf RNA-Ebene anbieten um weitere Erkenntnisse zu erlangen. Da beide Prozesse nicht notwendigerweise in direkter Korrelation stehen, besteht die Möglichkeit, dass trotz konstantem Proteinlevels eine PUGNAc-bedingte Fehlregulation der Transkription zustande kommt. Einerseits könnten die $mDCs$ die Transkriptionsrate steigern um den funktionellen Verlust zu kompensieren, andererseits kann die Hemmung auch eine Herunterregulierung der Transkription verursachen.

siRNA-Elektrotransfektion als Methode der GM2A-Inhibition

Die zweite in dieser Arbeit verwendete Strategie mit dem Ziel der Beeinträchtigung des GM2-Gangliosidmetabolismus ist eine Transfektion der $mDCs$ mit einer GM2A-spezifischen siRNA.

Der Gebrauch von siRNAs um in Signalwege zu interferieren stellt eine ansprechende Strategie dar um immunstimulatorische Kapazitäten von DCs anzupassen. Beispielsweise interagiert das Protein SOCS1 mit JAK2 und STAT3, verhindert die (Auto)phosphorylierung von JAK- und STAT-Proteinen und beeinträchtigt somit eine Zellantwort auf Zytokine und Entzündungsstimuli. Des Weiteren wirkt SOCS1 ebenso negativ regulatorisch auf den TLR/NF- κ B Signalweg indem es durch Bindung an die NF- κ B Untereinheit p65 deren Abbau fördert. Folglich führte eine Transfektion mit einer SOCS1-spezifischen siRNA zu einer gesteigerten DC-Immunogenität.^[172, 338]

Ähnliche Effekte erlangt man durch die Stilllegung von GILZ, welches viele Signalwege wie z.B. NF- κ B unterdrückt und bei Glukokortikoid-induzierter Überexpression die immunsuppressiven Effekte von IL-10 und Kortikosteroiden durch eine Art Feedback-Loop potenziert, indem es die Differenzierung von CD4⁺T-Zellen in regulatorische T-Zellen (T_{regs}) induziert, welche wiederum IL-10 sezernieren und dadurch die Überexpression von GILZ erhalten.^[45, 54]

Die Anwendung von Elektroporation (EP) als Transfektionsmethode verfügt gegenüber chemischen Transfektionsreagenzien den Vorteil, dass mögliche Nebenwirkungen, wie allergische Reaktionen, ausgeschlossen werden können.^[475] 2006 entwarfen Prechtel *et al.* ein Protokoll zur Elektroporation von siRNA in Monozyten-abstammenden dendritischen Zellen. Sie untersuchten den Einfluss der Elektroporation auf Vitalität, Phänotyp, Migrationsfähigkeit und die Fähigkeit T-Zell-medierte Immunantworten zu induzieren und schlossen EP-induzierte Negativeffekte in Bezug auf diese Parameter aus.

Die in dieser Arbeit etablierte und angewandte EP erwies sich als effektiv hinsichtlich der Herunterregulierung der GM2AP-Expression in $mDCs$ durch die eingeschleuste spezifische siRNA. Auf Proteinebene mittels WB und auch auf transkriptioneller Ebene mittels PCR lies sich der Nachweis erbringen, dass es zu einer deutlichen Senkung der GM2AP-Konzentration in den $mDCs$ kam. Eine gänzliche Stilllegung des GM2AP blieb jedoch aus. (Abb.28; Abb.30) Es liegt die Vermutung nahe, dass die in der PCR nachgewiesene 90%ige Reduktion der GM2AP-Transkription nicht ausreichend ist um GM2AP-abhängige Prozesse in den $mDCs$ vollkommen zu blockieren. Studien mit dem Aktivatorprotein haben gezeigt, dass dieses bei neutralem pH *in vitro* als genereller Glykolipid-Transporter fungiert. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass ein Großteil des Aktivators sezerniert wird und folglich wieder aufgenommen werden kann. Somit mag eine latente Restaktivität ausreichen um die notwendigen Funktionen als Co-Faktor des HexA-abhängigen GM2-Abbaus bzw. als Transporterprotein auszuführen.

Basierend auf seiner Eigenschaft als Glykolipid- und Gangliosidtransportprotein schlussfolgern die Autoren, dass der Aktivator zur Beschleunigung der Endozytose und dem lysosomalen Abbau dieser Lipide dient. In Anbetracht der Vielzahl zellulärer Funktionen, die an Ganglioside in der Plasmamembran gebunden sind, stellt die Kontrolle der Glykolipidzusammensetzung bezüglich Typ und Menge auf den Zelloberflächen eine wichtige *in vivo*-Funktion dar.^[300]

Zudem konnte die Halbwertszeit des Aktivators in Säugetier-Retikulozyten *in vitro* auf ca. 30 Stunden geschätzt werden.[\[http://web.expasy.org/protparam\]](http://web.expasy.org/protparam) Da Messungen in dendritischen Zellen nach 24 Stunden durchgeführt wurden, ist nicht auszuschließen dass aufgrund dessen eine ausreichende Aktivatorkonzentration für die $mDCs$ zur Verfügung stand. Eine Ausweitung der Inkubationszeit auf 48 Stunden lieferte jedoch gleichbleibende Ergebnisse (Daten nicht aufgeführt). Messungen über längere Zeiträume von bis zu 96 Stunden nach der EP ergaben einen graduellen Anstieg der Apoptoserate und damit einhergehend eine Senkung des Anteils siRNA-transfekzierter Zellen (Abb.36a; Abb.36b) und wurden folglich als weniger tauglich eingestuft.

Der Befund eines ausbleibenden Phänotyps nach siRNA-Inhibition des GM2AP korreliert zudem mit der Charakterisierung der GM2-Gangliosidosen. Es wurde beschrieben, dass Einsetzen und Ausprägungsgrad von Speicherkrankheiten durch die Restaktivität des jeweiligen Genprodukts im Lysosom mitbestimmt wird.^[58, 200] Eine komplette Defizienz eines lysosomalen Enzyms führt zu einem frühen Einsetzen und einem schweren Krankheitsverlauf, während nur wenige Prozent der Restaktivität ausreichen um ein verzögertes Einsetzen der Krankheit und einen abgeschwächten Verlauf zu verursachen.^[175, 295]

Ergebnisse der GM2A-Inhibition und mögliche Alternativen der Intervention

Während in den Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden konnte, dass die Expression des Aktivators während der mDC -Differenzierung sukzessive ansteigt, konnte diese Erkenntnis in dieser Arbeit weiter ausgebaut werden.

Zum Einen ließ sich der Nachweis erbringen, dass sich die Expression des GM2AP in reifen mDC s gegenüber unreifen mDC s verringert und zum anderen ließ sich der vermutliche Nachweis von 2 Transkriptvarianten erbringen, welche unterschiedlich stark in mDC s exprimiert werden. (Abb.30)

In Anbetracht der kontinuierlichen Steigerung der GM2AP-Expression während der mDC -Differenzierung gegenüber einer ausbleibenden oder zumindest äußerst geringen Expression in Monozyten als auch in LPS-gereiften mDC s kann der Hypothese, dass der Gangliosidmetabolismus, und zwar insbesondere der Abbau des GM2-Gangliosides, maßgeblich an der Differenzierungsprozess beteiligt ist, Nachdruck verliehen werden.

Nach Nachweis einer minimalen oder gar nicht-vorhandenen Expression des GM2AP in LPS-gereiften mDC s (Abb.30) erübrigen sich die Überlegungen bezüglich der Effektivität einer GM2AP-Inhibition durch eine spezifische siRNA in reifen mDC s.

Dennoch: Die Untersuchung einer GM2AP-Inhibition in unreifen mDC s stellt weiterhin eine interessante Interventionsmöglichkeit dar. Eine Alternative wäre die Blockade des GM2AP über einen chemischen Inhibitor, ähnlich wie bei der HexA in dieser Arbeit angewandt wurde.

Im Idealfall wären Versuche an stabil-transfuzierten mDC s ein vielversprechenderer Ansatz, da in diesem Falle nicht das Problem einer latenten GM2AP-Expression bestehen würde. Da die mDC s jedoch aus frisch-isolierten humanen Monozyten generiert werden und nicht als Zelllinie mit gleichen Eigenschaften in Kultur gehalten werden können, stößt man auch hier wieder auf Grenzen.

Bereits 1997 konnte durch eine Zusammenarbeit, an der auch die „Sandhoff“-Arbeitsgruppe beteiligt war, ein Mausmodell mit einer GM2A-Defizienz generiert werden.^[211] Die Anwendung eines solchen Mausmodells weist jedoch weitere Limitationen und zu beachtende Obstakel auf – insbesondere bei Untersuchungen *in vivo*; zum einen stellt die ubiquitäre Verbreitung des GM2AP ein Hindernis bezüglich einer exklusiven DC-spezifischen GM2AP-Inhibition dar mit der zusätzlichen Hürde, dass DCs eine besonders heterogene Gruppe bilden; andererseits verfügen Mäuse im Gegensatz zum Menschen über einen alternativen Abbauweg für das GM2-Gangliosid.^[211, 315] In Mausmodellen des Tay-Sachs Syndroms und Morbus Sandhoff wurde ein sehr divergenter Phänotyp festgestellt, während im Gegensatz dazu der Phänotyp von Patienten, die an

Diskussion

einem der beiden Syndrome erkrankt sind, sehr ähnlich ist. Während das Tay-Sachs Mausmodell (*hexa* *-/-*) einen normalen Phänotyp entwickelt, präsentiert die Sandhoff-Maus (*hexb* *-/-*) einen Phänotyp, der von starker Motordysfunktion und einer kurzen Lebensdauer geprägt ist. (s. 1.3.3.) Die molekularbiologischen Hintergründe dieses Phänomens, konnten mit der Entdeckung des alternativen Abbaufweges im Mausmodell erklärt werden. Anstelle des konventionellen Abbaus von GM2 zu GM3 wird hier ein HexA/GM2AP-unabhängiger Abbau von GM2 zu GA2 durch eine Sialidase realisiert.^[315]

Tabelle 6: Mausmodelle bekannter GM2-Gangliosidosen

Mausmodell	Knockout	Fehlende Komponente	Akkumulierendes Substrat	Phänotyp
Tay-Sachs	<i>hexa</i> <i>-/-</i>	β-Hexoaminidase A	GM2	Normaler Phänotyp
Sandhoff	<i>hexb</i> <i>-/-</i>	β-Hexoaminidase A / β-Hexoaminidase B	GM2 + GA2	Starke Motordysfunktion, kurze Lebensdauer
AB Variant	<i>gm2a</i> <i>-/-</i>	GM2 Aktivator(Protein)	GM2 (+ GA2)	Motorfunktionsabnormalitäten, normale Lebensdauer

Hauptabbauweg:



Alternativer Abbauweg im Mausmodell:



Abbildung 46:

Schema des alternativen Abbaufweges des GM2-Gangliosides in Mäusen

Obwohl sich der Fokus bisheriger Untersuchungen des GM2-Metabolismus auf die bekannten Formen der GM2-Gangliosidosen (Sandhoff, Tay-Sachs, AB Variant) gerichtet hat und damit einhergehend auf die Akkumulation von GM2 und/oder GA2 im ZNS und dessen pathophysiologische Folgen, existieren auch einige Veröffentlichungen, welche sich auf die Einbindung des Immunsystems im Krankheitsverlauf konzentrieren.

Aus einem Review von Castaneda *et al.* wird deutlich, dass die immensen neurodegenerativen Schäden, die durch die GM2-Gangliosidosen verursacht werden, nicht ausschließlich durch die Akkumulation von u.a. GM2 zu verantworten sind, sondern dass eine Hyperaktivität des Immunsystems mitverantwortlich für einen Großteil der Schädigungen ist.^[448] In Hinblick darauf, dass bisher (so weit bekannt) keine

molekularbiologischen und funktionellen Untersuchungen von murinen DCs aus *gm2a*-Knockout-Modellen veröffentlicht wurden, wäre es von großem Interesse dendritische Zellen mit *gm2a*-Defekt zu isolieren und phänotypisch und funktionell im Vergleich zu den humanen mDCs zu untersuchen.

Erst vor kurzem wurde eine Studie veröffentlicht, in der *hexa* und *hexb* mittels siRNA in CD34⁺HSC-abstammenden dendritischen Zellen stillgelegt wurden um dann festzustellen, dass die CD34⁺DCs ihre immunstimulatorische Aktivität gegenüber CD4⁺T-Zellen verlieren.^[381] Eine methodisch-entsprechende Stilllegung des *gm2a*-gens in CD34⁺ DCs und anschließende funktionelle Untersuchungen wie in dieser Arbeit durchgeführt, könnten Aufschluss darüber geben, ob sich die Expression des GM2AP völlig inhibieren lässt und welche Auswirkungen dies auf die DCs hätte.

Möglichkeiten für den Nachweis einer Doppelbande im WB für GM2A

Wie bereits erwähnt, wurde in dieser Arbeit die Proteinexpression von GM2A im Western Blot stets anhand einer Doppelbande bei einem Molekulargewicht von ca. 20 kDa nachgewiesen. (Abb.30) Schon 1992 konnten Nagarajan *et al.* feststellen, dass der GM2 Aktivator, wenn elektrophoretisch aufgetrennt, immer als Doppelbande erscheint.^[247] Die Isolation der mRNA von zwei GM2A-Splice Varianten aus humaner Plazenta und Fibroblasten und die Feststellung, dass sich deren jeweilige Expressionslevel voneinander unterscheiden, gab den Autoren Anlass zu der Annahme, dass eine physiologische Importanz dem alternativen Splicing der *gm2a*-RNA zugrunde liegt.^[247] Ebenso wie in dieser Arbeit auf Proteinebene nachgewiesen, wurde in dieser Publikation ein geringeres mRNA-Level für die größere Transkriptvariante nachgewiesen – sowohl in den Fibroblasten als auch in der Plazenta.

Vier Jahre später wurden die 1992 entdeckten cDNA Klone weiter charakterisiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass sich *gm2a* auf DNA-Ebene aus 4 Exons und 3 Introns zusammensetzt.

Durch Splicing entsteht eine größere Transkriptvariante, bestehend aus allen 4 Exons und eine kleinere Variante, welcher Exon 4 fehlt, stattdessen aber ein Tripeptid, das von Intron 3 stammt, besitzt.^[416]

Diskussion

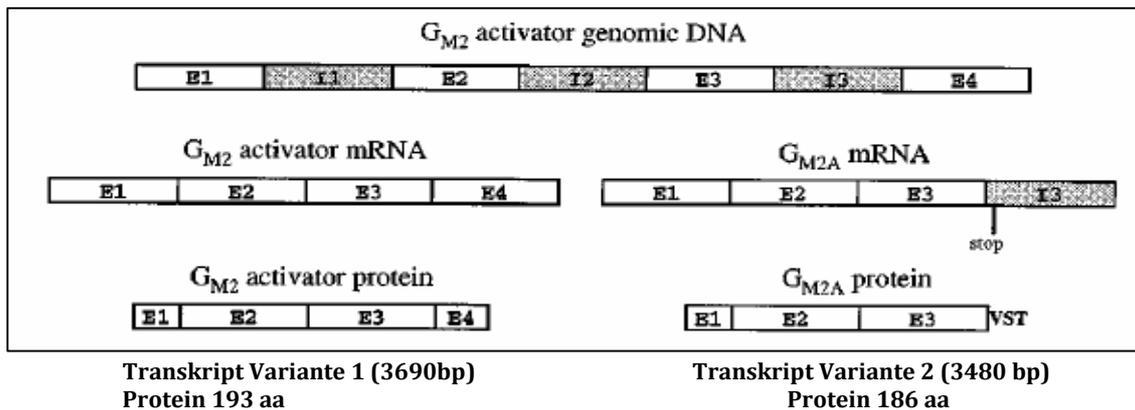


Abbildung 47:

Darstellung der genomischen GM2A-DNA und den durch alternatives Splicing resultierenden Transkriptvarianten und Proteinprodukte.

(Quelle: Modifiziert Wu YY, Sonnino S, Li YT, Li SC. Characterization of an alternatively spliced GM2 activator protein, GM2A protein. An activator protein which stimulates the enzymatic hydrolysis of N-acetylneuraminic acid, but not N-acetylgalactosamine, from GM2. *J Biol Chem.* 1996 May 3;271(18):10611-5.)

Expression und Größe rekombinant hergestellter G_{M2} Aktivator und G_{M2A} Proteine wurden über SDS-PAGE verifiziert. Sichtbare Banden bei 13,5kDa und 18,5kDa entsprechen den Größen, der in dieser Arbeit erhaltenen Doppelbande für GM2AP (Abb.30) und lässt die Suggestion zu, dass es sich um die Proteinexpression der beiden Splicevarianten handelt.

In anschließenden funktionellen Assays entdeckten die Forscher den GM2-Abbauweg, der als Alternative zur HexA die Einbindung einer Sialidase nutzt und somit unter Abspaltung von N-Acetylneuraminsäure (NeuNAc) zur Entstehung von GA2 führt.^[416] Der Vergleich der Aktivität von G_{M2} Aktivator und G_{M2A} bei der GM2 Hydrolyse zu entweder GM3 (Abspaltung von N-Acetylgalactosamin durch HexA) oder GA2 (Abspaltung von NeuNAc durch Sialidase) deckte unterschiedliche Spezifitäten der beiden Splicevarianten auf. Während Transkriptvariante 1, die längere, vollständige von beiden, in der Lage ist beide Funktionen auszuüben, besitzt die verkürzte Form nur die Fähigkeit der Sialidase zu assistieren, jedoch mit einer 20% geringeren Effektivität als Variante 1. Bei der Entstehung des GM3 Gangliosides ist sie nicht beteiligt und unnütz.^[416]

Eine weitere Erklärung für die Präsentation einer Doppelbande im WB könnte die Synthese des GM2AP liefern. So wie auch die Saposine aus einem Vorläuferprotein, dem Prosaposin, entstehen, wird auch der GM2 Aktivator als Pro-Polypeptid (18.463Da) synthetisiert. Zusätzlich besitzt er wie andere lysosomale und sezernierte Proteine eine Signalsequenz (20.808Da). Hinzu kommt die Möglichkeit einer Glykosylierung des GM2AP, was zusätzlich Auswirkungen auf dessen Molekulargewicht hat (24.000-27.000Da).^[226] Die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei den beiden nachgewiesenen Banden um das reife

funktionsfähige Peptid (17.531Da) und das Pro-Peptid handelt wird durch die Ergebnisse der RT-PCR untermalt. In der RT-PCR konnte nur eine Bande amplifiziert werden, deren Sequenzierung eine 99%ige Übereinstimmung mit der Transkriptvariante 1 und eine 70%ige Übereinstimmung mit Transkriptvariante 2 hat. (Abb.28; Abb.29) Die Größe der Bande entspricht den in der Datenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information) angegebenen 1043bp der linearen mRNA des GM2A, welche die komplette kodierende Sequenz enthält (CDS) (GenBank: L01439.1).

Des Weiteren erklären Nowak & Lowden, dass der GM2-Aktivator in multiplen glykosilierten Formen auftritt. Burg *et al.* bestärken ihre Ergebnisse durch Ermittlung eines MWs von 24kDa für die sezernierte Aktivatorform via SDS-PAGE, währenddessen weist die intrazelluläre Form ein diffuses Bandenmuster mit MWs zwischen 21 und 22kDa in der SDS-PAGE auf.^[38, 263]

Einfluss von PUGNAc auf Enzyme aus dem GSL-Metabolismus

Die Hemmung der HexA-Aktivität durch PUGNAc hat gezeigt, dass es zu einer konzentrationsabhängigen Minderung der GM2A-Expression in _MDCs kommt.

Um etwaige Auswirkungen auf weitere Zweige des Glykosphingolipidabbaus zu eruieren, wurden exemplarisch die Proteinexpressionen der SMase, GBA und Ceramidase nach Behandlung mit PUGNAc untersucht.

Ebenso wie der GM2-Aktivator wird die SMase als 75kDa-pre-pro-Polypeptid synthetisiert. Durch proteolytische Spaltung im endoplasmatischen Retikulum/Golgi Apparat entsteht das 72kDa-große Vorläuferprotein „Precursor“, welches zu den endosomalen/lysosomalen Kompartimenten transportiert wird und dort zum enzymatisch-aktiven „mature“ Protein (57kDa) weiter prozessiert wird.^[147] Die SMase katalysiert den Abbau von Sphingomyelin zu Ceramid. Ein Defekt dieses Enzyms führt zur Entstehung der Niemann-Pick-Krankheit, welche mit einer Akkumulation von Sphingomyelin im Lysosom assoziiert ist. Im Western Blot konnte sowohl die Expression des Vorläuferproteins als auch die des reifen Proteins nachgewiesen werden. (Abb.25)

Die Glucocerebrosidase baut Glucosylceramid zu Ceramid ab. Dieses Enzym ist direkt in den Abbauweg des GM2-Gangliosides integriert. Eine GBA-Defizienz führt zu einer lysosomalen Speicherkrankheit, die nach dem französischen Dermatologen Philippe Gaucher benannt wurde. Auch die GBA wird als pro-Polypeptid, welches eine Signalsequenz enthält, synthetisiert (56kDa). Durch Glykosylierung entsteht der „high mannose“ 63kDa-Vorläufer („Precursor“). Im Golgi Apparat unterliegt dieser Precursor weiteren Modifikationen, die zur Entstehung eines 66kDa Intermediates führen. Letztendlich mündet eine weitere Prozessierung durch Exoglykosidasen im Lysosom in

Diskussion

die Entstehung eines „mature“ 59kDa-Enzyms.^[82] Im WB konnten 4 Banden entsprechend der Größen der aufgeführten Prozessierungs- bzw. Glykosilierungsstufen nachgewiesen werden. (Abb.25)

Die saure Ceramidase ist ein heterodimerisches Enzym, bestehend aus einer α -Untereinheit (13kDa) und einer β -Untereinheit (40kDa), welche aus der Spaltung eines 50kDa Vorläuferpolypeptides entstehen.^[201] Sie katalysiert die Spaltung von Ceramiden in Sphingosin und Fettsäuren. Ein Defekt des ASAH-Gens bedingt einen Aktivitätsmangel, der zu intrazellulären Speicherung von Ceramid führt und sich als lysosomale Speicherkrankheit, Morbus Farber, manifestiert.

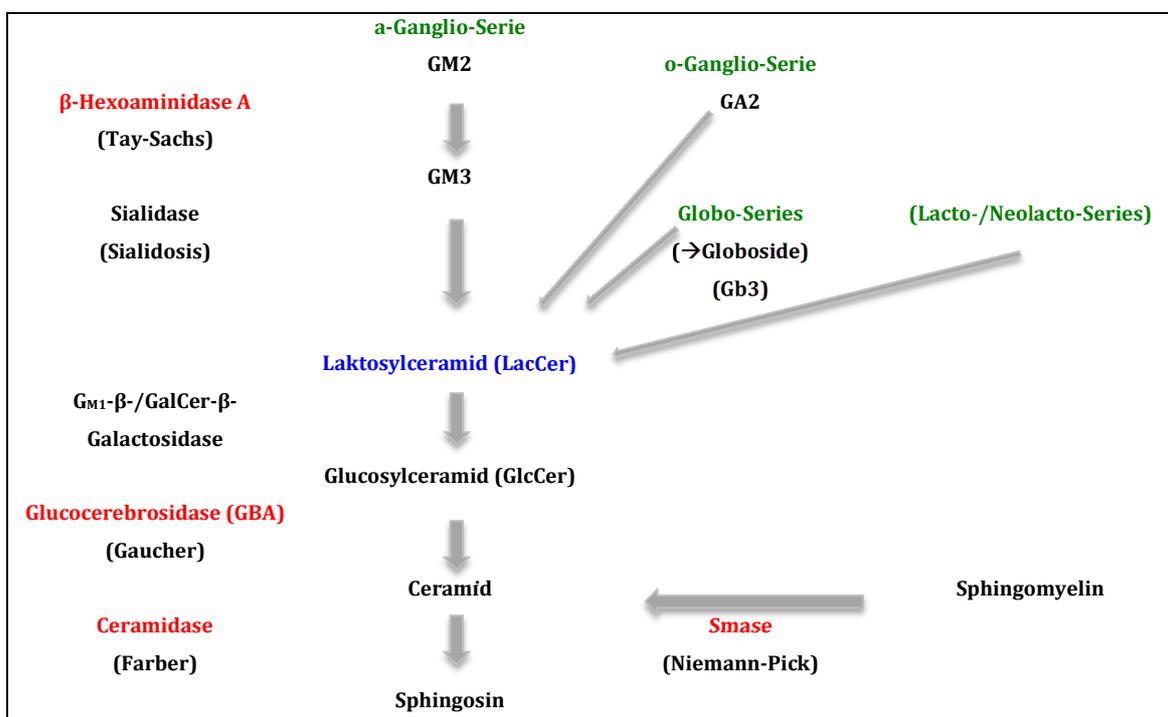


Abbildung 48:
Vereinfachte Darstellung des Glykosphingolipidabbaus

Im Gegensatz zum GM2AP bleibt bei den lysosomalen Hydrolasen eine LPS-induzierte Regulation der Proteinexpression aus bzw. ist derart gering, dass sie zu vernachlässigen ist. Auch für die Proteinexpression der HexA konnte keine bemerkenswerte LPS-induzierte Regulation nachgewiesen werden.

Die Hemmung der HexA durch PUGNAc erzielte eine konzentrationsabhängige indirekte Negativ-Regulation des GM2AP. Selbige Entwicklung wurde der GBA-Expression nachgewiesen, welche sich „Down-Stream“ zur HexA im GM2-Metabolismus befindet. Entsprechend der Annahme, dass eine Blockade der HexA die Akkumulation von GM2 im Lysosom mit sich trägt, erscheint ein Herunterregulieren der GBA aufgrund einer Minderung der GlcCer-Konzentration die logische Konsequenz zu sein. Es besteht die

Diskussion

Möglichkeit, dass die Expression der lysosomalen Hydrolasen durch eine Art Feedback-Loop reguliert wird. Obwohl die GBA auch am Abbau von GSLs der globo-Serie beteiligt ist, ist jedoch anhand der Negativ-Regulation ersichtlich, dass ein maßgeblicher Anteil am Abbau der GSLs aus der ganglio-Serie (GM2 und möglicherweise GA2) involviert ist.

Die ersten Ergebnisse der Lipidanalyse (Abb.31) bestärken diese Annahme. Im Vergleich zu GM2 ist die Konzentration von Gb3 in unreifen und reifen $mDCs$ weitaus geringer.

Die saure Ceramidase und die SMase werden auf Proteinebene nicht ersichtlich durch die Anwendung von PUGNAc beeinflusst. Sie sind nicht unmittelbar am GM2-Metabolismus beteiligt bzw. stehen in der Kette sehr weit unten und werden durch andere Abbauewege des Glykosphingolipidmetabolismus infiltriert. Aufgrund dessen kann postuliert werden, dass ausschließlich der GM2-Metabolismus mittels PUGNAc inhibiert wird, und dass diese Hemmung sich nicht auf andere GSL-Abbauewege ausbreitet. Trotzdem kann auch hier eine RNA-Analyse der untersuchten Hydrolasen zur weiteren Aufklärung beitragen.

Da sich gezeigt hat, dass die spezifische Hemmung der HexA negativ-regulatorische Auswirkungen auf das GM2AP und direkt involvierte „Downstream“-Hydrolasen (e.g. GBA) hat, sollte die Expression der anderen Sphingolipid-Aktivatorproteine (SAP), der Saposine A-D, so wie weitere eingebundenen Hydrolasen (z.B. β -Galaktosidase) ebenfalls untersucht werden.

In der Lipidanalyse (Abb.31) wird Sphingomyelin, als Substrat der SMase, sowohl von Monozyten als auch von unreifen $mDCs$ stark exprimiert. In LPS-gereiften $mDCs$ fällt die Konzentration. Die ähnlich hohe Konzentration von GM2 in unreifen $mDCs$ und der vergleichbar starke Expressionsabfall in LPS-gereiften $mDCs$ suggeriert eine vergleichbar starke Beteiligung beider GSLs am Differenzierungsprozess von $mDCs$, möglicherweise durch ihre gemeinsame Lokalisation in Lipid Rafts. Erst kürzlich wurde in fetalen, aus der Haut stammenden, dendritischen Zellen (FSDC) gezeigt, dass eine LPS-induzierte Reifung mit einer verminderten Sphingomyelin-Expression verbunden ist.^[316]

Ganglioside segregieren mit anderen GSLs in Lipid Rafts in der Zellmembran. Es ist bekannt, dass diese Lipid Rafts besonders reich an Sphingomyelin sind.^[293] Die Aufgaben der GSLs sind vielschichtig; Zahlreiche Studien konnten distinkte Gangliosidexpressionsmuster mit der neuronalen Morphogenese und Differenzierung in Verbindung bringen. Dem Expressionsmuster von GM2 (und auch z.B. Sphingomyelin) nach zu urteilen mag es sich in dendritischen Zellen ähnlich verhalten. Möglicherweise steht die enorme Vergrößerung der Zelloberfläche während der Differenzierung und Dendritenentwicklung der DCs in Zusammenhang mit einer Steigerung der Stoffwechselfunktionen und damit einhergehend einer Hochregulierung der auf der Zelloberfläche wichtigen Moleküle zur Antigenaufnahme und -prozessierung wie u.a. dem

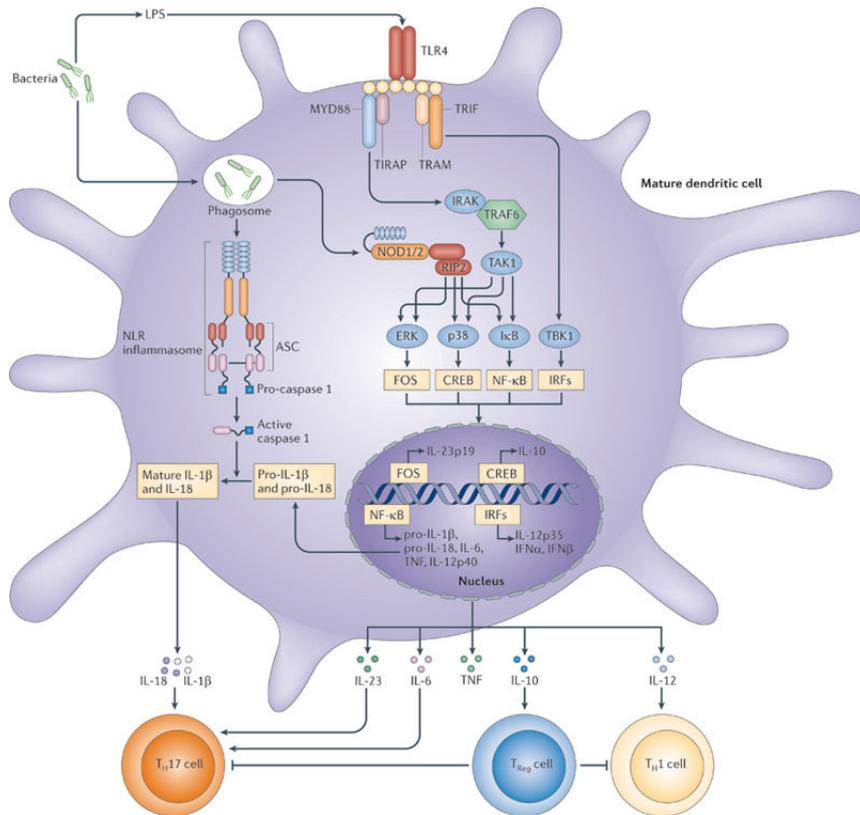
GM2-Gangliosid und verschiedener CD-Marker. Auf der Zelloberfläche sind Ganglioside innerhalb der Lipid Rafts mit anderen Membrankomponenten wie Sphingomyelin und Cholesterin an Zell-Zell-Erkennung und Adhäsion beteiligt, ebenso wie sie in Signaltransduktionsprozesse involviert sind. Immer mehr Beweise häufen sich, dass Ganglioside in Mikrodomänen mit signalgebenden Molekülen und Adhäsionsmolekülen co-lokalisieren.^[430] Es wäre sehr aufschlussreich die Inhibitorstudie auf die Lipidanalyse auszuweiten und die bisher erzielten grundlegenden Ergebnisse bezüglich der differentiellen Expression bestimmter GSLs in den verschiedenen Entwicklungsstufen vom Monozyten zur (reifen) DC auszuweiten und zu überprüfen, ob es durch die HexA-Inhibition in Korrelation mit der Negativ-Regulation des GM2AP zu einer Akkumulation von GM2, wie in den GM2-Gangliosidosen, kommt und was dies für andere GSLs bedeutet.

Phänotypische Charakterisierung und funktionelle Analyse der m DCs nach PUGNAc-Behandlung

Tatsächlich konnte im Zuge dieser Arbeit anhand phänotypischer Charakterisierung und funktioneller Assays gezeigt werden, dass der GM2-Metabolismus direkt mit der Funktion der DCs als APCs verknüpft ist. LPS simuliert als Bestandteil bakterieller Zellwände als äquivalenter Stimulus eine Infektion, die zur Reifung dendritischer Zellen führt. Wie bereits beschrieben geht die DC-Reifung mit einer immensen Umstrukturierung von einer Antigen-aufnehmenden und -prozessierenden unreifen DC zu einer antigenpräsentierenden reifen DC einher. Dieser Prozess ist mit einer Steigerung der Expression bestimmter CD-Moleküle auf der Zelloberfläche verbunden. Mittels dieser CD-Marker gewährleistet die reife DC eine effiziente Zell-Zell-Kommunikation, übt Rezeptorfunktionen aus und bewerkstelligt Adhäsionsprozesse um eine Immunantwort einzuleiten, zu erhalten und zu steuern.

Die Einleitung der DC-Reifung erfolgt mittels Bindung eines Antigens durch PRRs (Mustererkennungsrezeptoren). LPS bindet zunächst an das Plasmaprotein LBP (LPS-binding protein) um dann einen Ternärkomplex mit CD14 zu bilden und folglich an den LPS-Rezeptor-Komplex, bestehend aus einem TLR-4 Homodimer und zwei Molekülen des extrazellulären Adapters MD-2, zu binden.^[118, 268, 382] CD14 ist als membrangebundene Form (mCD14) über Glycosylphosphatidylinositol ^[133, 346, 413] auf der Oberfläche myeloider Zellen verankert oder als lösliche Form (sCD14) im Plasma vorzufinden, wodurch es die LPS-Signalgebung für Zellen, welche kein CD14 exprimieren, ermöglicht. Die Signalübertragung vom Rezeptor in die Zelle erfolgt über einen MyD88-abhängigen oder unabhängigen Signalweg.

Diskussion



Nature Reviews | Immunology

Abbildung 49:

Eine LPS(Bakterien)-induzierte Signalgebung in e.g. DCs führt zur Produktion von Zytokinen, die eine T-Zellaktivierung fördern. Die Illustration zeigt ein MyD88-abhängiges oder -unabhängiges TLR-4-Signalling über TRIF und TRAM und resultierende Downstream-Prozesse, welche zur Aktivierung von NF-κB, IRFs und Phosphorylierung von MAPKs, inklusive p38 und ERK führt. In Folge dessen kommt es zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine und Typ I Interferone, welche verschiedene T-Zell-Subsets aktivieren.

(Q: Mills KH. TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. Nat Rev Immunol. 2011 Nov 18;11(12):807-22. Review.)

Im ersteren Fall ist das Adapter-Protein Mal (TIRAP) notwendig um MyD88 zum TLR4 zu rekrutieren, so dass durch Involvierung von IRAKs und TRAF-6 letztendlich NF-κB und die MAP-Kinasen p38 und JNK aktiviert werden. Des Weiteren werden die frühe Aktivierung von IRF-3 und die Produktion von IFN-β induziert. Für den MyD88-unabhängigen Signalweg besteht die Notwendigkeit die Adapter TRIF und TRAM zu engagieren. Daraus resultieren eine spätere Aktivierung von NF-κB und IRF-3 und die Induktion von Zytokinen, Chemokinen und anderen Transkriptionsfaktoren.^[268] Genaugenommen findet eine Interaktion von TRIF mit TRAF3 und NAP1 statt, welche gemeinsam kooperieren um TBK1 zu aktivieren, welches die Phosphorylierung von IRF-3 mediiert.^[99] TBK-1-defiziente Zellen zeigen keine IRF-3 Aktivierung durch LPS oder polyI:C ^[406] IRF-3 und IRF-7, welches ebenfalls über eine TRIF-abhängigen Signalkaskade aktiviert wird,

stimulieren die Transkription von Typ I IFNs, insbesondere von IFN- β .^[99, 195] Eine interessante Erkenntnis konnte anhand eines MyD88-defizienten Mausmodells erlangt werden; da die Mäuse trotz ihres Defekts weiterhin in der Lage waren IRF-3, IRF-7, NF- κ B, IFN- β und die Reifung von DCs zu induzieren, konnte eine Modell der MyD88-unabhängigen Aktivierung etabliert werden.^[268]

Durch die Veranschaulichung der LPS-induzierten Signaltransduktion wird klar, dass es sich um ein hoch kontrolliertes und komplexes System handelt. Nach heutigem Wissensstand scheint diesem System Redundanz zu fehlen und wie Studien an Mäusen mit Knockouts verschiedener Gene, die Proteine exprimieren, die in der TLR-4-Signalgebung involviert sind, gezeigt haben zahlreiche Angriffspunkte zu bieten.^[268] NF- κ B und MAPK können in Abwesenheit von MyD88 weiterhin durch LPS aktiviert werden, obgleich mit verspäteten Kinetiken.^[159] Jedoch konnte demonstriert werden, dass DCs von MyD88-defizienten Mäusen in der Produktion inflammatorischer Zytokine bei LPS-Stimulation versagten, darauf hinweisend, dass die Zytokinproduktion MyD88-medierte Signale benötigt. ^[50, 371]

Die Untersuchung der Phagozytosekapazität von PUGNAc-behandelten m DCs, hat gezeigt, dass die üblicherweise hochphagozytotischen unreifen m DCs durch Einwirken des Hemmstoffs diese Fähigkeit mit ansteigender Inhibitor-Konzentration zunehmend verlieren. (Abb.40) Entsprechend lässt die PUGNAc-bedingte Hemmung der HexA die Schlussfolgerung zu, dass die Blockade gewisser Aspekte des Gangliosidmetabolismus in negativer Relation zur Phagozytosefähigkeit unreifer m DCs steht. Zur weiteren Klärung der Ursache sind weitere Untersuchungen notwendig, welche Aufschluss darüber geben können, ob dieses Defizit schon in einer fehlerhaften oder ausbleibenden Antigen-Erkennung von LPS über TLR-4 begründet liegt oder ob eine eventuelle Beeinträchtigung der Signaltransduktion oder Antigen-Prozessierung vorliegt.

Insbesondere die Untersuchung der TLR-4- und MyD88-Expression und ihre Komplexbildung mit den jeweiligen Interaktionspartnern könnte weitere Einblicke in den zugrunde liegenden Mechanismus, der den Verlust der Phagozytosekapazität bedingt, bieten. Außerdem ist eine Betrachtung des TLR-Signalweges im Kontext anderer Signalwege bedeutend. Innate Rezeptoren, Tyrosinkinase und Tyrosinphosphatasen, Ubiquitinierungssysteme und Glucokortikoide beeinflussen TLR-Signalwege.^[264]

Zur Bestärkung der durchflusszytometrischen Phagozytosemessung und zur Veranschaulichung des Prozesses der Phagosom-/Phagolysosom-Bildung wäre eine fluoreszenzmikroskopische Analyse, Laser Scanning Mikroskopie (LSM) oder ein Live Cell Imaging von Vorteil. Auch zur Quantifizierung und Lokalisierung des GM2-Gangliosides in den m DCs wäre eine Fluoreszenzmarkierung interessant. Die vorläufigen Ergebnisse der

Lipidanalyse (Abb.31) konnten zwar Aufschluss über die GM2-Konzentration in aus Monozyten generierten $mDCs$ geben, jedoch fehlt bislang eine Lipidanalyse PUGNAc-behandelter Zellen. Durch die Hemmung der HexA ist anzunehmen, dass es zu einer Akkumulation von GM2 im Lysosom kommt. Diese Akkumulation könnte entsprechend visualisiert werden und wäre vermutlich verantwortlich für die ausbleibende Phagozytose.

In einer erst kürzlich veröffentlichten Studie über die Anwendung von SPIO (Superparamagnetic iron oxide labeling) konnte demonstriert werden, dass die Antigenaufnahme-fähigkeit unreifer Hasen-DCs vermindert war. Aufgrund einer lysosomalen co-Lokalisierung von SPIO und ox-LDL entsteht ein Wettkampf um Lysosome, der als mit verantwortlich für die reduzierte ox-LDL phagozytische Kapazität der unreifen DCs erklärt wurde.^[438]

Die molekularbiologischen Grundlagen und die Verknüpfung zwischen dem Gangliosidmetabolismus und der LPS-induzierten mDC -Reifung sind bisher noch unklar.

Einfluss von PUGNAc auf die Aktivierung der MAPK

LPS, als „Gold-Standard“ der DC-Reifung, ist ein Glykolipidbestandteil der äußeren Zellwand Gram-negativer Bakterien und triggert - wie bereits beschrieben - über die Bindung von TLR4 die Aktivierung von MAPKs und NF- κ B.^[454] Die MAPK-Signalwege gehören mit zu den ältesten Signaltransduktionswegen und sind hoch evolutionär konservierte Signalregulatoren, die als Antwort auf Infektionserreger und innate Stimulatoren aktiviert werden. Sie medieren die DC-Reifung und regulieren die anschließende Initiierung und Beendigung innater und adaptiver Immunantworten.^[75] Aktivierte MAP-Kinasen wandern in den Zellkern und phosphorylieren Transkriptionsfaktoren, welche die Expression wichtiger Proteine für Zellzyklus und Zelldifferenzierung steuern. Nach ihrer Deaktivierung verteilen sie sich wieder im Zytosol und stehen für weitere Aktivierungszyklen zur Verfügung.

Es gibt drei Familien der Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK) in Säugetieren: die p38 Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (p38), die ERK(extra-cellular signal-regulated) Kinasen mit den Isoformen ERK-1 und ERK-2 und die c-Jun NH₂-terminalen JNK(SAP)-Kinasen (JNKs).^[454] Alle MAP-Kinasen sind Serin/Threonin-Kinasen und werden selbst wiederum über Phosphorylierung an Threonin und Tyrosin innerhalb eines Thr-X-Tyr (TXY) -Motivs aktiviert. Ihre Aktivierung erfolgt durch MAP-Kinase-Kinasen (MAPKK), welche wiederum durch MAP-Kinase-Kinase-Kinasen (MAPKKK) aktiviert werden.

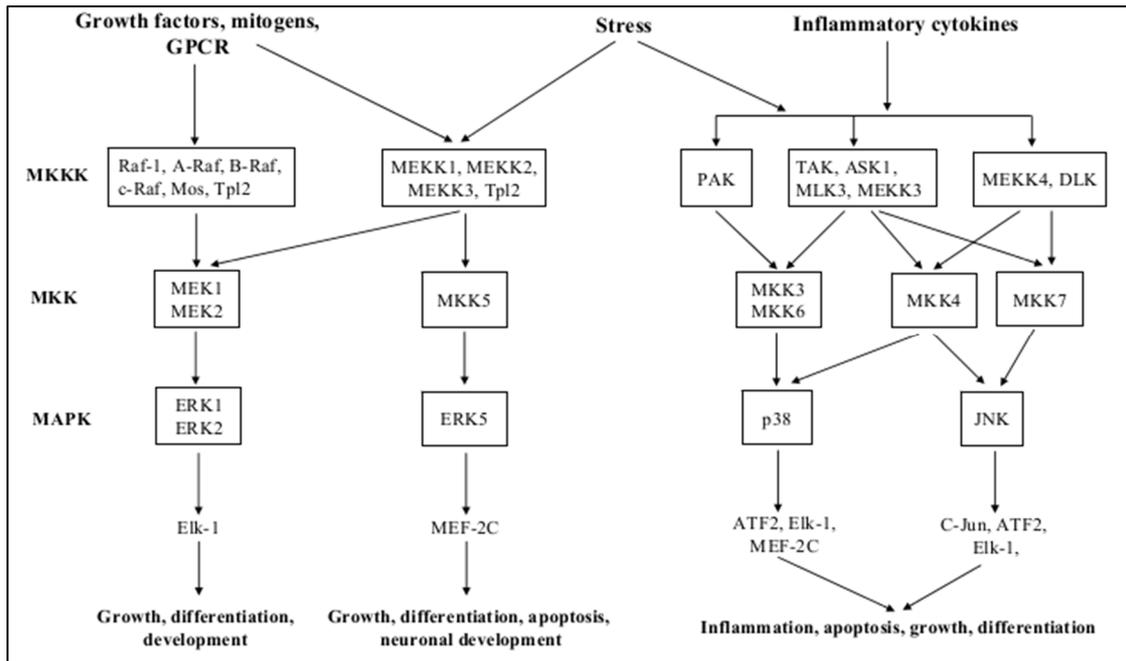


Abbildung 50:

MAP-Kinase-Signalwege in Säugern. Die Aktivierung der MAPK-Signalwege wird durch eine Triple-Kinasen-Kaskade aktiviert. Die MAPKs werden durch duale Phosphorylierung an Thr und Tyr durch spezifische MKKs phosphoryliert. Die MKKs werden wiederum durch MKKKs aktiviert.

Quelle: Zhang YL, Dong C. MAP kinases in immune responses. Cell Mol Immunol. 2005 Feb;2(1):20-7. Review.)

Die 3 Signalkaskaden, die je nach Einbindung von ERK, p38 oder JNK, unterschieden werden, können über diverse „upstream“ Signale aktiviert werden. Insbesondere G-Proteinen konnte eine bedeutende Rolle in der MAPK-Aktivierung zugeteilt werden.

Beispielsweise kann der ERK-Signalweg durch Ras über die Raf-Gruppe der MKKKs aktiviert werden. Die Aktivierung von Raf erfolgt durch Mitogene und führt im Weiteren zur Aktivierung von MEK1/2 und schließlich ERK1/2. Die Folgen sind Zellwachstum, Zellproliferation und Differenzierung. Dieser Signalweg ist bei 30 % aller Krebsarten hyperaktiviert.^[455] Im Gegensatz dazu werden p38 und JNK anhand von GTPasen der Rho-Familie, einschließlich Rac und Cdc42, aktiviert.

Zum Einen bringt eine Aktivierung über Stress, Tumornekrosefaktoren oder Interleukin-1-Rezeptor Typ 1 die Kaskade MLKs/TAK/ASK1 → MKK 3/6 → p38/MAPK-α/β in Gang, was Antworten wie Entzündung, Apoptose, Wachstum oder Differenzierung zur Folge haben kann. Zum Anderen wird über Stress, UV-Licht oder einen osmotischen Schock die Kaskade MLKs/ASK-1/MEKK-1/4 → MKK-4/7 → SAPK/JNK-1/2/3 aktiviert, gefolgt von Antworten wie Entzündung, Apoptose, Wachstum oder Differenzierung.^[492] Als Initiator der „klassischen“ DC-Reifung mit einer gesteigerten Expression von CD80, CD86 und der Produktion vieler pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-12, IL-6 und TNF-α^[490, 492],

Diskussion

konnte in murinen Zellen eine Abhängigkeit der LPS-induzierten „klassischen“ Reifung von allen 3 MAPK-Signalwegen nachgewiesen werden.

Da auch in dieser Arbeit eine LPS-induzierte Regulation der MAPK-Aktivierung demonstriert werden konnte (Abb.26) und eine nach PUGNAc-Behandlung rückläufige Regulation zu vermerken war, die mit einer Reduktion Reife-assoziiertes CD-Moleküle und pro-inflammatorischer Zytokine einher geht (s. 4.5.2.1.; Abb.44), stehen diese Ergebnisse im Einklang zur postulierten MAPK-Abhängigkeit der DC-Reifung.

So konnte durch Lu *et al.* dem MKK-p38-Signalweg eine essentielle Rolle in Makrophagen und DCs nachgewiesen werden. An murinen Makrophagen oder CD40L-aktivierten murinen Knochenmark-abstammenden DCs durchgeführte Experimente mit spezifischen Inhibitoren von p38 oder dessen „upstream“ MAPKK, MKK3, führten zu einer 40-70%igen Reduktion der gesamten p38-Aktivität und einem Defekt in der IL-12 Produktion, der sich sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene nachweisen lies.^[218]

Zusätzlich, konnte in JNK2^{-/-} Mäusen ein LPS-bedingte IL-6 und IL-12-Transkription nicht induziert werden. Dies suggeriert eine kritische Rolle für die c-jun-Phosphorylierung in der Produktion dieser Zytokine.^[53] Diese Erkenntnisse finden Bestätigung durch eine Publikation von Napolitani *et al.*, welche eine absolute Notwendigkeit von src-Familie Kinasen für die LPS-induzierte Phosphorylierung und Hochregulierung von c-jun demonstriert. Während Nf-κB und die MAPKs ERK und p38 unabhängig von Tyrosinkinase der src-Familie sind, wird die Aktivierung von c-jun dramatisch beeinflusst. Eine Hemmung der Tyrosinkinase Lyn, welche in Monozyten mit dem LPS-bindenden CD14 assoziiert und bei der Signalvermittlung von LPS mit TLR4 kooperiert^[358], führt zu einer Negativregulation von c-jun und folglich zu einer reduzierten Bildung des AP-1-Komplexes, der als Transkriptionsfaktor fungiert, der insbesondere die Synthese der Zytokine IL-12^[441], IL-6^[230] und TNF-α^[424] reguliert. Folglich kommt es zu einer Blockade der Zytokinproduktion, wobei die Expression Reife-assoziiertes Moleküle, wie CD83, MHC-II und die co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 nicht beeinträchtigt wird.^[252] Auch die Promotorregionen der Interferon-regulatorischen Faktoren IRF-1 und IRF-8 (ICSBP) beinhalten eine AP-1-Bindungsstelle, was die Annahme schürt, dass ihre Expression ebenfalls über diesen Komplex reguliert sein mag.^[252]

Eine gesteigerte Expression von IRF-8 im Zellkern LPS-gereifter mDCs ließ sich in dieser Arbeit ebenfalls nachweisen. Eine nach PUGNAc-Behandlung erfolgte konzentrationsabhängige Reduktion von IRF-8 im Zellkern korreliert mit der ebenfalls reduzierten Expression von c-jun im Zellkern. (Abb.26) IRF-8 ist ein essentieller Faktor für die Produktion des Th1-polarisierenden Zytokins IL-12.^[286] Grundsätzlich spielt IRF-8

eine grundlegende Rolle in der Kontrolle vieler Aspekte von DC-Funktion, welche sich nicht nur über Reifung und Trafficking, bis hin zur Aufnahme und Präsentation von Antigenen erstrecken ^[99], sondern über eine Schlüsselfunktion während der Entwicklung hämatopoietischer Zellen, was durch den Nachweis eines kompletten Verlustes von myeloiden DCs des peripheren Blutes, pDCs und Monozyten in Menschen mit IRF-8-Mutation deutlich wird.^[56]

Anhand von Inhibitorstudien konnte festgestellt werden, dass sich eine Hemmung der p38- oder ERK-Signalkaskade unterschiedlich auf die Reifung von DCs auswirkt. Die Blockade der p38 MAPK führte zu einer gehemmten Hochregulierung von co-stimulatorischen Molekülen und Adhäsionsmoleküle und verursacht eine Reduktion der allostimulatorischen Kapazität und endozytotischen Aktivität von LPS-induzierten DCs.^[10, 320] Im Gegensatz dazu führt eine Hemmung von ERK lediglich zu einer Inhibition der TNF- α Produktion, aber beeinträchtigt weder die immunstimulatorischen Funktionen noch die Expression der Oberflächenmoleküle CD80, CD83 und CD86.^[284, 297, 389] Diese phänotypischen und funktionellen Daten indizieren, dass p38, ERK und JNK den Reifungsprozess von DCs differentiell regulieren, und dass p38 essentiell für das Erreichen der immunstimulatorischen Funktion ist.^[250]

Während p38- und JNK-Signalwege die DC-Reifung positiv synergistisch steuern^[252, 284], hat der ERK-Signalweg gegenteilige Effekte und suggeriert eine negativ regulatorische Rolle für ERK während des Reifungsprozesses. Zudem wird postuliert, dass der Typus der T-Zell-polarisierenden Aktivität von mDCs in Abhängigkeit zur Balance der ERK und p38 MAPK-Aktivierung, die durch Reifestimuli und andere Signale des umgebenden Milieus getriggert wird, steht. Die Reifung von mDCs in einem extrazellulären Kontext, der eine niedriges Aktivierungsverhältnis von ERK gegenüber p38 fördert, würde die Entstehung von DCs mit Th1-polarisierender Kapazität fördern, während ein höheres ERK/p38-Aktivierungsverhältnis diesen Prozess in ein Th2-tolerogenes Ergebnis verlagern würde. Darüber hinaus, wurde angeregt dass die polarisierende Kapazität von DCs durch die Kinetik der Aktivierung festgelegt wird. Nach dem „DC exhaustion model“ fördern mDCs im frühen Reifungsstadium die Th1-Polarisierung und induzieren sobald ihre IL-12-Produktion nachlässt eine Th2-Differenzierung.^[284]

Von DCs sezernierte Zytokine spielen eine wichtige Rolle in der Steuerung von T-Zell-Antworten. Eine Kinetische Studie zur Produktion von IL-12 und IL-10 durch DCs zeigt eindeutig, dass IL-12 ein Schlüsselzytokin innater Immunantworten ist, dass die Th1 - Polarisation vorantreibt, während IL-10-produzierende DCs Th2-Antworten primen.^[189, 385] IL-10 wird generell als limitierend gegenüber Immun- und Entzündungsreaktionen betrachtet und hat eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Balance zwischen Th1 und

Th2 Antworten. [242, 274] Außerdem wurde beschrieben dass IL-10 produzierende DCs die Fähigkeit haben regulatorisch T-Zellen zu induzieren.[399] Eine Aktivierung von ERK1/2 steht in eindeutiger Korrelation zur Produktion von IL-10.[232, 417, 426] Qian *et al.* demonstrierten zudem, dass in DCs mit einem regulatorischen Phänotyp, der ein Th2-Antwort förderndes Zytokinsekretionsprofil aufweist, eine verstärkte ERK1/2 Aktivierung mit einer Suppression der p38-Aktivierung einhergeht.[289]

Da in dieser Arbeit eine LPS-induzierte Aktivierung von p38 und c-jun nachweisbar war, einhergehend mit einer Suppression der ERK1/2 -Phosphorylierung (Abb.26), lässt sich annehmen, dass die generierten m DCs eine Th1-favorisierende Polarisation von CD4+ T-Zellen induzieren würden. Aufgrund einer anderen Zielsetzung dieser Arbeit wurde auf entsprechende Untersuchungen verzichtet.

Obwohl eine Mehrheit an Publikationen eine gemeinsame Aktivierung von p38 und ERK1/2 als Reaktion auf eine LPS-Stimulation postulieren, findet der reproduzierbare Nachweis einer LPS-induzierten pERK1/2 Suppression in dieser Arbeit seine Verifikation durch die Charakterisierung eines regulatorische Phänotyps (DC_{reg}) durch Qiang *et al.*. Es wurde demonstriert, dass diese DC_{regs} die Aktivierung von NK-Zellen induzieren können.[289]

Durch die Hemmung mit PUGNAc kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Verstärkung dieses Phänotyps, insbesondere bei p200 lässt sich eine starke pERK1/2 -Bande im WB nachweisen, während die Phosphorylierung von p38 und c-jun deutlich nachlässt. (Abb.26)

In Korrelation mit diesem Phänotyp kommt es zudem zu einer konzentrationsabhängigen Minderung der IL-12 Produktion, während die Produktion von IL-10 durch die PUGNAc-Hemmung weitgehend unbeeinträchtigt bleibt. (Abb.44) Eine Steigerung der IL-10 Konzentration stellt sich nicht ein. Es ist wahrscheinlich, dass dafür keine Notwendigkeit besteht, da sich durch die immense Reduktion der IL-12 Produktion ein Gleichgewicht zugunsten von IL-10 einstellt.

Einfluss von PUGNAc auf die Aktivierung von NF- κ B und der IRF-Familie

Wie schon zuvor erwähnt wird der koordinierte Prozess der „klassischen“ DC-Reifung unter anderem durch die Aktivierung von NF- κ B reguliert. In dieser Arbeit wurde die Aktivierung von 4 Mitglieder der NF- κ B Familie – RelA (p65), RelB, c-Rel und NF- κ B₁ (p50) – untersucht. (Abb.27) Die Bindung von LPS (PAMP) an TLR4 (PRR) aktiviert eine Signalkaskade, welche die Translokation von NF- κ B in den Zellkern bewirkt. NF- κ B befindet sich in seinem inaktiven Zustand im Zytoplasma assoziiert mit inhibitorischen Proteinen wie I κ B. Seine Aktivierung beinhaltet die Phosphorylierung von I κ B, gefolgt von

dessen Ubiquitinierung und anschließenden Degradierung, welche die nukleare Translokation von NF- κ B ermöglicht.^[423]

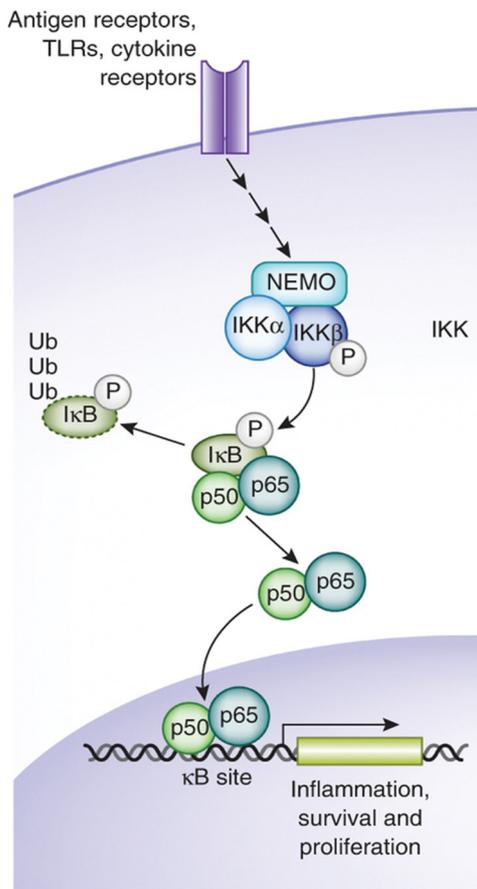


Abbildung 51:
Aktivierung von NF- κ B

(Q: Gerondakis S, Fulford TS, Messina NL, Grumont RJ. NF- κ B control of T cell development. *Nat Immunol.* 2014 Jan;15(1):15-25. Review.)

In dieser Arbeit konnte reproduzierbar nachgewiesen werden, dass eine enorme Aktivierung aller untersuchten NF- κ B Familienmitglieder durch LPS induziert wird. Nach Behandlung mit PUGNAc zeigt sich auch hier eine konzentrationsabhängige Reduktion von NF- κ B im Zellkern. (Abb.27) NF- κ B ist maßgeblich an der Regulation vieler proinflammatorischer und immunmodulatorischer Gene beteiligt. Nach seiner Translokation in den Zellkern kann das aktive Dimer die Genexpression von Zytokinen wie IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p40, und co-stimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD86 transaktivieren.^[31] Eine starke PUGNAc-bedingte Minderung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-12 (Abb.44) sowie der Oberflächenmoleküle CD80 und CD86 (s. 4.5.2.1.) wurde in dieser Arbeit nachgewiesen und korreliert mit der reduzierten NF- κ B Aktivierung. Eine Blockade von NF- κ B führt zur Verhinderung der Differenzierung in reife DCs.^[179, 257] Eine eher unreifen Phänotyp der $MDCs$ durch PUGNAc-bedingte Effekte wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt.

Die Analyse von IRF-3, IRF-7 und IRF-8 liefert von der Tendenz her ähnliche Ergebnisse, obgleich eine nur geringe LPS-induzierte Steigerung bzw. PUGNAc-bedingte Minderung der IRFs-Expression im Zellkern nachzuweisen war, die leicht überinterpretiert werden kann. (Abb.27)

Interferone (IFNs) bilden eine große Familie aus multifunktionellen sezernierten Proteinen, welche in antivirale Abwehr, Regulation des Zellwachstums und Aktivierung des Immunsystems involviert sind. Eine virale Infektion induziert die Transkription multipler IFN-Gene, eine Reaktion die zum Teil durch IRFs mediiert wird.^[472] Alle IRFs haben die Gemeinsamkeit einer konservierten NH-terminalen Domäne, welche zur Erkennung und Bindung einer spezifischen DNA consensus Sequenz, dem IFN Stimulation Response Element (ISRE) im Promoter von IFN-regulierten Genen, dient.^[378, 379] Obwohl

sie ursprünglich als Mediatoren diverser biologischer Aktivitäten von TypI und TypII IFNs identifiziert wurden^[97, 128], konnten folgende Studien IFN-Signalwirkungsunabhängige Rollen für IRFs aufdecken. Zu diesen zählen Kontrolle der Anfälligkeit gegenüber onkogener Transformation, Förderung der Zellzyklusprogression und die Induktion von Zellzyklus-Arrest und programmiertem Zelltod.^[379] So haben Arbeiten vieler Labore über Jahre zwingende Beweise erbracht, dass Transkriptionsfaktoren der IRF-Familie viele Aspekte der DC-Biologie kontrollieren. Sie steuern die Entwicklung diverser DC-Subsets, fördern und modulieren die DC-Reifung, und weisen die Expression wesentlicher Gene der DC-Funktionen an. Mehrere IRF-Mitglieder sind in jeden dieser Prozesse involviert um gut-balancierte und fein-abgestimmte innate und adaptive Immunantworten zu etablieren.

IRF-3 und IRF-7 stellen wichtige erste Schlüsselfaktoren dar, die eine sofortige Abwehr auslösen, während IRF-1, IRF-5 und IRF-8 als Regulatoren in nachfolgenden Schritten hervortreten um eine definitive angeborenen und erworbenen Immunreaktionen zu erreichen. Deregulierung einer der IRFs resultiert in abberante Entzündungsreaktionen, welche diverse Krankheitsprozesse betreffen.^[99] Die regulatorische Aktivität der IRFs findet über eine Translokation in den Zellkern statt; dort agieren sie als Repressoren oder Aktivatoren transkriptioneller Aktivitäten, je nach dem mit welchem Partner sie assoziieren.^[469]

PU.1, ein der Ets-Familie zugehöriges DNA- bindendes Protein, ist ein solcher möglicher Partner. Seine Aktivierung ist abhängig von der Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren. PU.1 ist immunzellenspezifisch und spielt eine wichtige Rolle während der Entwicklung myeloider und B-lymphoider Zellen. ^[99, 469] In funktioneller Interaktion mit IRFs, wie z.B. IRF-8, wirkt PU.1 synergistisch bei der Aktivierung der Expression bestimmter Zielgene. ^[319, 473, 476] In dieser Arbeit konnte eine geringfügige PUGNAc-bedingte Herunterregulation von PU.1 in unreifen und LPS-gereiften $mDCs$ bei einer Konzentration von (100 μM & 200 μM) nachgewiesen werden. (Abb.27) Obwohl die Hemmung nur geringfügig war, kann suggeriert werden, dass entsprechende Effekte, die nach PUGNAc-Behandlung bei den generierten $mDCs$ demonstriert werden konnten durch diese Expressionsminderung mitbegründet liegen. So reguliert PU.1 die Genexpression von FLT3, welches auf der Oberfläche hämatopoietischer Vorläuferzellen exprimiert wird, in einer Dosis-abhängigen Art und Weise. FLT3 ist wichtig für die normale Entwicklung von HSCs und Vorläuferzellen. PU.1-defiziente Mäuse weisen u.a. eine reduzierte FLT3-Expression auf und einen kompletten Verlust aller lymphoiden und myeloiden Vorläufer.^[319, 445, 447] PU.1 ist auch wichtig für die Expression von Zytokinrezeptoren wie GM-CSFR oder Molekülen, welche in DC-Funktionen involviert sind.^[319]

Einfluss von PUGNAc auf den Phänotyp unreifer und reifer $mDCs$

Die DC-Reifung ist charakterisiert durch eine Hochregulation der Expression von MHC-II und co-stimulatorischen Molekülen wie CD80, CD83 und CD86, so wie CCR7.^[92] In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass insbesondere die Expression von CD80, CD83 und CCR7 (Seltmann, Daten nicht aufgeführt) sich nach LPS-Stimulation beachtlich steigert. (s. 4.5.2.1.) CCR7 fungiert als Rezeptor für die Chemokine CCL19 und CCL21, welche die einzigen Liganden für CCR7 darstellen. Über CCR7-medierte Signale werden DCs zu den sekundären lymphoiden Organen gelotst und dort in definierten funktionellen Kompartimenten positioniert. In den T-Zellregionen kommen sie in engen Kontakt mit den T-Lymphozyten, was deren Antigen-spezifische Aktivierung ermöglicht. Neuste Erkenntnisse suggerieren nicht nur eine essentielle Rolle der CCR7:CCL19/CCL21-Interaktion in der DC-Mobilisierung/Migration, sondern auch dass CCL19 und CCL21 direkt die Fähigkeit des T-Zell-Primings beeinflussen.^[92] Die Folgen der PUGNAc-bedingten drastischen Minderung der CCR7-Expression auf reifen $mDCs$ (Seltmann) spiegeln sich durch die Ergebnisse des Migrationsassays wieder. In Korrelation zum konzentrationsabhängigen Expressionsverlust von CCR7, sank auch die Migrationsrate konzentrationsabhängig ab. (Abb.38) PUGNAc-behandelte $mDCs$ reagierten nicht mehr auf eine Stimulation mit Mip-3 β (CCL19). Die Suggestion, dass der CCR7-Verlust die fehlende Ansprechbarkeit bedingt, liegt nahe. Zusätzliche Faktoren beeinflussen jedoch die CCR7:CCL19/CCL21-Interaktion. So wurde der eindeutige Beweis erbracht, dass der proinflammatorische Mediator „PGE2“ ein zwingend notwendiger Faktor für die Entwicklung eines migratorischen Phänotyps humaner $mDCs$ darstellt. Obwohl die Reife-assoziierte Hochregulierung von CCR7 PGE2-unabhängig ist, ist die Vermittlung der CCR7-Signaltransduktion an PGE2 gekoppelt.^[198, 321] Darüber hinaus konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* demonstriert werden, dass die Regulation von CD38 und CD74 mitbestimmend für das Migrationspotential reifender DCs ist.^[83, 93, 258]

Eine effektive Aktivierung von T-Zellen erfordert die Einbindung des T-Zellrezeptors (TCR) zur Erkennung eines MHC-gebundenen fremden Antigens kombiniert mit der Bindung von CD28 an co-stimulatorische B7(CD80/CD86)-Moleküle auf APCs. Der simultane Anstieg von MHC und B7-Molekülen fördert synergistisch die T-Zell-stimulatorische Kapazität von DCs. Die Hochregulation von MHC-Molekülen sorgt für eine hohe Kapazität zur Antigen-Präsentation durch viele Epitope zu einer jeweils hohen Kopienzahl. Die B7-Hochregulierung gewährleistet eine effektive Amplifikation der Signalübertragung in naiven T-Zellen. Im Gegensatz dazu sendet ein anderer T-Zellrezeptor, CTLA-4 (CD152), nach Bindung an B7-Moleküle Signale, die eine T-Zellaktivierung hemmen.^[394]

Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die nur moderate Expression von CD80 auf unreifen $mDCs$ nach LPS-Stimulation 2,5fach – 3fach gesteigert wurde (s. 4.5.2.1.; s. 4.5.2.2.2.). Im Gegensatz dazu wurde unreifen und reifen $mDCs$ gleichermaßen eine konstant hohe CD86-Expression nachgewiesen.

Viele Studien zeigen, dass beide Liganden CD80 und CD86 eine kritische Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen *in vitro* haben. Darüber hinaus lieferten jedoch einige Studien den Beweis, dass eine Präferenz gegenüber CD80 oder CD86 in der T-Zell-Aktivierung vorliegt.^[394]

Die Behauptung, dass diese co-stimulatorischen Moleküle unterschiedliche Rollen spielen, kam auf als ihre sehr unterschiedlichen Expressionsmuster nachgewiesen wurden. Durch den Nachweis, dass CD86 Moleküle konstitutiv auf humanen Monozyten und dendritischen Zellen präsent sind, wohingegen CD80 erst nach Aktivierung dieser Zellen mit IFN- γ exprimiert wird ^[94] bestärkt die Ergebnisse dieser Arbeit. Eine andere Veröffentlichung zeigte, dass nach *in vitro* Kultivierung die Expression von beiden, CD80 und CD86, hochreguliert wird, aber die Kinetik der Prozesse sich unterscheidet. Außerdem war die Hemmung einer Monozyten-induzierten T-Zellaktivierung nur durch anti-CD80, jedoch nicht anti-CD86 möglich.^[90] Während Fleischer *et al.* nach 4-6 Stunden Kultur CD80 auf mRNA Ebene in humanen Monozyten und entsprechend auf der Zelloberfläche exprimiert nachweisen konnten, zeigten andere Arbeitsgruppen im Gegensatz dazu, dass humane Langerhans-Zellen ^[112] und dendritische Zellen des peripheren Blutes ^[234] zwar CD80-mRNA besitzen, jedoch kein CD80 auf der Zelloberfläche exprimieren wodurch eine transkriptionelle Regulation suggeriert wurde.

Der folglich aufgestellten Hypothese, dass CD80 und CD86 möglicherweise unterschiedliche co-stimulatorische Anforderungen haben, konnte durch *in vivo* Versuche Nachdruck verliehen werden. Experimente mit B7-Knockout-Mäusen ^[318] bestätigten, dass die Induktion einer zellulären Immunantwort auf intra- oder extrazellulär produzierte Antigenen unterschiedliche co-stimulatorischen Anforderungen an CD80 und CD86 stellte. Obwohl B7-2 (CD86) absolut notwendig für die Generation einer Immunantwort gegenüber einem DNA-Immunogen in B7-2-/-Mäusen war, konnte durch beide CD80 und CD86 eine co-Stimulation von T-Zellen in diesen DNA-Immunogen co-immunisierten Mäusen induziert werden. Die Autoren schlussfolgerten, dass CD86 wichtiger in der Initiierung einer T-Zellantwort sein könnte, während CD80 wichtiger im Erhalten von Immunantworten sein könnte.

Diese Annahme könnte aufgrund des nachgewiesenen Expressionsprofils von CD80 und CD86 auch für die in dieser Arbeit generierten humanen $mDCs$ zutreffend sein.

Anhand der Ergebnisse dieser exemplarisch ausgewählten Studien wird klar, dass das Zusammenspiel von dendritischen Zellen und T-Zellen komplex ist und durch eine Vielzahl regulatorischer Faktoren, inkl. Zytokinen und co-stimulatorischen Faktoren und Zell-Zell-Interaktionen bestimmt wird. Gerade durch den Vergleich von *in vitro*-Studien gegenüber *in vivo* durchgeführten Experimenten, lässt sich annehmen, dass ein simples Modell mit definierten Bedingungen nicht der Realität im lebenden Mechanismus entspricht, sondern ein idealisiertes Bild darstellt, und dass *in vivo* auf verschiedenen Ebenen verschiedene Mechanismen mit regulatorischen Funktionen greifen, und dass mit als erste Instanz das Immunogen an sich Einfluss auf die Funktion von CD80 und CD86 hat.^[452]

Die zahlreichen *in vivo* Systeme, welche sich normaler und Knockout-Mäusen bedienen, exprimieren neben den B7-Molekülen andere wichtige Paare co-stimulatorischer Rezeptoren wie CD40/CD154(CD40L), welche in T-Zell-Aktivierung und Proliferation involviert sind.^[394] Obwohl in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass CD40 zu nahezu 100% auf unreifen dendritischen Zellen konstitutiv exprimiert wird, lässt sich nach LPS-Stimulation der generierten $mDCs$ ein 4-facher Anstieg der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität nachweisen. (s. 4.5.2.2.2.) Die gleiche Entwicklung ist bei der Expression von CD54 zu beobachten. CD54 (ICAM-1) wird konstitutiv auf dendritischen Zellen exprimiert. Nach Einwirken eines Reifestimulus steigt die Konzentration der CD54-Moleküle auf der Zelloberfläche an. (s. 4.5.2.2.2.) CD54 ist ein interzelluläres Adhäsionsmolekül und nicht nur auf DCs präsent, sondern ebenfalls auf anderen Leukozyten und Endothelzellen. So spielt ICAM-1 eine wichtige Rolle in der Extravasation und Migration von Leukozyten während einer Entzündungsreaktion.^[459, S.80ff] DC-exprimiertes ICAM-1 bindet an das T-Zell-Integrin LFA-1 und übt somit eine essentielle Funktion in der T-Zell-Aktivierung aus indem es die Assoziation zwischen T-Zelle und APC stabilisiert.^[459, S.326ff]

Die Hochregulierung der CD83-Expression nach LPS-Stimulation (s.4.5.2.1.; s. 4.5.2.2.2.) steht im Einklang mit der anfänglichen Beschreibung von CD83 als hochspezifischer Marker für humane und murine reife DCs.^[25, 440] CD83 wird jedoch auch durch eine Vielzahl anderer Zelltypen exprimiert, u.a. auch auf T- und B-Zellen, wenn sie aktiviert wurden.^[281] Eine zunehmende Anzahl durchgeführter Studien konnte zeigen, dass CD83 nicht bloß eine Marker für die DC-Reifung darstellt, sondern verschiedene biologische Funktionen übernimmt.^[209] Auf Proteinebene existieren 2 Isoformen^[139]: eine membran-gebundenen, stimulatorische Form, welche an der T-Zell-Aktivierung und Thymozyten-Generierung beteiligt ist ^[1, 96, 281] und eine lösliche Form (sCD83) mit einer immun-inhibitorischen Kapazität die gegenteilige Effekte zur Folge hat.^[191] Aufgrund dessen wird angenommen, dass eine interessante potentielle Feedback-Regulierung, basierend auf der

sCD83-Modulierung der Monozyten/DC-Differenzierung und der mCD83- und sCD83-Immunregulierung für DC-medierte T-Zell-Immunantworten, vorliegt.^[209] Grundlegend müssen humane Immunantworten auf dem richtigen Level gehalten werden um die Entstehung autoimmuner Erkrankungen oder Immundefizienzen vorzubeugen.^[334, 420] Daraus wird deutlich, dass die Balance zwischen mCD83 und sCD83 eine wichtige Rolle in der Modulation DC-medierter Immunantworten spielen könnte.

Im Zusammenhang mit der Expressionsanalyse der DC-Oberflächenmoleküle unter der Wirkung von PUGNAc, konnte eine mit zunehmender PUGNAc-Konzentration konvergierende, abnehmende Expression von CD80, CD83 und CCR7 demonstriert werden. (Abb.33a./b.) Darüber hinaus konnte ein konzentrationsabhängiger MFI-Abfall für CD86 und CD1a registriert werden. (Abb.34; Abb.35) Da die LPS-induzierte „klassische“ Reifung, welche durch die Expressionssteigerung der zuvor beschriebenen CD-Marker charakterisiert ist, nicht unter Einfluss von PUGNAc vollzogen wurde, ist davon auszugehen, dass bestimmte Prozesse des Gangliosidstoffwechsels, wie ein korrekter GM2-Metabolismus, am Aufbau des Reife-assoziierten CD-Molekül-Expressionsmusters erforderlich sind.

PUGNAc-induziertes abberantes Zytokin- und Chemokinsekretionsprofil

Die Konsequenzen der HexA-Inhibition sind weitreichend; außer der veränderten phänotypischen Erscheinung, die sich durch einen Verlust bzw. eine ausbleibende Expression bestimmter CD-Moleküle äußert, entstehen funktionelle Defekte (Abb.38; Abb.40; Abb.42) wie der Verlust der Migrationskapazität (s.o.) und ein abberantes Zytokinsekretionsprofil, welches durch eine reduzierte Produktion proinflammatorischer und konstitutiver Zytokine und Chemokine auf ein minimal basales Level gekennzeichnet ist. (Abb.44)

Der Nachweis eines erhöhten Produktionslevels von IL-6, IL-12, und TNF- α als Reaktion der $mDCs$ auf LPS (Abb.44) steht im Einklang mit ihrer wichtigen Rolle in Entzündungsprozessen und der Induktion spezifischer Immunantworten.^[310] Zudem korreliert dieses Ergebnis mit der bereits beschriebene LPS-induzierte Hochregulierung der Aktivierung von MAPKs, NF- κ B und IRFs (Abb.26; Abb.27), welche die Zytokinproduktion induzieren und regulieren.

Die Ausschüttung von Zytokinen ist keine unmittelbare Reaktion auf die Stimulation von DCs mit LPS oder einem anderen Reifestimulus, sondern unterliegt einer strengen Regulation, in der die Produktion der Zytokine bestimmten Kinetiken unterliegt und in Abhängigkeit zur Natur des jeweiligen Reifestimulus steht. Zu späten Zeitpunkten nach Induktion der Reifung erschöpft die Kapazität der DCs Zytokine zu sezernieren. Aufgrund

dieser sequentiellen Steuerung der Immunantwort mittels Zytokinsekretion, einhergehend mit einer regulierten Expression bestimmter Rezeptortypen, ist eine koordinierte DC-Migration möglich und die Induktion eines bestimmten Typs der T-Zellantwort zum jeweils richtigen Zeitpunkt realisierbar. [465] So hat sich gezeigt, dass die Produktion von IL-6 und TNF- α unmittelbar nach LPS-Stimulation einsetzt und eine Abschwächung ihrer Konzentration schon nach 8-10 Std erfolgt. Im Gegensatz dazu ist eine Akkumulation von IL-10 erst später nachweisbar und erhält für mindestens 24Std ein gewisses Plateau aufrecht. IL12p70 erfährt eine sehr späte (10 Std. nach Stimulation) und transiente Produktion mit einer Dauer von 2-8 Std.[189] Das späte und enge Produktionszeitfenster des prototypischen Th1-polarisierenden Zytokins indiziert, dass IL-12 erst bei Erreichen der Lymphknoten produziert wird um dort naive T-Zellen zu primen.[189, 465] Darüber hinaus konnten Langenkamp *et al.* demonstrieren, dass parallel zum Verlust der IL-12 Produktion DCs von einem Th1-induzierenden in einen Th2-induzierenden Modus wechselten.[189]

Aus humanen Monozyten-generierte CD1a⁺-DCs wiesen eine PUGNAc-induzierte und konzentrationsabhängige Reduktion von CD1a auf ihrer Zelloberfläche auf. (Abb.35) Gleichzeitig konnte auch für die Sekretion von IL-12 eine konzentrationsabhängige Minderung unter PUGNAc-Einfluss nachgewiesen werden. (Abb.44) Der simultane Verlust der CD1a-Expression und der IL-12-Sekretion korreliert mit zwei beschriebenen, aus Monozyten hervorgegangenen, DC-Subpopulationen.[449] Aus Monozyten-generierte DCs lassen sich in CD1a⁺- und CD1a⁻-Subpopulationen aufteilen. Beide Subpopulationen entwickeln sich unter gleichen Kulturbedingungen, haben jedoch bemerkenswert unterschiedliche Fähigkeiten bezüglich der Produktion inflammatorischer Zytokine und der Steuerung naiver CD4⁺ T-Zellantworten. Der prozentuale Anteil CD1a⁺ und CD1a⁻ DCs kann jedoch durch Änderungen der Kultur- und Zytokinbedingungen signifikant beeinflusst werden.[47, 241] Dies spricht gegen eine signifikante Heterogenität von CD14⁺-Monozyten, welche vorbestimmen würde welcher DC-Typ generiert wird. Die Expression von CD1a wurde in einen positiven Zusammenhang bezüglich der IL-12 Sekretion gebracht. CD1a⁺-DCs sezernieren nach Stimulation signifikante Mengen IL-12p70 und polarisieren naive CD4⁺ T-Zellen zur Differenzierung in einen Th1 Phänotypen. Im Gegensatz dazu produzieren CD1a⁻-DCs keine großen Mengen IL12p70 und stimulieren keine T-Zell-Polarisation.[449]

So lässt sich schlussfolgern, dass die in dieser Arbeit nachgewiesene PUGNAc-bedingte Hemmung der IL-12-Sekretion zu einem Ausbleiben der Polarisierung der CD4⁺-T-Zell-Differenzierung, insbesondere zu einem Th1 Phänotypen, führt. In Präsenz reifer DCs und IL-12 entwickeln sich CD4-exprimierende Th-Zellen zu IFN- γ -produzierenden Th1-Zellen.

Diskussion

IFN- γ wiederum aktiviert die antimikrobielle Aktivität von Makrophagen und treibt gemeinsam mit IL-12 die T-Zelldifferenzierung in Killerzellen voran.^[17] Die Konsequenz der HexA-Hemmung läuft also auf ein Ausbleiben der antimikrobiellen Resistenz hinaus.

Während aus Monozyten generierte DCs keine einheitliche Population bilden ^[449] deuten die erzielten FACS-Ergebnisse daraufhin, dass mit zunehmender PUGNac-Konzentration eine immer einheitlicherer kleinerer Phänotyp der DCs erzeugt wird. (Abb.32)

Nicht nur die Sekretion von IL-12, IL-6 und TNF- α wurde durch LPS-stimulierte mDCs unter PUGNac-Einfluss signifikant konzentrationsabhängig gemindert. (Abb.44) Die durch LPS induzierte Sekretion der Chemokine, RANTES und Mip-1 α , wurde ebenfalls signifikant gehemmt. (Abb.44)

Die Chemokin-Superfamilie kann in zwei Subfamilien, α und β , unterteilt werden, wobei RANTES und Mip-1 α zur Letzteren zählen. Die α - und β -Subfamilien unterscheiden sich bezüglich ihrer Selektivität gegenüber Zielzellen. Somit wirken RANTES und Mip-1 α als β -Subfamilienmitglieder präferiert positiv chemotaktisch auf Monozyten, einige Granulozyten (e.g. Neutrophile) und T-lymphozyten. Besonders RANTES/CCL5 besitzt eine gesonderte Rolle. Die Stimulation mit RANTES induziert die Synthese von u.a. Mip-1 α Transkripten und IL-6 und TNF- α Proteinen in mDCs; außerdem agiert es auch auf autokrine Art und Weise indem es RANTES-Transkripte produziert. Diese erstmalig nachgewiesene autokrine Chemokin-Regulation in DCs induziert eine Beteiligung von RANTES in einer Amplifikations-Kaskade.^[89] Entsprechend vehement mögen die Auswirkungen der PUGNac-bedingten Hemmung von RANTES auf eine Immunantwort *in vivo* sein.

DCs sind ein markantes Beispiel für diese so genannte „mehrstufige Navigation“ (Extravasation & Migration); sie verwenden unterschiedliche Sätze an Chemokinrezeptoren um aus dem Blut in entzündetes Gewebe und von dort zu den Lymphgefäßen zu gelangen. Über die Lymphe erreichen sie ihren endgültigen Bestimmungsort in den T-Zell-Bereichen der Lymphknoten. Während Monozyten und unreife mDCs Rezeptoren für inflammatorischer Chemokine (CCR1, CCR2, CCR5 und CXCR1) exprimieren, findet eine Hochregulation von Rezeptoren für konstitutiv Chemokine (CXCR4, CCR4 und insbesondere CCR7) auf reifenden mDCs statt.^[73, 311, 354] Somit wird gewährleistet, dass Monozyten/unreife mDCs durch entsprechende Liganden (IL-8, MIP-1, MCP-1 und RANTES) zu Entzündungsstellen rekrutiert werden ^[311, 354] und im nächsten Schritt vom entzündeten Gewebe über die Lymphbahnen in die T-Zellbereiche der Lymphknoten migrieren können.^[311] Es wird deutlich, dass das letztendliche Entstehen einer T-Zellantwort und deren Polarisierung maßgeblich durch Zytokine und Chemokine geprägt ist.

Einfluss von PUGNAc auf die allostimulatorische Kapazität von $mDCs$

Wie zu erwarten konvergieren die Ergebnisse einer gemischten Lymphozytenreaktion (MLR) mit den vorangegangenen Ergebnissen. (Abb.42) (LPS-)gereifte dendritische Zellen besitzen die Kapazität T-Zellen zu aktivieren. Die Effektivität der T-Zell-Aktivierung wird maßgeblich durch die Intensität der durch Peptid-MHC Molekül-induzierten Signaltransduktion, sowie der essentiellen Amplifikation der Signalprozesse mittels co-stimulatorischer Moleküle und der Stabilität der immunologischen Synapse reguliert.^[465] Beweise häufen sich, dass die Dauer der TCR-Stimulation, zusammen mit polarisierenden Zytokinen, die progressive Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen determiniert.^[465] Eine kurze TCR-Stimulation von CD4⁺ T-Zellen in Abwesenheit von IL-12 soll zu Intermediaten führen, welche zwar proliferieren, jedoch zur Differenzierung zu Effektorzellen von einer zusätzlichen Antigenstimulation in den Lymphknoten abhängig sind. Eine andauernde TCR-Stimulation in Anwesenheit von IL-12 oder IL-4 mündet in die zuvor beschriebenen Polarisierung in IFN- γ produzierende Th1-Zellen oder in Th2 Zellen, die IL-4, IL-5, und IL-13 produzieren. Aus Monozyten-generierte $mDCs$ induzierten nach Stimulation mit LPS eine 6-fach höhere Proliferation von T-Lymphozyten gegenüber unreifen $mDCs$. (Abb.42) Dieses Resultat steht in logischer Konsequenz zur nachgewiesenen Hochregulation Reife-assoziiertes CD-Marker, Produktion von Zytokinen und dem Nachweis einer effektiven Phagozytose und Migration.

Entsprechend wirken sich die Effekte der PUGNAc-induzierten Hemmung dieser Prozesse auf die allostimulatorische Kapazität der $mDCs$ aus. Es konnte eine konzentrationsabhängige Minderung der T-Zell Proliferationsrate nachgewiesen werden. (Abb.42)

6. Ausblick

Schon in früheren Studien hat sich gezeigt, dass Ganglioside und andere Glykosphingolipide eine wichtige Rolle in der Regulation von Immunantworten spielen. Gerade durch ihre Anreicherung in Lipid Rafts, die an zahlreichen Prozessen wie beispielsweise der Signaltransduktion oder Endozytose beteiligt sind, wird ihre Bedeutung in Kommunikations- und Interaktionsvorgängen zwischen Zellen deutlich. Insbesondere innerhalb von immunregulatorischen Prozessen zwischen dendritischen Zellen und T-Zellen sind sie von Bedeutung, wie sich u.a. durch diese Arbeit gezeigt hat. Erst kürzlich demonstrierten Nagafuku *et al.*, dass CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen unterschiedliche Ganglioside exprimieren, und dass diese die Immunfunktionen dieser Subsets mit definieren.^[246]

Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass eine Beeinträchtigung der streng-regulierten GM2-Gangliosid-Expression zum Verlust essentieller immunologischer Eigenschaften humaner dendritischer Zellen, welche *in vitro* aus Monozyten generiert wurden, führt.

In Anlehnung an die charakteristische GM2-Akkumulation in neuronalen Zellen in den GM2-Gangliosidosen kann angenommen werden, dass es durch die Hemmung des GM2-Abbaus in $mDCs$ zu einer, zunächst lysosomalen, Anreicherung des selbigen Gangliosides kommt. Die Alternative einer herunterregulierten GM2-Synthese ist weniger wahrscheinlich und müsste untersucht werden.

Während die PUGNAc-bedingte Hemmung der HexA äußerst vehemente Auswirkungen auf die $mDCs$ hatte, konnte mittels GM2A-Hemmung selbiges nicht demonstriert werden. Wie zuvor beschrieben, darf angenommen werden, dass dies mit einer nicht gänzlichen Hemmung des GM2AP zusammenhängt. Folglich sollte eine alternative Methodik aufschlussreichere Erkenntnisse in diesem Zusammenhang bieten. Die ähnlichen Symptomatiken innerhalb der humanen GM2-Gangliosidosen (Tay-Sachs, Sandhoff und AB Variant) lassen die Suggestion zu, dass sich eine vollständige GM2A-Hemmung in $mDCs$ verglichen zu den demonstrierten Folgen der HexA-Hemmung ähnlich auswirken würden. Im Zuge dieser Arbeit konnte eine PUGNAc-bedingter Verlust der Phagozytoseaktivität unreifer $mDCs$, eine reduzierte Migrationsfähigkeit und allostimulatorische Kapazität in LPS-greiften $mDCs$ einhergehend mit einer Herunterregulierung der Expression bestimmter CD-Moleküle und einer stark verminderten Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine nachgewiesen werden.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass frisch-isolierte humane Monozyten kein/wenig GM2 bzw. GM2A exprimieren, die Expressionslevel im Laufe einer IL-4/Gm-CSF-induzierten Differenzierung in unreife $mDCs$ kontinuierlich ansteigen und in LPS-gereiften $mDCs$ die Expression wieder verringert ist. Wöfl *et al.* demonstrierten, dass extern zugeführtes GM2 die Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen inhibiert, und dass diese „monozytischen DC-Vorläufer“ erhöhte Adhärenz, Spreading und eine reduzierte Dendritenzahl aufwiesen, ebenso wie eine verschlechterte Funktionalität wie in Endozytose-, chemotaktischen und T-Zell-Proliferations-Assays demonstriert wurde.^[493]

Durch diese und andere Nachweise lässt sich postulieren, dass das GM2-Gangliosid während der mDC -Differenzierung differentiell exprimiert wird und essentiell für die Selbige ist.

Es kann suggeriert werden, dass dieses Postulat nicht ausschließlich auf $mDCs$ anwendbar ist, sondern dass Funktionen und Entwicklung jeglicher DC-Subsets auch *in vivo* durch bestimmte Gangliosid-Expressionsmuster determiniert werden. Diese Suggestion wird

Diskussion

durch verschiedene Studien zu Auswirkungen von Tumor-abstammenden Gangliosiden auf DCs bestärkt.

Bisher liegt die Annahme nahe, dass es aufgrund einer GM2-Akkumulation im Lysosom zu einer Blockade der Phagozytose kommt, und dass die nachgewiesenen Beeinträchtigungen der oben aufgeführten intrinsischen Eigenschaften, die normalerweise mit einer DC-Differenzierung und -Reifung einhergehen, Folgen der ausbleibenden Antigenaufnahme und -prozessierung sind. Die diesen Prozessen zugrundeliegenden molekulare biologischen Mechanismen sind bisher noch ungeklärt und sollten in zukünftigen Untersuchungen aufgedeckt werden.

Dabei gilt weiterhin zu beachten, dass eine HexA-Hemmung durch PUGNAc möglicherweise nicht über genügend Spezifität verfügt (OGA) und auch hier alternative Inhibitoren oder Methoden Verwendung finden sollten um die erzielten (und fortführenden) Ergebnisse zu verifizieren.

Zur Zeit wird der Einfluss des PUGNAc-Inhibitors auf transkriptioneller Ebene untersucht (e.g. Zytokine) und innerhalb der Lipidanalyse geprüft, ob sich mögliche PUGNAc-bedingte Veränderungen der Lipidzusammensetzung in Monozyten, unreifen und LPS-gereiften $mDCs$ abzeichnen. Wie bereits erwähnt, wären zur Veranschaulichung des Prozesses der Phagosom-/Phagolysosom-Bildung, eine fluoreszenzmikroskopische Analyse, Laser Scanning Mikroskopie (LSM) oder ein Live Cell Imaging von Vorteil.

Außerdem ist die Untersuchung weiterer am LPS-Signaling beteiligten Proteine notwendig um Erkenntnisse in das Enigma zu bringen, welche Aspekte des PUGNAc-induzierten Phänotyps Folge oder Ursache der GM2-Metabolismus-Manipulation sind und wo der Anfang der vermeintlichen Kettenreaktion steht.

Sollten fortführende Untersuchungen von Erfolg gekrönt sein, könnte(n) GM2, bzw. Ganglioside an sich, ein vielversprechendes Tool zur Optimierung der DC-Funktionalität innerhalb von Tumorstimmungen und Immuntherapien darstellen.

Literaturverzeichnis

- (1) Aerts-Toegaert C, Heirman C, Tuybaerts S, Corthals J, Aerts JL, Bonehill A, Thielemans K, Breckpot K. CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses. *Eur J Immunol.* 2007 Mar;37(3):686-95.
- (2) Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004 Jul;4(7):499-511. Review.
- (3) Appay V, Douek DC, Price DA. CD8+ T cell efficacy in vaccination and disease. *Nat Med.* 2008 Jun;14(6):623-8. Review.
- (4) Appel S, Bringmann A, Grünebach F, Weck MM, Bauer J, Brossart P. Epithelial-specific transcription factor ESE-3 is involved in the development of monocyte-derived DCs *Blood.* 2006 Apr 15;107(8):3265-70.
- (5) Appel S, Mirakaj V, Bringmann A, Weck MM, Grünebach F, Brossart P. PPAR-gamma agonists inhibit toll-like receptor-mediated activation of dendritic cells via the MAP kinase and NF-kappaB pathways *Blood.* 2005 Dec 1;106(12):3888-94.
- (6) Appel S, Rupf A, Weck MM, Schoor O, Brümmendorf TH, Weinschenk T, Grünebach F, Brossart P. Effects of imatinib on monocyte-derived dendritic cells are mediated by inhibition of nuclear factor-kappaB and Akt signaling pathways *Clin Cancer Res.* 2005 Mar 1;11(5):1928-40.
- (7) Appleman LJ, Boussiotis VA. T cell anergy and costimulation. *Immunol Rev.* 2003 Apr;192:161-80. Review.
- (8) Ardeschna KM, Pizzey AR, Devereux S, Khwaja A. The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood.* 2000 Aug 1;96(3):1039-46.
- (9) Arias EB, Kim J, Cartee GD. Prolonged incubation in PUGNAc results in increased protein O-Linked glycosylation and insulin resistance in rat skeletal muscle. *Diabetes.* 2004 Apr;53(4):921-30.
- (10) Arrighi JF, Rebsamen M, Rousset F, Kindler V, Hauser C. A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers. *J Immunol.* 2001 Mar 15;166(6):3837-45.
- (11) Asford C, Pedroza-Gonzalez A, Gallegos M, Tindle S, Burton EC, Su D, Marches F, Banchereau J, Palucka AK. Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development. *J Exp Med.* 2007 May 14;204(5):1037-47.
- (12) Bahlis NJ, King AM, Kolonias D, Carlson LM, Liu HY, Hussein MA, Terebello HR, Byrne GE Jr, Levine BL, Boise LH, Lee KP. CD28-mediated regulation of multiple myeloma cell proliferation and survival. *Blood.* 2007 Jun 1;109(11):5002-10.
- (13) Ballestrero A, Boy D, Moran E, Cirmena G, Brossart P, Nencioni A. Immunotherapy with dendritic cells for cancer. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008 Jan 14;60(2):173-83. Review.
- (14) Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:767-811. Review.
- (15) Banchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M, Burkeholder S, Taquet N, Rolland A, Taquet S, Coquery S, Wittkowski KM, Bhardwaj N, Pineiro L, Steinman R, Fay J. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res.* 2001 Sep 1;61(17):6451-8.
- (16) Banchereau J, Palucka AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol.* 2005 Apr;5(4):296-306. Review.
- (17) Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity *Nature.* 1998 Mar 19;392(6673):245-52. Review.
- (18) Banchereau J, Ueno H, Dhodapkar M, Connolly J, Finholt JP, Klechevsky E, Blanck JP, Johnston DA, Palucka AK, Fay J. Immune and clinical outcomes in patients with stage IV melanoma vaccinated with peptide-pulsed dendritic cells derived from CD34+ progenitors and activated with type I interferon. *J Immunother.* 2005 Sep-Oct;28(5):505-16.
- (19) Basu S, Fenton MJ. Toll-like receptors: function and roles in lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004 May;286(5):L887-92. Review.
- (20) Bax M, Kuijff ML, Heikema AP, van Rijs W, Bruijns SC, García-Vallejo JJ, Crocker PR, Jacobs BC, van Vliet SJ, van Kooyk Y. Campylobacter jejuni lipooligosaccharides modulate dendritic cell-mediated T cell polarization in a sialic acid linkage-dependent manner. *Infect Immun.* 2011 Jul;79(7):2681-9.
- (21) Beccari T, Balducci C, Aisa MC, Della Fazio MA, Servillo G, Orlacchio A. Promoter characterization and expression of the gene coding for the human GM2 activator protein *Biosci Rep.* 2001 Feb;21(1):55-62.
- (22) Becker D, Valk E, Zahn S, Brand P, Knop J. Coupling of contact sensitizers to thiol groups is a key event for the activation of monocytes and monocyte-derived dendritic cells. *J Invest Dermatol.* 2003 Feb;120(2):233-8.
- (23) Belz GT, Nutt SL. Transcriptional programming of the dendritic cell network *Nat Rev Immunol.* 2012 Jan 25;12(2):101-13. Review.
- (24) Bennaceur K, Popa I, Portoukalian J, Berthier-Vergnes O, Péguet-Navarro J. Melanoma-derived gangliosides impair migratory and antigen-presenting function of human epidermal Langerhans cells and induce their apoptosis. *Int Immunol.* 2006 Jun;18(6):879-86.

Literaturverzeichnis

- (25) Berchtold S, Mühl-Zürbes P, Heufler C, Winklehner P, Schuler G, Steinkasserer A. Cloning, recombinant expression and biochemical characterization of the murine CD83 molecule which is specifically upregulated during dendritic cell maturation. *FEBS Lett.* 1999 Nov 19;461(3):211-6.
- (26) Berger TG, Schulze-Koops H, Schäfer M, Müller E, Lutz MB. Immature and maturation-resistant human dendritic cells generated from bone marrow require two stimulations to induce T cell anergy in vitro. *PLoS ONE.* 2009;4(8)e6645
- (27) Bierfreund U, Kolter T, Sandhoff K. Sphingolipid hydrolases and activator proteins. *Methods Enzymol.* 2000;311:255-76.
- (28) Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med.* 2002 Dec 16;196(12):1627-38.
- (29) Bonifaz LC, Bonnyay DP, Charalambous A, Darguste DI, Fujii S, Soares H, Brimnes MK, Moltedo B, Moran TM, Steinman RM. In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med.* 2004 Mar 15;199(6):815-24.
- (30) Boon T, Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol.* 2006; 24:175-208.
- (31) Brightbill HD, Modlin RL. Toll-like receptors: molecular mechanisms of the mammalian immune response. *Immunology.* 2000 Sep;101(1):1-10. Review.
- (32) Brightbill HD, Plevy SE, Modlin RL, Smale ST. A prominent role for Sp1 during lipopolysaccharide-mediated induction of the IL-10 promoter in macrophages. *J Immunol.* 2000 Feb 15;164(4):1940-51.
- (33) Brockner T. Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells. *J Exp Med.* 1997;186:1223-1232.
- (34) Brossart P, Wirths S, Brugger W, Kanz L. Dendritic cells in cancer vaccines. *Exp Hematol.* 2001 Nov;29(11):1247-55. Review.
- (35) Brossart P, Wirths S, Stuhler G, Reichardt VL, Kanz L, Brugger W. Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood.* 2000 Nov 1;96(9):3102-8.
- (36) Brossart P, Zobywalski A, Grünebach F, Behnke L, Stuhler G, Reichardt VL, Kanz L, Brugger W. Tumor necrosis factor alpha and CD40 ligand antagonize the inhibitory effects of interleukin 10 on T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Cancer Res.* 2000 Aug 15;60(16):4485-92.
- (37) Brown MD, Sacks DB. Protein scaffolds in MAP kinase signalling. *Cell Signal.* 2009 Apr;21(4):462-9. Review.
- (38) Burg J, Banerjee A, Sandhoff K. Molecular forms of GM2-activator protein. A study on its biosynthesis in human skin fibroblasts. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1985 Sep;366(9):887-91.
- (39) Burns S, Hardy SJ, Buddle J, Yong KL, Jones GE, Thrasher AJ. Maturation of DC is associated with changes in motile characteristics and adherence. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2004 Feb;57(2):118-32.
- (40) Butkinaree C, Park K, Hart GW. O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Feb;1800(2):96-106. Review.
- (41) Caldwell S, Heitger A, Shen W, Liu Y, Taylor B, Ladisch S. Mechanisms of ganglioside inhibition of APC function. *J Immunol.* 2003 Aug 15;171(4):1676-83.
- (42) Cao W, Bover L, Cho M, Wen X, Hanabuchi S, Bao M, Rosen DB, Wang YH, Shaw JL, Du Q, Li C, Arai N, Yao Z, Lanier LL, Liu YJ. Regulation of TLR7/9 responses in plasmacytoid dendritic cells by BST2 and ILT7 receptor interaction. *J Exp Med.* 2009 Jul 6;206(7):1603-14.
- (43) Caparrós E, Muñoz P, Sierra-Filardi E, Serrano-Gómez D, Puig-Kröger A, Rodríguez-Fernández JL, Mellado M, Sancho J, Zubiaur M, Corbí AL. DC-SIGN ligation on dendritic cells results in ERK and PI3K activation and modulates cytokine production. *Blood.* 2006 May 15;107(10):3950-8.
- (44) Castaneda JA, Lim MJ, Cooper JD, Pearce DA. Immune system irregularities in lysosomal storage disorders. *Acta Neuropathol.* 2008 Feb;115(2):159-74. Review.
- (45) Cathelin D, Met Ö, Svane IM. Silencing of the glucocorticoid-induced leucine zipper improves the immunogenicity of clinical-grade dendritic cells. *Cytotherapy.* 2013 Jun;15(6):740-9.
- (46) Chadee DN, Kyriakis JM. MLK3 is required for mitogen activation of B-Raf, ERK and cell proliferation. *Nat Cell Biol.* 2004 Aug;6(8):770-6.
- (47) Chang CC, Wright A, Punnonen J. Monocyte-derived CD1a+ and CD1a- dendritic cell subsets differ in their cytokine production profiles, susceptibilities to transfection, and capacities to direct Th cell differentiation. *J Immunol.* 2000 Oct 1;165(7):3584-91.
- (48) Chen B, Rigat B, Curry C, Mahuran DJ. Structure of the GM2A gene: identification of an exon 2 nonsense mutation and a naturally occurring transcript with an in-frame deletion of exon 2. *Am J Hum Genet.* 1999 Jul;65(1):77-87.

Literaturverzeichnis

- (49) Chen GY, Brown NK, Wu W, Khedri Z, Yu H, Chen X, van de Vlekkert D, D'Azzo A, Zheng P, Liu Y. Broad and direct interaction between TLR and Siglec families of pattern recognition receptors and its regulation by Neu1. *Elife*. 2014 Sep 3;3.
- (50) Chen, P., J. Li, J. Barnes, G. C. Kokkonen, J. C. Lee, Y. Liu. 2002. Restraint of proinflammatory cytokine biosynthesis by mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J. Immunol.* 169: 6408-6416.
- (51) Cheresch DA, Pierschbacher MD, Herzig MA, Mujoo K. Disialogangliosides GD2 and GD3 are involved in the attachment of human melanoma and neuroblastoma cells to extracellular matrix proteins. *J Cell Biol.* 1986 Mar;102(3):688-96
- (52) Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Palucka AK. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nature Immunol.* 2000; 1:510-514.
- (53) Chu WM, Ostertag D, Li ZW, Chang L, Chen Y, Hu Y, Williams B, Perrault J, Karin M. JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity.* 1999 Dec;11(6):721-31.
- (54) Cohen N, Mouly E, Hamdi H, Maillot M-C, Pallardy M, Godot V, et al. GILZ expression in human dendritic cells redirects their maturation and prevents antigen-specific T lymphocyte response. *Blood.* 2006;107:2037e44.
- (55) Colell A, García-Ruiz C, Roman J, Ballesta A, Fernández-Checa JC. Ganglioside GD3 enhances apoptosis by suppressing the nuclear factor-kappa B-dependent survival pathway. *FASEB J.* 2001 Apr;15(6):1068-70
- (56) Collin M, Bigley V, Haniffa M, Hambleton S. Human dendritic cell deficiency: the missing ID? *Nat Rev Immunol.* 2011 Aug 19;11(9):575-83. Review.
- (57) Conzelmann E, Burg J, Stephan G, Sandhoff K. Complexing of glycolipids and their transfer between membranes by the activator protein for degradation of lysosomal ganglioside GM2. *Eur J Biochem.* 1982 Apr 1;123(2):455-64.
- (58) Conzelmann, K. Sandhoff, Partial enzyme deficiencies: residual activities the development of neurological disorders, *Dev. Neurosci.* 6 (1983/84) 58-71.
- (59) Coukos G, Benencia F, Buckanovich RJ, Conejo-Garcia JR. The role of dendritic cell precursors in tumour vasculogenesis. *Br J Cancer.* 2005; 92:1182-1187.
- (60) Coutinho MF, Prata MJ, Alves S. Mannose-6-phosphate pathway: a review on its role in lysosomal function and dysfunction. *Mol Genet Metab.* 2012 Apr;105(4):542-50. Review
- (61) Crespo HJ, Lau JT, Videira PA. Dendritic cells: a spot on sialic Acid. *Front Immunol.* 2013 Dec 27;4:491. Review.
- (62) Curiel TJ, Cheng P, Mottram P, Alvarez X, Moons L, Evdemon-Hogan M, Wei S, Zou L, Kryczek I, Hoyle G, Lackner A, Carmeliet P, Zou W. Dendritic cell subsets differentially regulate angiogenesis in human ovarian cancer. *Cancer Res.* 2004 Aug 15;64(16):5535-8.
- (63) Dannull J, Su Z, Rizzieri D, Yang BK, Coleman D, Yancey D, Zhang A, Dahm P, Chao N, Gilboa E, Vieweg J. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J Clin Invest.* 2005 Dec;115(12):3623-33.
- (64) Darcy PK, Neeson P, Yong CS, Kershaw MH. Manipulating immune cells for adoptive immunotherapy of cancer. *Curr Opin Immunol.* 2014 Feb 14;27C:46-52. Review.
- (65) Davidson MG, Alonso MN, Yuan R, Axtell RC, Kenkel JA, Suhoski MM, González JC, Steinman L, Engleman EG. Th17 cells induce Th1-polarizing monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2013 Aug 1;191(3):1175-87.
- (66) de Jong EC, Smits HH, Kapsenberg ML. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin Immunopathol.* 2005 Jan;26(3):289-307. Review.
- (67) de Saint-Vis B, Fugier-Vivier I, Massacrier C, Gaillard C, Vanbervliet B, Ait-Yahia S, Banchereau J, Liu YJ, Lebecque S, Caux C. The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. *J Immunol.* 1998 Feb 15;160(4):1666-76.
- (68) de Saint-Vis B, Vincent J, Vandenabeele S, Vanbervliet B, Pin JJ, Ait-Yahia S, Patel S, Mattei MG, Banchereau J, Zurawski S, Davoust J, Caux C, Lebecque S. A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity.* 1998 Sep;9(3):325-36.
- (69) de Witte L, Nabatov A, Pion M, Fluitsma D, de Jong MA, de Gruijl T, Piguet V, van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nat Med.* 2007 Mar;13(3):367-71.
- (70) DeGasperi R, Li YT, Li SC. Isolation and characterization of an activator protein for the hydrolysis of ganglioside GM2 from the roe of striped mullet (*Mugil cephalus*). *Biochem J.* 1989 Jun 15;260(3):777-83.
- (71) Desnick RJ, Ioannou YA, Eng CM (1995) a-galactosidase A deficiency: Fabry disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic and molecular basis of inherited diseases*, 7th ed. McGraw-Hill, New York, pp 2741-2784

Literaturverzeichnis

- (72) Diamond MS, Kinder M, Matsushita H, Mashayekhi M, Dunn GP, Archambault JM, Lee H, Arthur CD, White JM, Kalinke U, Murphy KM, Schreiber RD. Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *J Exp Med*. 2011 Sep 26;208(10):1989-2003.
- (73) Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Ait-Yahia S, Brière F, Zlotnik A, Lebecque S, Caux C. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med*. 1998 Jul 20;188(2):373-86.
- (74) Doan T, McNally A, Thomas R, Steptoe RJ. Steady-state dendritic cells continuously inactivate T cells that escape thymic negative selection. *Immunol Cell Biol*. 2009 Nov-Dec;87(8):615-22.
- (75) Dong C, Davis RJ, Flavell RA. MAP Kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:55-72. Review.
- (76) Dorfmueller HC, Borodkin VS, Schimpl M, Shepherd SM, Shpiro NA, van Aalten DM. GlcNAc6S: a picomolar, selective O-GlcNAcase inhibitor that modulates intracellular O-glcNAcylation levels. *J Am Chem Soc*. 2006 Dec 27;128(51):16484-5.
- (77) Dorfmueller HC, Borodkin VS, Schimpl M, Zheng X, Kime R, Read KD, van Aalten DM. Cell-penetrant, nanomolar O-GlcNAcase inhibitors selective against lysosomal hexosaminidases. *Chem Biol*. 2010 Nov 24;17(11):1250-5.
- (78) Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, Buchholz VR, Trumppfheller C, Yamazaki S, Cheong C, Liu K, Lee HW, Park CG, Steinman RM, Nussenzweig MC. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science*. 2007 Jan 5;315(5808):107-11.
- (79) Enk AH, Jonuleit H, Saloga J, Knop J. Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. *Int J Cancer* 1997;73:309-316.
- (80) Escudier B, Dorval T, Chaput N, André F, Caby MP, Novault S, Flament C, Leboulaire C, Borg C, Amigorena S, Boccaccio C, Bonnerot C, Dhellin O, Movassagh M, Piperno S, Robert C, Serra V, Valente N, Le Pecq JB, Spatz A, Lantz O, Tursz T, Angevin E, Zitvogel L. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J Transl Med*. 2005 Mar 2;3(1):10.
- (81) Ezzelarab M, Thomson AW. Tolerogenic dendritic cells and their role in transplantation. *Seminars in Immunology*. 2011;23(4):252-263.
- (82) Fabrega S, Durand P, Codogno P, Bauvy C, Delomenie C, Henrissat B, Martin BM, McKinney C, Ginns EI, Mornon JP, Lehn P. Human glucocerebrosidase: heterologous expression of active site mutants in murine null cells. *Glycobiology*. 2000 Nov;10(11):1217-24.
- (83) Faure-André G, Vargas P, Yuseff MI, et al. Regulation of dendritic cell migration by CD74, the MHC class II-associated invariant chain. *Science* 2008;322:1705-10.
- (84) Feizi T. Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens. *Nature*. 1985 Mar 7-13;314(6006):53-7.
- (85) Figdor CG, van Kooyk Y, Adema GJ. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol*. 2002 Feb;2(2):77-84. Review.
- (86) Finn OJ. Cancer immunology. *N Engl J Med*. 2008 Jun 19;358(25):2704-15. Review.
- (87) Finn OJ. Cancer vaccines: between the idea and the reality. *Nat Rev Immunol*. 2003 Aug;3(8):630-41. Review.
- (88) Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol*. 1991 May 15;146(10):3444-51.
- (89) Fischer FR, Luo Y, Luo M, Santambrogio L, Dorf ME. RANTES-induced chemokine cascade in dendritic cells. *J Immunol*. 2001 Aug 1;167(3):1637-43.
- (90) Fleischer J, Soeth E, Reiling N, Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. Differential expression and function of CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) on human peripheral blood monocytes. *Immunology*. 1996 Dec;89(4):592-8.
- (91) Fong L, Hou Y, Rivas A, Benike C, Yuen A, Fisher GA, Davis MM, Engleman EG. Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 17;98(15):8809-14.
- (92) Förster R, Davalos-Misslitz AC, Rot A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2008 May;8(5):362-71. Review.
- (93) Frasca L, Fedele G, Deaglio S, et al. CD38 orchestrates migration, survival, and Th1 immune response of human mature dendritic cells. *Blood* 2006;107:2392-9.
- (94) Freedman AS, Freeman GJ, Rhyhart K, Nadler LM. Selective induction of B7/BB-1 on interferon-gamma stimulated monocytes: a potential mechanism for amplification of T cell activation through the CD28 pathway. *Cell Immunol*. 1991 Oct 15;137(2):429-37.
- (95) Fuertes MB, Kacha AK, Kline J, Woo SR, Kranz DM, Murphy KM, Gajewski TF. Host type I IFN signals are required for antitumor CD8+ T cell responses through CD8 α + dendritic cells. *J Exp Med*. 2011 Sep 26;208(10):2005-16.
- (96) Fujimoto Y, Tu L, Miller AS, Bock C, Fujimoto M, Doyle C, Steeber DA, Tedder TF. CD83 expression influences CD4+ T cell development in the thymus. *Cell*. 2002 Mar 22;108(6):755-67.

Literaturverzeichnis

- (97) Fujita T, Kimura Y, Miyamoto M, Barsoumian EL, Taniguchi T. Induction of endogenous IFN-alpha and IFN-beta genes by a regulatory transcription factor, IRF-1. *Nature*. 1989 Jan 19;337(6204):270-2.
- (98) Fujitani M, Kawai H, Proia RL, Kashiwagi A, Yasuda H, Yamashita T. Binding of soluble myelin-associated glycoprotein to specific gangliosides induces the association of p75NTR to lipid rafts and signal transduction. *J Neurochem*. 2005 Jul;94(1):15-21.
- (99) Gabriele L, Ozato K. The role of the interferon regulatory factor (IRF) family in dendritic cell development and function. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2007 Oct-Dec;18(5-6):503-10. Review.
- (100) Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone DP. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 1996;2:1096-1103
- (101) Gadola SD, Zaccai NR, Harlos K, Shepherd D, Castro-Palomino JC, Ritter G, Schmidt RR, Jones EY, Cerundolo V. Structure of human CD1b with bound ligands at 2.3Å, a maze for alkyl chains. *Nat Immunol*. 2002 Aug;3(8):721-6.
- (102) Gallagher E, Enzler T, Matsuzawa A, Anzelon-Mills A, Otero D, Holzer R, Janssen E, Gao M, Karin M. Kinase MEKK1 is required for CD40-dependent activation of the kinases Jnk and p38, germinal center formation, B cell proliferation and antibody production. *Nat Immunol*. 2007 Jan;8(1):57-63.
- (103) Garcia-Garcia E, Grayfer L, Stafford JL, Belosevic M. Evidence for the presence of functional lipid rafts in immune cells of ectothermic organisms. *Dev Comp Immunol*. 2012 Jun;37(2):257-69.
- (104) Gasparini C, Foxwell BM, Feldmann M. RelB/p50 regulates TNF production in LPS-stimulated dendritic cells and macrophages. *Cytokine*. 2013 Mar;61(3):736-40.
- (105) Gautier G, de Saint-Vis B, Sénéchal B, Pin JJ, Bates EE, Caux C, Geissmann F, Garrone P. The class 6 semaphorin SEMA6A is induced by interferon-gamma and defines an activation status of langerhans cells observed in pathological situations. *Am J Pathol*. 2006 Feb;168(2):453-65.
- (106) Gerlini G, Tun-Kyi A, Dudli C, Burg G, Pimpinelli N, Nestle FO. Metastatic melanoma secreted IL-10 down-regulates CD1 molecules on dendritic cells in metastatic tumor lesions. *Am J Pathol* 2004;165:1853-1863.
- (107) Germain RN. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol*. 2002 May;2(5):309-22. Review.
- (108) Gerondakis S, Fulford TS, Messina NL, Grumont RJ. NF-κB control of T cell development. *Nat Immunol*. 2014 Jan;15(1):15-25. Review.
- (109) Gerondakis S, Siebenlist U. Roles of the NF-κB pathway in lymphocyte development and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 May;2(5):a000182. Review.
- (110) Gieselmann, What can cell biology tell us about heterogeneity in lysosomal storage diseases? *Acta Paediatr., Suppl.* 94 (447) (2005) 80-86.
- (111) Gilboa E. The makings of a tumor rejection antigen. *Immunity*. 1999; 11:263-270.
- (112) Girolomoni G, Zambruno G, Manfredini R, Zacchi V, Ferrari S, Cossarizza A, Giannetti A. Expression of B7 costimulatory molecule in cultured human epidermal Langerhans cells is regulated at the mRNA level. *J Invest Dermatol*. 1994 Jul;103(1):54-9.
- (113) Goldberg H, Whiteside C, Fantus IG. O-linked β-N-acetylglucosamine supports p38 MAPK activation by high glucose in glomerular mesangial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011 Oct;301(4):E713-26.
- (114) Gonwa TA, Westrick MA, Macher BA. Inhibition of mitogen- and antigen-induced lymphocyte activation by human leukemia cell gangliosides. *Cancer Res*. 1984 Aug;44(8):3467-70.
- (115) Gordon JR, Ma Y, Churchman L, Gordon SA, Dawicki W. Regulatory dendritic cells for immunotherapy in immunologic diseases *Front Immunol*. 2014 Jan 31;5:7. Review.
- (116) Gouni-Berthold I, Seul C, Ko Y, Hescheler J, Sachinidis A. Gangliosides GM1 and GM2 induce vascular smooth muscle cell proliferation via extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway. *Hypertension*. 2001 Nov;38(5):1030-7.
- (117) Granucci F, Ferrero E, Foti M, Aggularo D, Vettoretto K, Ricciardi-Castagnoli P. Early events in dendritic cell maturation induced by LPS. *Microbes Infect*. 1999 Nov;1(13):1079-84.
- (118) Hailman E, Lichenstein HS, Wurfel MM et al. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med* 1994; 179:269-77.
- (119) Hakomori S, Igarashi Y. Functional role of glycosphingolipids in cell recognition and signaling. *J Biochem*. 1995 Dec;118(6):1091-103. Review.
- (120) Hakomori S, Kannagi R. Glycosphingolipids as tumor-associated and differentiation markers. *J Natl Cancer Inst*. 1983 Aug;71(2):231-51
- (121) Hakomori S. Bifunctional role of glycosphingolipids. Modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions. *J Biol Chem*. 1990 Nov 5;265(31):18713-6. Review.

Literaturverzeichnis

- (122) Hakomori S. Carbohydrate-to-carbohydrate interaction, through glycosynapse, as a basis of cell recognition and membrane organization. *Glycoconj J.* 2004;21(3-4):125-37. Review.
- (123) Hakomori S. Ganglioside receptors: a brief overview and introductory remarks. *Adv Exp Med Biol.* 1984;174:333-9.
- (124) Hakomori SI. Cell adhesion/recognition and signal transduction through glycosphingolipid microdomain. *Glycoconj J.* 2000 Mar-Apr;17(3-4):143-51. Review.
- (125) Haltiwanger RS, Grove K, Philipsberg GA. Modulation of O-linked N-acetylglucosamine levels on nuclear and cytoplasmic proteins in vivo using the peptide O-GlcNAc-beta-N-acetylglucosaminidase inhibitor O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate. *J Biol Chem.* 1998 Feb 6;273(6):3611-7.
- (126) Hama Y, Li YT, Li SC. Interaction of GM2 activator protein with glycosphingolipids. *J Biol Chem.* 1997 Jan 31;272(5):2828-33.
- (127) Hammarfjord O, Wallin RP. Dendritic cell function at low physiological temperature. *J Leukoc Biol.* 2010 Oct;88(4):747-56.
- (128) Harada H, Fujita T, Miyamoto M, Kimura Y, Maruyama M, Furia A, Miyata T, Taniguchi T. Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. *Cell.* 1989 Aug 25;58(4):729-39.
- (129) Hart GW, Housley MP, Slawson C. Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature.* 2007 Apr 26;446(7139):1017-22. Review.
- (130) Hashimoto S, Suzuki T, Dong HY, Nagai S, Yamazaki N, Matsushima K. Serial analysis of gene expression in human monocyte-derived dendritic cells. *Blood.* 1999 Aug 1;94(3):845-52.
- (131) Hassan AJ, Zeng J, Ni X, Morales CR. The trafficking of prosaposin (SGP-1) and GM2AP to the lysosomes of TM4 Sertoli cells is mediated by sortilin and monomeric adaptor proteins. *Mol Reprod Dev.* 2004 Aug;68(4):476-83.
- (132) Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, Ravetch JV, Steinman RM, Nussenzweig MC. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med.* 2001 Sep 17;194(6):769-79.
- (133) Haziot A, Chen S, Ferrero E, Low MG, Silber R, Goyert SM. The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J Immunol* 1988; 141:547-52.
- (134) Heng HH, Xie B, Shi XM, Tsui LC, Mahuran DJ. Refined mapping of the GM2 activator protein (GM2A) locus to 5q31.3-q33.1, distal to the spinal muscular atrophy locus. *Genomics.* 1993 Nov;18(2):429-31.
- (135) Hettmer S, Ladisch S, Kaucic K. Low complex ganglioside expression characterizes human neuroblastoma cell lines. *Cancer Lett.* 2005 Jul 8;225(1):141-9.
- (136) Higano CS, Schellhammer PF, Small EJ, Burch PA, Nemunaitis J, Yuh L, Provost N, Frohlich MW. Integrated data from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trials of active cellular immunotherapy with sipuleucel-T in advanced prostate cancer. *Cancer.* 2009 Aug 15;115(16):3670-9.
- (137) Hildenbrand B, Sauer B, Kalis O, Stoll C, Freudenberg MA, Niedermann G, Giesler JM, Jüttner E, Peters JH, Häring B, Leo R, Unger C, Azemar M. Immunotherapy of patients with hormone-refractory prostate carcinoma pre-treated with interferon-gamma and vaccinated with autologous PSA-peptide loaded dendritic cells--a pilot study. *Prostate.* 2007 Apr 1;67(5):500-8.
- (138) Hiraiwa M, Martin BM, Kishimoto Y, Conner GE, Tsuji S, O'Brien JS. Lysosomal proteolysis of prosaposin, the precursor of saposins (sphingolipid activator proteins): its mechanism and inhibition by ganglioside. *Arch Biochem Biophys.* 1997 May 1;341(1):17-24.
- (139) Hock BD, Kato M, McKenzie JL, Hart DN. A soluble form of CD83 is released from activated dendritic cells and B lymphocytes, and is detectable in normal human sera. *Int Immunol.* 2001 Jul;13(7):959-67.
- (140) Höltl L, Ramoner R, Zelle-Rieser C, Gander H, Putz T, Papesch C, Nussbaumer W, Falkensammer C, Bartsch G, Thurnher M. Allogeneic dendritic cell vaccination against metastatic renal cell carcinoma with or without cyclophosphamide. *Cancer Immunol Immunother.* 2005 Jul;54(7):663-70.
- (141) Hoon DS, Okun E, Neuwirth H, Morton DL, Irie RF. Aberrant expression of gangliosides in human renal cell carcinomas. *J Urol.* 1993 Dec;150(6):2013-8.
- (142) Horsch M, Hoesch L, Vasella A, Rast DM. N-acetylglucosaminono-1,5-lactone oxime and the corresponding (phenylcarbamoyl)oxime. Novel and potent inhibitors of beta-N-acetylglucosaminidase. *Eur J Biochem.* 1991 May 8;197(3):815-8.
- (143) Hossain DM, Mohanty S, Ray P, Das T, Sa G. Tumor gangliosides and T cells: a deadly encounter. *Front Biosci (Schol Ed).* 2012 Jan 1;4:502-19. Review.
- (144) Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, Engleman EG, Levy R. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med.* 1996 Jan;2(1):52-8.
- (145) Hu J, Winqvist O, Flores-Morales A, Wikström AC, Norstedt G. SOCS2 influences LPS induced human monocyte-derived dendritic cell maturation. *PLoS One.* 2009 Sep 25;4(9):e7178.

Literaturverzeichnis

- (146) Huang FP, Platt N, Wykes M, Major JR, Powell TJ, Jenkins CD et al. A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J Exp Med* 2000;191:435-444.
- (147) Hurwitz R, Ferlinz K, Vielhaber G, Moczall H, Sandhoff K. Processing of human acid sphingomyelinase in normal and I-cell fibroblasts. *J Biol Chem*. 1994 Feb 18;269(7):5440-5.
- (148) Idoyaga J, Fiorese C, Zbytnuik L, Lubkin A, Miller J, Malissen B, Mucida D, Merad M, Steinman RM. Specialized role of migratory dendritic cells in peripheral tolerance induction. *J Clin Invest*. 2013 Feb 1;123(2):844-54.
- (149) Irie RF, Irie K, Morton DL. A membrane antigen common to human cancer and fetal brain tissues. *Cancer Res*. 1976 Sep;36(9 PT 2):3510-7.
- (150) Ishida A, Akita K, Mori Y, Tanida S, Toda M, Inoue M, Nakada H. Negative Regulation of Toll-like Receptor-4 Signaling through the Binding of Glycosylphosphatidylinositol-anchored Glycoprotein, CD14, with the Sialic Acid-binding Lectin, CD33. *J Biol Chem*. 2014 Sep 5;289(36):25341-50.
- (151) Ito T, Inaba M, Inaba K, Toki J, Sogo S, Iguchi T, Adachi Y, Yamaguchi K, Amakawa R, Valladeau J, Saeland S, Fukuhara S, Ikehara S. A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells. *J Immunol*. 1999 Aug 1;163(3):1409-19.
- (152) Jales A, Falahati R, Mari E, Stemmy EJ, Shen W, Southammakosane C, Herzog D, Ladisch S, Leitenberg D. Ganglioside-exposed dendritic cells inhibit T-cell effector function by promoting regulatory cell activity. *Immunology*. 2011 Jan;132(1):134-43.
- (153) Jeffrey KL, Camps M, Rommel C, Mackay CR. Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses. *Nat Rev Drug Discov*. 2007 May;6(5):391-403. Review.
- (154) Jiang HR, Muckersie E, Robertson M, Xu H, Liversidge J, Forrester JV. Secretion of interleukin-10 or interleukin-12 by LPS-activated dendritic cells is critically dependent on time of stimulus relative to initiation of purified DC culture. *J Leukoc Biol*. 2002 Nov;72(5):978-85.
- (155) Jin P, Han TH, Ren J, Saunders S, Wang E, Marincola FM, Stroncek DF. Molecular signatures of maturing dendritic cells: implications for testing the quality of dendritic cell therapies. *J Transl Med*. 2010 Jan 15;8:4.
- (156) Jochem D, Richter A, Hoffmann L, Iwig K, Fahlenkamp D, Zakrzewski G, Schmitt E, Dannenberg T, Lehmann W, von Wietersheim J, Doehn C. Adjuvant autologous renal tumour cell vaccine and risk of tumour progression in patients with renal-cell carcinoma after radical nephrectomy: phase III, randomised controlled trial. *Lancet*. 2004 Feb 21;363(9409):594-9.
- (157) Kadowaki N, Antonenko S, Ho S, Rissoan MC, Soumelis V, Porcelli SA, Lanier LL, Liu YJ. Distinct cytokine profiles of neonatal natural killer T cells after expansion with subsets of dendritic cells. *J Exp Med*. 2001 May 21;193(10):1221-6.
- (158) Kadowaki N, Antonenko S, Lau JY, Liu YJ. Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med*. 2000 Jul 17;192(2):219-26.
- (159) Kaisho T, Takeuchi O, Kawai T, Hoshino K, Akira S. Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *J Immunol*. 2001 May 1;166(9):5688-94.
- (160) Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, Redfern CH, Ferrari AC, Dreicer R, Sims RB, Xu Y, Frohlich MW, Schellhammer PF; IMPACT Study Investigators. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med*. 2010 Jul 29;363(5):411-22.
- (161) Kantoff PW, Schuetz TJ, Blumenstein BA, Glode LM, Bilhartz DL, Wyand M, Manson K, Panicali DL, Laus R, Schlom J, Dahut WL, Arlen PM, Gulley JL, Godfrey WR. Overall survival analysis of a phase II randomized controlled trial of a Poxviral-based PSA-targeted immunotherapy in metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Mar 1;28(7):1099-105.
- (162) Karlsson KA. Animal glycosphingolipids as membrane attachment sites for bacteria. *Annu Rev Biochem*. 1989;58:309-50. Review.
- (163) Kato M, Neil TK, Fearnley DB, McLellan AD, Vuckovic S, Hart DN. Expression of multilectin receptors and comparative FITC-dextran uptake by human dendritic cells. *Int Immunol*. 2000 Nov;12(11):1511-9.
- (164) Kawasaki N, Rillahan CD, Cheng TY, Van Rhijn I, Macauley MS, Moody DB, Paulson JC. Targeted delivery of mycobacterial antigens to human dendritic cells via Siglec-7 induces robust T cell activation. *J Immunol*. 2014 Aug 15;193(4):1560-6.
- (165) Kenna TJ, Thomas R, Steptoe RJ. Steady-state dendritic cells expressing cognate antigen terminate memory CD8+ T-cell responses. *Blood*. 2008 Feb 15;111(4):2091-100.
- (166) Kikuchi T, Akasaki Y, Irie M, Homma S, Abe T, Ohno T. Results of a phase I clinical trial of vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2001 Sep;50(7):337-44.
- (167) Kishimoto H, Sprent J. Negative selection in the thymus includes semimature T cells. *J Exp Med*. 1997 Jan 20;185(2):263-71.

Literaturverzeichnis

- (168) Klechevsky E, Morita R, Liu M, Cao Y, Coquery S, Thompson-Snipes L, Briere F, Chaussabel D, Zurawski G, Palucka AK, Reiter Y, Banchereau J, Ueno H. Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells. *Immunity*. 2008 Sep 19;29(3):497-510.
- (169) Klechevsky E. Human dendritic cells - stars in the skin. *Eur J Immunol*. 2013 Dec;43(12):3147-55. Review.
- (170) Klenk E. Über die ganglioside, eine neue gruppe von zuckerhaltigen gehirnlipoiden. Hoppe-Seylers. *Z Physiol Chem*.1942. 273: 76-86.
- (171) Knapp S, Vocadlo D, Gao ZN, Kirk B, Lou JP, Withers SG. NAG-thiazoline, an *N*-acetyl-beta-hexosaminidase inhibitor that implicates acetamido participation. *J. Am. Chem. Soc*. 1996;118:6804–6805.
- (172) Kobayashi T, Yoshimura A. Keeping DCs awake by putting SOCS1 to sleep. *Trends Immunol*. 2005 Apr;26(4):177-9. Review.
- (173) Kolter & Sandhoff. Sphingolipide - ihre Stoffwechselwege und die Pathobiochemie neurodegenerativer Erkrankungen. *Angew. Chem*. 1999, 111, 1632 -1670
- (174) Kolter T, Sandhoff K. Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:81-103. Review.
- (175) Kolter T, Sandhoff K. Sphingolipid metabolism diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Dec;1758(12):2057-79. Review.
- (176) Kolter T, Sandhoff K. Lysosomal degradation of membrane lipids. *FEBS Lett*. 2010 May 3;584(9):1700-12. Review
- (177) Kuijff ML, Samsom JN, van Rijs W, Bax M, Huizinga R, Heikema AP, van Doorn PA, van Belkum A, van Kooyk Y, Burgers PC, Luider TM, Endtz HP, Nieuwenhuis EE, Jacobs BC. TLR4-mediated sensing of *Campylobacter jejuni* by dendritic cells is determined by sialylation. *J Immunol*. 2010 Jul 1;185(1):748-55.
- (178) Kukreja A, Hutchinson A, Dhodapkar K, Mazumder A, Vesole D, Angitapalli R, Jagannath S, Dhodapkar MV. Enhancement of clonogenicity of human multiple myeloma by dendritic cells. *J Exp Med*. 2006 Aug 7;203(8):1859-65.
- (179) Laderach D, Compagno D, Danos O, Vainchenker W, Galy A. RNA interference shows critical requirement for NF-kappa B p50 in the production of IL-12 by human dendritic cells. *J Immunol*. 2003 Aug 15;171(4):1750-7.
- (180) Ladisch S, Becker H, Ulsh L. Immunosuppression by human gangliosides: I. Relationship of carbohydrate structure to the inhibition of T cell responses. *Biochim Biophys Acta*. 1992 Apr 23;1125(2):180-8.
- (181) Ladisch S, Gillard B, Wong C, Ulsh L. Shedding and immunoregulatory activity of YAC-1 lymphoma cell gangliosides. *Cancer Res*. 1983 Aug;43(8):3808-13.
- (182) Ladisch S, Gillard B. Isolation and purification of gangliosides from plasma. *Methods Enzymol*. 1987;138:300-6
- (183) Ladisch S, Li R, Olson E. Ceramide structure predicts tumor ganglioside immunosuppressive activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Mar 1;91(5):1974-8.
- (184) Ladisch S, Ulsh L, Gillard B, Wong C. Modulation of the immune response by gangliosides. Inhibition of adherent monocyte accessory function in vitro. *J Clin Invest*. 1984 Dec;74(6):2074-81.
- (185) Ladisch S, Wu ZL, Feig S, Ulsh L, Schwartz E, Floutsis G, Wiley F, Lenarsky C, Seeger R. Shedding of GD2 ganglioside by human neuroblastoma. *Int J Cancer*. 1987 Jan 15;39(1):73-6.
- (186) Ladisch S. Tumor cell gangliosides. *Adv Pediatr*. 1987;34:45-58. Review.
- (187) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
- (188) Lafontaine M, Landry D, Montplaisir S. Human thymic dendritic cells *Microsc Res Tech*. 1997 Aug 1;38(3):267-75. Review.
- (189) Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Kinetics of dendritic-cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol*. 2000;1:311-316.
- (190) Le Naour F, Hohenkirk L, Grolleau A, Misek DE, Lescure P, Geiger JD, Hanash S, Beretta L. Profiling changes in gene expression during differentiation and maturation of monocyte-derived dendritic cells using both oligonucleotide microarrays and proteomics. *J Biol Chem*. 2001 May 25;276(21):17920-31.
- (191) Lechmann M, Krooshoop DJ, Dudziak D, Kremmer E, Kuhnt C, Figdor CG, Schuler G, Steinkasserer A. The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell-mediated T cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells. *J Exp Med*. 2001 Dec 17;194(12):1813-21.
- (192) Lechmann M, Zinser E, Golka A, Steinkasserer A. Role of CD83 in the immunomodulation of dendritic cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002 Oct;129(2):113-8. Review.
- (193) Ledeen RW, Wu G, André S, Bleich D, Huet G, Kaltner H, Kopitz J, Gabius HJ. Beyond glycoproteins as galectin counterreceptors: tumor-effector T cell growth control via ganglioside GM1. *Ann N Y Acad Sci*. 2012 Apr;1253:206-21. Review.
- (194) Ledeen RW. Biosynthesis, metabolism and biological effects of gangliosides. In: Margolis RU and Margolis RK (eds) *Neurobiology of glycoconjugates*. 1989. Plenum Press, New York, pp 43–83

Literaturverzeichnis

- (195) Lee HK, Iwasaki A. Innate control of adaptive immunity: dendritic cells and beyond. *Semin Immunol* 2007;19:48-55.
- (196) Lefrancois S, May T, Knight C, Bourbeau D, Morales CR. The lysosomal transport of prosaposin requires the conditional interaction of its highly conserved d domain with sphingomyelin. *J Biol Chem*. 2002 May 10;277(19):17188-99.
- (197) Lefrancois S, Zeng J, Hassan AJ, Canuel M, Morales CR. The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *EMBO J*. 2003 Dec 15;22(24):6430-7.
- (198) Legler DF, Krause P, Scandella E, Singer E, Groettrup M. Prostaglandin E2 is generally required for human dendritic cell migration and exerts its effect via EP2 and EP4 receptors. *J Immunol*. 2006 Jan 15;176(2):966-73.
- (199) Lehman DM, Fu DJ, Freeman AB, Hunt KJ, Leach RJ, Johnson-Pais T, Hamlington J, Dyer TD, Arya R, Abboud H, Göring HH, Duggirala R, Blangero J, Konrad RJ, Stern MP. A single nucleotide polymorphism in MGEA5 encoding O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D glucosaminidase is associated with type 2 diabetes in Mexican Americans. *Diabetes*. 2005 Apr;54(4):1214-21.
- (200) Leinekugel P, Michel S, Conzelmann E, Sandhoff K. Quantitative correlation between the residual activity of beta-hexosaminidase A and arylsulfatase A and the severity of the resulting lysosomal storage disease. *Hum Genet*. 1992 Mar;88(5):513-23.
- (201) Li CM, Park JH, He X, Levy B, Chen F, Arai K, Adler DA, Distechi CM, Koch J, Sandhoff K, Schuchman EH. The human acid ceramidase gene (ASAH): structure, chromosomal location, mutation analysis, and expression. *Genomics*. 1999 Dec 1;62(2):223-31.
- (202) Li D, Romain G, Flamar AL, Duluc D, Dullaers M, Li XH, Zurawski S, Bosquet N, Palucka AK, Le Grand R, O'Garra A, Zurawski G, Banchereau J, Oh S. Targeting self- and foreign antigens to dendritic cells via DC-ASGPR generates IL-10-producing suppressive CD4+ T cells. *J Exp Med*. 2012 Jan 16;209(1):109-21.
- (203) Li RX, Ladisch S. Shedding of human neuroblastoma gangliosides. *Biochim Biophys Acta*. 1991 Apr 24;1083(1):57-64.
- (204) Li SC, Hama Y, Li YT. Interaction of GM2 activator protein with glycosphingolipids. *Adv Exp Med Biol*. 2001;491:351-67. Review.
- (205) Li SC, Hirabayashi Y, Li YT. A protein activator for the enzymic hydrolysis of GM2 ganglioside. *J Biol Chem*. 1981 Jun 25;256(12):6234-40.
- (206) Li SC, Nakamura T, Ogamo A, Li YT. Evidence for the presence of two separate protein activators for the enzymic hydrolysis of GM1 and GM2 gangliosides. *J Biol Chem*. 1979 Nov 10;254(21):10592-5.
- (207) Li SC, Wu YY, Sugiyama E, Taki T, Kasama T, Casellato R, Sonnino S, Li YT. Specific recognition of N-acetylneuraminic acid in the GM2 epitope by human GM2 activator protein. *J Biol Chem*. 1995 Oct 13;270(41):24246-51.
- (208) Lin H, Liang S, Zhong Z, Wen J, Li W, Wang L, Xu J, Zhong F, Li X. Soluble CD83 inhibits human monocyte differentiation into dendritic cells in vitro. *Cell Immunol*. 2014 Sep 6;292(1-2):25-31.
- (209) Liu G, Ng H, Akasaki Y, Yuan X, Ehtesham M, Yin D, Black KL, Yu JS. Small interference RNA modulation of IL-10 in human monocyte-derived dendritic cells enhances the Th1 response. *Eur J Immunol*. 2004 Jun;34(6):1680-7.
- (210) Liu Y, Hoffmann A, Grinberg A, Westphal H, McDonald MP, Miller KM, Crawley JN, Sandhoff K, Suzuki K, Proia RL. Mouse model of GM2 activator deficiency manifests cerebellar pathology and motor impairment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jul 22;94(15):8138-43.
- (211) Liu YJ, Xu J, de Bouteiller O, Parham CL, Grouard G, Djossou O, de Saint-Vis B, Lebecque S, Banchereau J, Moore KW. Follicular dendritic cells specifically express the long CR2/CD21 isoform. *J Exp Med*. 1997 Jan 6;185(1):165-70.
- (212) Liu YJ. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell*. 2001 Aug 10;106(3):259-62. Review.
- (213) Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:275-306. Review.
- (214) Lobel P, Fujimoto K, Ye RD, Griffiths G, Kornfeld S. Mutations in the cytoplasmic domain of the 275 kd mannose 6-phosphate receptor differentially alter lysosomal enzyme sorting and endocytosis. *Cell*. 1989 Jun 2;57(5):787-96.
- (215) Lopez PH, Schnaar RL. Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation. *Curr Opin Struct Biol*. 2009 Oct;19(5):549-57. Review.
- (216) Love DC, Hanover JA. The hexosamine signaling pathway: deciphering the "O-GlcNAc code". *Sci STKE*. 2005 Nov 29;2005(312):re13. Review.
- (217) Lu HT, Yang DD, Wysk M, et al. Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3) deficient mice. *EMBO J*. 1999;18:1845-1857.

Literaturverzeichnis

- (219) Luckashenak N, Schroeder S, Endt K, Schmidt D, Mahnke K, Bachmann MF, Marconi P, Deeg CA, Brocker T. Constitutive crosspresentation of tissue antigens by dendritic cells controls CD8+ T cell tolerance in vivo. *Immunity*. 2008 Apr;28(4):521-32.
- (220) Lui K, Commens C, Choong R, Jaworski R. Collodion babies with Gaucher's disease. *Arch Dis Child*. 1988 Jul;63(7):854-6.
- (221) Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, Wsocka M, Trinchieri G, Murphy KM, O'Garra A. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol*. 1995 May 15;154(10):5071-9.
- (222) Macauley MS, Whitworth GE, Debowski AW, Chin D, Vocadlo DJ. O-GlcNAcase uses substrate-assisted catalysis: kinetic analysis and development of highly selective mechanism-inspired inhibitors. *J Biol Chem*. 2005 Jul 8;280(27):25313-22.
- (223) Mackensen A, Herbst B, Chen JL, Köhler G, Noppen C, Herr W, Spagnoli GC, Cerundolo V, Lindemann A. Phase I study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulsed dendritic cells generated in vitro from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *Int J Cancer*. 2000 May 1;86(3):385-92.
- (224) Mahuran DJ, Gravel RA. The beta-hexosaminidase story in Toronto: from enzyme structure to gene mutation. *Adv Genet*. 2001;44:145-63.
- (225) Mahuran DJ. Biochemical consequences of mutations causing the GM2 gangliosidoses. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Oct 8;1455(2-3):105-38. Review.
- (226) Mahuran DJ. The GM2 activator protein, its roles as a co-factor in GM2 hydrolysis and as a general glycolipid transport protein. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Jul 31;1393(1):1-18. Review.
- (227) Maldonado RA, von Andrian UH. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Advances in Immunology*. 2010;108:111-165
- (228) Maldonado-López R, De Smedt T, Michel P, Godfroid J, Pajak B, Heirman C, Thielemans K, Leo O, Urbain J, Moser M. CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med*. 1999 Feb 1;189(3):587-92.
- (229) Malinina L, Malakhova ML, Teplov A, Brown RE, Patel DJ. Structural basis for glycosphingolipid transfer specificity. *Nature*. 2004 Aug 26;430(7003):1048-53.
- (230) Mann J, Oakley F, Johnson PW, Mann DA. CD40 induces interleukin-6 gene transcription in dendritic cells: regulation by TRAF2, AP-1, NF-kappa B, AND CBF1. *J Biol Chem*. 2002 May 10;277(19):17125-38.
- (231) Märten A, Renoth S, Heinicke T, Albers P, Pauli A, Mey U, Caspari R, Flieger D, Hanfland P, Von Ruecker A, Eis-Hübinger AM, Müller S, Schwaner I, Lohmann U, Heylmann G, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf IG. Allogeneic dendritic cells fused with tumor cells: preclinical results and outcome of a clinical phase I/II trial in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Hum Gene Ther*. 2003 Mar 20;14(5):483-94.
- (232) Mathur RK, Awasthi A, Wadhone P, Ramanamurthy B, Saha B. Reciprocal CD40 signals through p38MAPK and ERK-1/2 induce counteracting immune responses. *Nat Med*. 2004;10:540-544.
- (233) Matsui T, Connolly JE, Michnevitz M, Chaussabel D, Yu CI, Glaser C, Tindle S, Pypaert M, Freitas H, Piqueras B, Banchereau J, Palucka AK. CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions. *J Immunol*. 2009 Jun 1;182(11):6815-23.
- (234) McLellan AD, Starling GC, Williams LA, Hock BD, Hart DN. Activation of human peripheral blood dendritic cells induces the CD86 co-stimulatory molecule. *Eur J Immunol*. 1995 Jul;25(7):2064-8.
- (235) Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, Janeway CA Jr. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell*. 1998 Aug;2(2):253-8.
- (236) Meier EM, Schwarzmann G, Fürst W, Sandhoff K. The human GM2 activator protein. A substrate specific cofactor of beta-hexosaminidase A. *J Biol Chem*. 1991 Jan 25;266(3):1879-87.
- (237) Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:563-604. Review.
- (238) Merritt WD, Bailey JM, Pluznik DH. Inhibition of interleukin-2-dependent cytotoxic T-lymphocyte growth by gangliosides. *Cell Immunol*. 1984 Nov;89(1):1-10.
- (239) Mignot G, Roux S, Thery C, Ségura E, Zitvogel L. Prospects for exosomes in immunotherapy of cancer. *J Cell Mol Med*. 2006 Apr-Jun;10(2):376-88. Review.
- (240) Mills KH. TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2011 Nov 18;11(12):807-22. Review.
- (241) Mohamadzadeh M, Berard F, Essert G, Chalouni C, Pulendran B, Davoust J, Bridges G, Palucka AK, Banchereau J. Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells. *J Exp Med*. 2001 Oct 1;194(7):1013-20.
- (242) Moore KW, de Waal MR, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:683-765

Literaturverzeichnis

- (243) Moreau A, Varey E, Bouchet-Delbos L, Cuturi MC. Cell therapy using tolerogenic dendritic cells in transplantation. *Transplant Res.* 2012 Sep 28;1(1):13.
- (244) Mutoh T, Tokuda A, Miyadai T, Hamaguchi M, Fujiki N. Ganglioside GM1 binds to the Trk protein and regulates receptor function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 May 23;92(11):5087-91.
- (245) Muzio M, Natoli G, Saccani S, Levrero M, Mantovani A. The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J Exp Med.* 1998 Jun 15;187(12):2097-101.
- (246) Nagafuku M, Okuyama K, Onimaru Y, Suzuki A, Odagiri Y, Yamashita T, Iwasaki K, Fujiwara M, Takayanagi M, Ohno I, Inokuchi J. CD4 and CD8 T cells require different membrane gangliosides for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Feb 7;109(6):E336-42.
- (247) Nagarajan S, Chen HC, Li SC, Li YT, Lockyer JM. Evidence for two cDNA clones encoding human GM2-activator protein. *Biochem J.* 1992 Mar 15;282 (Pt 3):807-13.
- (248) Nagorsen D, Marincola FM, Panelli MC. Cytokine and chemokine expression profiles of maturing dendritic cells using multiprotein platform arrays. *Cytokine.* 2004 Jan 7;25(1):31-5.
- (249) Nakahara T, Moroi Y, Uchi H, Furue M. Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement. *J Dermatol Sci.* 2006 Apr;42(1):1-11. Review.
- (250) Nakahara T, Uchi H, Urabe K, Chen Q, Furue M, Moroi Y. Role of c-Jun N-terminal kinase on lipopolysaccharide induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Int Immunol.* 2004 Dec;16(12):1701-9.
- (251) Nakamura S, Akisue T, Jinnai H, Hitomi T, Sarkar S, Miwa N, Okada T, Yoshida K, Kuroda S, Kikkawa U, Nishizuka Y. Requirement of GM2 ganglioside activator for phospholipase D activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Oct 13;95(21):12249-53.
- (252) Napolitani G, Bortoletto N, Racioppi L, Lanzavecchia A, D'Oro U. Activation of src-family tyrosine kinases by LPS regulates cytokine production in dendritic cells by controlling AP-1 formation. *Eur J Immunol.* 2003 Oct;33(10):2832-41.
- (253) Nayak JV, Hokey DA, Larregina A, He Y, Salter RD, Watkins SC, Falo LD Jr. Phagocytosis Induces Lysosome Remodeling and Regulated Presentation of Particulate Antigens by Activated Dendritic Cells. *J Immunol.* 2006 Dec 15;177(12):8493-503.
- (254) Nemazee D. Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nat Rev Immunol.* 2006 Oct;6(10):728-40. Review.
- (255) Nencioni A, Brossart P. New perspectives in dendritic cell-based cancer immunotherapy. *BioDrugs.* 2001;15(10):667-79. Review.
- (256) Nestle FO, Burg G, Fah J, Wrone-Smith T, Nickoloff BJ. Human sunlight-induced basal-cell carcinoma-associated dendritic cells are deficient in T cell co-stimulatory molecules and are impaired as antigen-presenting cells. *Am J Pathol.* 1997;150:641-651.
- (257) Neumann M, Fries H, Scheicher C, Keikavoussi P, Kolb-Mäurer A, Bröcker E, Serfling E, Kämpgen E. Differential expression of Rel/NF-kappaB and octamer factors is a hallmark of the generation and maturation of dendritic cells. *Blood.* 2000 Jan 1;95(1):277-85.
- (258) Nguyen-Pham TN, Lee YK, Lee HJ, Kim MH, Yang DH, Kim HJ, Lee JJ. Cellular immunotherapy using dendritic cells against multiple myeloma. *Korean J Hematol.* 2012 Mar;47(1):17-27.
- (259) Nielsen MS, Madsen P, Christensen EI, Nykjaer A, Gliemann J, Kasper D, Pohlmann R, Petersen CM. The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *EMBO J.* 2001 May 1;20(9):2180-90.
- (260) Nikolic T, Roep BO. Regulatory multitasking of tolerogenic dendritic cells - lessons taken from vitamin d3-treated tolerogenic dendritic cells. *Front Immunol.* 2013 May 14;4:113.
- (261) Nojiri H, Kitagawa S, Nakamura M, Kirito K, Enomoto Y, Saito M. Neolacto-series gangliosides induce granulocytic differentiation of human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *J Biol Chem.* 1988 Jun 5;263(16):7443-6.
- (262) Nojiri H, Takaku F, Terui Y, Miura Y, Saito M. Ganglioside GM3: an acidic membrane component that increases during macrophage-like cell differentiation can induce monocytic differentiation of human myeloid and monocytoid leukemic cell lines HL-60 and U937. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Feb;83(3):782-6.
- (263) Novak A, Lowden JA. GM2 ganglioside activator occurs in multiple forms. *Biochim Biophys Acta.* 1994 Mar 2;1199(2):209-14.
- (264) O'Neill LA. When signaling pathways collide: positive and negative regulation of toll-like receptor signal transduction. *Immunity.* 2008 Jul 18;29(1):12-20. Review.
- (265) Offner H, Thieme T, Vandenbark AA. Gangliosides induce selective modulation of CD4 from helper T lymphocytes. *J Immunol.* 1987 Nov 15;139(10):3295-305.

Literaturverzeichnis

- (266) Okutani D, Lodyga M, Han B, Liu M. Src protein tyrosine kinase family and acute inflammatory responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006 Aug;291(2):L129-41. Epub 2006 Mar 31. Review
- (267) Paczesny S, Banchereau J, Wittkowski KM, Saracino G, Fay J, Palucka AK. Expansion of melanoma-specific cytolytic CD8+ T cell precursors in patients with metastatic melanoma vaccinated with CD34+ progenitor-derived dendritic cells. *J Exp Med*. 2004 Jun 7;199(11):1503-11.
- (268) Pålsson-McDermott EM, O'Neill LA. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology*. 2004 Oct;113(2):153-62. Review.
- (269) Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer*. 2012 Mar 22;12(4):265-77. Review.
- (270) Palucka K, Banchereau J. Human dendritic cell subsets in vaccination. *Curr Opin Immunol*. 2013 Jun;25(3):396-402. Review.
- (271) Park SY, Ryu J, Lee W. O-GlcNAc modification on IRS-1 and Akt2 by PUGNAc inhibits their phosphorylation and induces insulin resistance in rat primary adipocytes. *Exp Mol Med*. 2005 Jun 30;37(3):220-9.
- (272) Parmiani G, De Filippo A, Novellino L, Castelli C. Unique human tumor antigens: immunobiology and use in clinical trials. *J Immunol*. 2007; 178:1975-1979.
- (273) Péguet-Navarro J, Sportouch M, Popa I, Berthier O, Schmitt D, Portoukalian J. Gangliosides from human melanoma tumors impair dendritic cell differentiation from monocytes and induce their apoptosis. *J Immunol*. 2003 Apr 1;170(7):3488-94.
- (274) Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:929-79. Review.
- (275) Petrie HT, Livak F, Burtrum D, Mazel S. T cell receptor gene recombination patterns and mechanisms: cell death, rescue, and T cell production. *J Exp Med*. 1995 Jul 1;182(1):121-7.
- (276) Piccioli D, Tavarini S, Borgogni E, Steri V, Nuti S, Sammiceli C, Bardelli M, Montagna D, Locatelli F, Wack A. Functional specialization of human circulating CD16 and CD1c myeloid dendritic-cell subsets. *Blood*. 2007 Jun 15;109(12):5371-9.
- (277) Pinzon-Charry A, Ho CS, Laherty R, Maxwell T, Walker D, Gardiner RA, O'Connor L, Pyke C, Schmidt C, Furnival C, Lopez JA. A population of HLA-DR+ immature cells accumulates in the blood dendritic cell compartment of patients with different types of cancer. *Neoplasia* 2005;7:1112- 1122.
- (278) Pizzo P, Viola A. Lymphocyte lipid rafts: structure and function. *Curr Opin Immunol*. 2003 Jun;15(3):255-60. Review.
- (279) Pletinckx K, Döhler A, Pavlovic V, Lutz MB. Role of dendritic cell maturity/costimulation for generation, homeostasis, and suppressive activity of regulatory T cells. *Front Immunol*. 2011 Sep 27;2:39
- (280) Potapenko M, Shurin GV, de León J. Gangliosides as immunomodulators. *Adv Exp Med Biol*. 2007;601:195-203. Review.
- (281) Prazma CM, Yazawa N, Fujimoto Y, Fujimoto M, Tedder TF. CD83 expression is a sensitive marker of activation required for B cell and CD4+ T cell longevity in vivo. *J Immunol*. 2007 Oct 1;179(7):4550-62.
- (282) Probst HC, Lagnel J, Kollias G, van den Broek M. Inducible transgenic mice reveal resting dendritic cells as potent inducers of CD8+ T cell tolerance. *Immunity*. 2003 May;18(5):713-20.
- (283) Proietto AI, van Dommelen S, Zhou P, Rizzitelli A, D'Amico A, Steptoe RJ, Naik SH, Lahoud MH, Liu Y, Zheng P, Shortman K, Wu L. Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 16;105(50):19869-74.
- (284) Puig-Kröger A, Relloso M, Fernández-Capetillo O, Zubiaga A, Silva A, Bernabéu C, Corbí AL. Extracellular signal-regulated protein kinase signaling pathway negatively regulates the phenotypic and functional maturation of monocyte-derived human dendritic cells. *Blood*. 2001 Oct 1;98(7):2175-82.
- (285) Pulendran B, Smith JL, Caspary G, Brasel K, Pettit D, Maraskovsky E, Maliszewski CR. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Feb 2;96(3):1036-41.
- (286) Pulendran B, Tang H, Manicassamy S. Programming dendritic cells to induce T(H)2 and tolerogenic responses. *Nat Immunol*. 2010 Aug;11(8):647-55. Review.
- (287) Puryear WB, Gummuluru S. Role of glycosphingolipids in dendritic cell-mediated HIV-1 trans-infection. *Adv Exp Med Biol*. 2013;762:131-53. Review.
- (288) Pyo H, Joe E, Jung S, Lee SH, Jou I. Gangliosides activate cultured rat brain microglia. *J Biol Chem*. 1999 Dec 3;274(49):34584-9.
- (289) Qian C, Jiang X, An H, Yu Y, Guo Z, Liu S, Xu H, Cao X. TLR agonists promote ERK-mediated preferential IL-10 production of regulatory dendritic cells (diffDCs), leading to NK-cell activation. *Blood*. 2006 Oct 1;108(7):2307-15. Epub 2006 Jun 15.

Literaturverzeichnis

- (290) Raas-Rothschild A, Pankova-Kholmyansky I, Kacher Y, Futerman AH. Glycosphingolipidoses: beyond the enzymatic defect. *Glycoconj J*. 2004;21(6):295-304. Review.
- (291) Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:267-96. Review.
- (292) Radford KJ, Tullett KM, Lahoud MH. Dendritic cells and cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2014 Feb 7;27C:26-32. Review.
- (293) Rajendran L, Simons K. Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci*. 2005 Mar 15;118(Pt 6):1099-102. Review.
- (294) Rao FV, Dorfmüller HC, Villa F, Allwood M, Eggleston IM, van Aalten DM. Structural insights into the mechanism and inhibition of eukaryotic O-GlcNAc hydrolysis. *EMBO J*. 2006 Apr 5;25(7):1569-78.
- (295) Rapola J. Lysosomal storage diseases in adults. *Pathol Res Pract*. 1994 Sep;190(8):759-66. Review.
- (296) Reitman ML, Varki A, Kornfeld S. Fibroblasts from patients with I-cell disease and pseudo-Hurler polydystrophy are deficient in uridine 5'-diphosphate-N-acetylglucosamine: glycoprotein N-acetylglucosaminylphosphotransferase activity. *J Clin Invest*. 1981 May;67(5):1574-9.
- (297) Rescigno M, Martino M, Sutherland CL, Gold MR, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J Exp Med*. 1998 Dec 7;188(11):2175-80.
- (298) Riboni L, Caminiti A, Bassi R, Tettamanti G. The degradative pathway of gangliosides GM1 and GM2 in Neuro2a cells by sialidase. *J Neurochem*. 1995 Jan;64(1):451-4.
- (299) Rigat B, Reynaud D, Smiljanic-Georgijev N, Mahuran D. The GM2 activator protein, a novel inhibitor of platelet-activating factor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 May 10;258(2):256-9.
- (300) Rigat B, Wang W, Leung A, Mahuran DJ. Two mechanisms for the recapture of extracellular GM2 activator protein: evidence for a major secretory form of the protein. *Biochemistry*. 1997 Jul 8;36(27):8325-31.
- (301) Rijnboutt S, Aerts HM, Geuze HJ, Tager JM, Strous GJ. Mannose 6-phosphate-independent membrane association of cathepsin D, glucocerebrosidase, and sphingolipid-activating protein in HepG2 cells. *J Biol Chem*. 1991 Mar 15;266(8):4862-8.
- (302) Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, Liu YJ. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science*. 1999 Feb 19;283(5405):1183-6.
- (303) Ritter G, Livingston PO. Ganglioside antigens expressed by human cancer cells. *Semin Cancer Biol*. 1991 Dec;2(6):401-9. Review.
- (304) Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*. 2007 May 14;26(22):3291-310. Review.
- (305) Romani N, Gruner S, Brang D, Kämpgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med*. 1994 Jul 1;180(1):83-93.
- (306) Roquemore EP, Chevrier MR, Cotter RJ, Hart GW. Dynamic O-GlcNAcylation of the small heat shock protein alpha B-crystallin. *Biochemistry*. 1996 Mar 19;35(11):3578-86.
- (307) Sabado RL, Bhardwaj N. Directing dendritic cell immunotherapy towards successful cancer treatment. *Immunotherapy*. 2010 Jan;2(1):37-56. Review.
- (308) Sadeghlar F, Rimmel N, Breiden B, Klingenstein R, Schwarzmann G, Sandhoff K. Physiological relevance of sphingolipid activator proteins in cultured human fibroblasts. *Biochimie*. 2003 Mar-Apr;85(3-4):439-48.
- (309) Saftig P, Klumperman J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 Sep;10(9):623-35. Review.
- (310) Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*. 1994 Apr 1;179(4):1109-18.
- (311) Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Scharniel C, Lenig D, Mackay CR, Qin S, Lanzavecchia A. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol*. 1998 Sep;28(9):2760-9.
- (312) Salvador A, Igartua M, Pedraz JL, Hernández RM; Dendritic Cells Interactions with the Immune System – Implications for Vaccine Development; Cell Interaction, Dr. Sivakumar Gowder (Ed.), InTech, Oct 2012, Chapter3; ISBN 978-953-51-0792-7
- (313) Sandhoff K, Conzelmann E. The biochemical basis of gangliosidoses. *Neuropediatrics*. 1984 Sep;15 Suppl:85-92
- (314) Sandhoff K, Harzer K. Gangliosides and gangliosidoses: principles of molecular and metabolic pathogenesis. *J Neurosci*. 2013 Jun 19;33(25):10195-208. Review.
- (315) Sango K, Yamanaka S, Hoffmann A, Okuda Y, Grinberg A, Westphal H, McDonald MP, Crawley JN, Sandhoff K, Suzuki K, Proia RL. Mouse models of Tay-Sachs and Sandhoff diseases differ in neurologic phenotype and ganglioside metabolism. *Nat Genet*. 1995 Oct;11(2):170-6.

Literaturverzeichnis

- (316) Santinha DR, Marques DR, Maciel EA, Simões CS, Rosa S, Neves BM, Macedo B, Domingues P, Cruz MT, Domingues MR. Profiling changes triggered during maturation of dendritic cells: a lipidomic approach. *Anal Bioanal Chem.* 2012 Apr;403(2):457-71.
- (317) Santra S, Barouch DH, Jackson SS, Kuroda MJ, Schmitz JE, Lifton MA, Sharpe AH, Letvin NL. Functional equivalency of B7-1 and B7-2 for costimulating plasmid DNA vaccine-elicited CTL responses. *J Immunol.* 2000 Dec 15;165(12):6791-5.
- (318) Santra S, Barouch DH, Sharpe AH, Letvin NL. B7 co-stimulatory requirements differ for induction of immune responses by DNA, protein and recombinant pox virus vaccination. *Eur J Immunol.* 2000 Sep;30(9):2650-9.
- (319) Sasaki I, Kaisho T. Transcriptional control of dendritic cell differentiation. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2014;381:257-78.
- (320) Sato K, Nagayama H, Tadokoro K, Juji T, Takahashi TA. Extracellular signal-regulated kinase, stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase, and p38mapk are involved in IL-10-mediated selective repression of TNF-alpha-induced activation and maturation of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 1999 Apr 1;162(7):3865-72.
- (321) Scandella E, Men Y, Legler DF, Gillessen S, Prikler L, Ludewig B, Groettrup M. CCL19/CCL21-triggered signal transduction and migration of dendritic cells requires prostaglandin E2. *Blood.* 2004 Mar 1;103(5):1595-601.
- (322) Scandroglio F, Loberto N, Valsecchi M, Chigorno V, Prinetti A, Sonnino S. Thin layer chromatography of gangliosides. *Glycoconj J.* 2009 Nov;26(8):961-73.
- (323) Schadendorf D, Ugurel S, Schuler-Thurner B, Nestle FO, Enk A, Bröcker EB, Grabbe S, Rittgen W, Edler L, Sucker A, Zimpfer-Rechner C, Berger T, Kamarashev J, Burg G, Jonuleit H, Tüttenberg A, Becker JC, Keikavoussi P, Kämpgen E, Schuler G; DC study group of the DeCOG. Dacarbazine (DTIC) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized phase III trial of the DC study group of the DeCOG. *Ann Oncol.* 2006 Apr;17(4):563-70.
- (324) Schepers U, Lemm T, Herzog V, Sandhoff K. Characterization of regulatory elements in the 5'-flanking region of the GM2 activator gene. *Biol Chem.* 2000 Jul;381(7):531-44.
- (325) Schmidt SV, Nino-Castro AC, Schultze JL. Regulatory dendritic cells: there is more than just immune activation. *Front Immunol.* 2012 Sep 4;3:274.
- (326) Schröder M, Klima H, Nakano T, Kwon H, Quintern LE, Gärtner S, Suzuki K, Sandhoff K. Isolation of a cDNA encoding the human GM2 activator protein. *FEBS Lett.* 1989 Jul 17;251(1-2):197-200.
- (327) Schröder M, Schnabel D, Suzuki K, Sandhoff K. A mutation in the gene of a glycolipid-binding protein (GM2 activator) that causes GM2-gangliosidosis variant AB. *FEBS Lett.* 1991 Sep 23;290(1-2):1-3.
- (328) Schuster SJ, Neelapu SS, Gause BL, Janik JE, Muggia FM, Gockerman JP, Winter JN, Flowers CR, Nikcevich DA, Sotomayor EM, McGaughey DS, Jaffe ES, Chong EA, Reynolds CW, Berry DA, Santos CF, Popa MA, McCord AM, Kwak LW. Vaccination with patient-specific tumor-derived antigen in first remission improves disease-free survival in follicular lymphoma. *J Clin Oncol.* 2011 Jul 10;29(20):2787-94.
- (329) Schütte CG, Lemm T, Glombitza GJ, Sandhoff K. Complete localization of disulfide bonds in GM2 activator protein. *Protein Sci.* 1998 Apr;7(4):1039-45.
- (330) Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature.* 2011 May 19;473(7347):337-42.
- (331) Schwartzentruber DJ, et al. A phase III multi-institutional randomized study of immunization with the gp100:209–217 (210M) peptide followed by high-dose IL-2 compared with high-dose IL-2 alone in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol Abstr.* 2009; 27:CRA9011.
- (332) Schwarz A, Futerman AH. The localization of gangliosides in neurons of the central nervous system: the use of anti-ganglioside antibodies. *Biochim Biophys Acta.* 1996 Oct 29;1286(3):247-67. Review.
- (333) Schwarzmann G, Wendeler M, Sandhoff K. Synthesis of novel NBD-GM1 and NBD-GM2 for the transfer activity of GM2-activator protein by a FRET-based assay system. *Glycobiology.* 2005 Dec;15(12):1302-11.
- (334) Sénéchal B, Boruchov AM, Reagan JL, Hart DN, Young JW. Infection of mature monocyte-derived dendritic cells with human cytomegalovirus inhibits stimulation of T-cell proliferation via the release of soluble CD83. *Blood.* 2004 Jun 1;103(11):4207-15.
- (335) Senn HJ, Orth M, Fitzke E, Wieland H, Gerok W. Gangliosides in normal human serum. Concentration, pattern and transport by lipoproteins. *Eur J Biochem.* 1989 May 15;181(3):657-62.
- (336) Seydoux E, Rothen-Rutishauser B, Nita IM, Balog S, Gazdhar A, Stumbles PA, Petri-Fink A, Blank F, von Garnier C. Size-dependent accumulation of particles in lysosomes modulates dendritic cell function through impaired antigen degradation. *Int J Nanomedicine.* 2014 Aug 13;9:3885-902.
- (337) Shakhar G, Lindquist RL, Skokos D, Dudziak D, Huang JH, Nussenzweig MC, Dustin ML. Stable T cell–dendritic cell interactions precede the development of both tolerance and immunity in vivo. *Nat Immunol.* 2005 Jul;6(7):707-14.

Literaturverzeichnis

- (338) Shen L, Evel-Kabler K, Strube R, Chen SY. Silencing of SOCS1 enhances antigen presentation by dendritic cells and antigen-specific anti-tumor immunity. *Nat Biotechnol.* 2004 Dec;22(12):1546-53.
- (339) Shen W, Ladisch S. Ganglioside GD1a impedes lipopolysaccharide-induced maturation of human dendritic cells. *Cell Immunol.* 2002 Dec;220(2):125-33.
- (340) Shen W, Stone K, Jales A, Leitenberg D, Ladisch S. Inhibition of TLR activation and up-regulation of IL-1R-associated kinase-M expression by exogenous gangliosides. *J Immunol.* 2008 Apr 1;180(7):4425-32.
- (341) Shen YH, Godlewski J, Zhu J, Sathyanarayana P, Leaner V, Birrer MJ, Rana A, Tzivion G. Cross-talk between JNK/SAPK and ERK/MAPK pathways: sustained activation of JNK blocks ERK activation by mitogenic factors. *J Biol Chem.* 2003 Jul 18;278(29):26715-21.
- (342) Shimada Y, Li YT, Li SC. Effect of GM2 activator protein on the enzymatic hydrolysis of phospholipids and sphingomyelin. *J Lipid Res.* 2003 Feb;44(2):342-8.
- (343) Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol.* 2007 Jan;7(1):19-30. Review.
- (344) Shurin GV, Shurin MR, Bykovskaia S, Shogan J, Lotze MT, Barksdale EM Jr. Neuroblastoma-derived gangliosides inhibit dendritic cell generation and function. *Cancer Res.* 2001 Jan 1;61(1):363-9.
- (345) Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science.* 1999 Jun 11;284(5421):1835-7.
- (346) Simmons DL, Tan S, Tenen DG, Nicholson-Weller A, Seed B. Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein. *Blood* 1989; 73:284-9.
- (347) Small EJ, Fratesi P, Reese DM, Strang G, Laus R, Peshwa MV, Valone FH. Immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer with antigen-loaded dendritic cells. *J Clin Oncol.* 2000 Dec 1;18(23):3894-903.
- (348) Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985 Oct;150(1):76-85.
- (349) Soares H, Waechter H, Glaichenhaus N, Mougneau E, Yagita H, Mizenina O, Dudziak D, Nussenzweig MC, Steinman RM. A subset of dendritic cells induces CD4+ T cells to produce IFN-gamma by an IL-12-independent but CD70-dependent mechanism in vivo. *J Exp Med.* 2007 May 14;204(5):1095-106.
- (350) Somova OG, Tekieva EA, Diatlovitskaia EV, Bassalyk LS, Bergel'son LD. Ganglioside (GD3) in serum of cancer patients. *Vopr Med Khim.* 1991 Mar-Apr;37(2):21-3.
- (351) Sonderfeld S, Conzelmann E, Schwarzmann G, Burg J, Hinrichs U, Sandhoff K. Incorporation and metabolism of ganglioside GM2 in skin fibroblasts from normal and GM2 gangliosidosis subjects. *Eur J Biochem.* 1985 Jun 3;149(2):247-55.
- (352) Sonnino S, Chigorno V, Valsecchi M, Bassi R, Acquotti D, Cantu L, Corti M, Tettamanti G. Relationship between the regulation of membrane enzyme activities by gangliosides and a possible ganglioside segregation in membrane microdomains. *Indian J Biochem Biophys.* 1990 Dec;27(6):353-8. Review.
- (353) Sonnino S, Mauri L, Chigorno V, Prinetti A. Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology.* 2007 Jan;17(1):1R-13R. Review.
- (354) Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G, Kataura M, Imai T, Yoshie O, Bonocchi R, Mantovani A. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol.* 1998 Aug 1;161(3):1083-6.
- (355) Spisek R, Charalambous A, Mazumder A, Vesole DH, Jagannath S, Dhodapkar MV. Bortezomib enhances dendritic cell (DC)-mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells: therapeutic implications. *Blood.* 2007 Jun 1;109(11):4839-45.
- (356) Sprague L, Muccioli M, Pate M, Meles E, McGinty J, Nandigam H, Venkatesh AK, Gu MY, Mansfield K, Rutowski A, Omosebi O, Courreges MC, Benencia F. The interplay between surfaces and soluble factors define the immunologic and angiogenic properties of myeloid dendritic cells. *BMC Immunol.* 2011 Jun 6;12:35.
- (357) Stamatou NM, Carubelli I, van de Vlekkert D, Bonten EJ, Papini N, Feng C, Venerando B, d'Azzo A, Cross AS, Wang LX, Gornatowski PJ. LPS-induced cytokine production in human dendritic cells is regulated by sialidase activity. *J Leukoc Biol.* 2010 Dec;88(6):1227-39.
- (358) Stefanová I, Corcoran ML, Horak EM, Wahl LM, Bolen JB, Horak ID. Lipopolysaccharide induces activation of CD14-associated protein tyrosine kinase p53/56lyn. *J Biol Chem.* 1993 Oct 5;268(28):20725-8.
- (359) Steinbrink K, Wolf M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol.* 1997; 159:4772-4780.
- (360) Steinman RM, Adams JC, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. *J Exp Med.* 1975 Apr 1;141(4):804-20.
- (361) Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med.* 1973 May 1;137(5):1142-62.

Literaturverzeichnis

- (362) Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J Exp Med.* 1974 Feb 1;139(2):380-97.
- (363) Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:685-711.
- (364) Steinman RM, Kaplan G, Witmer MD, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *J Exp Med.* 1979 Jan 1;149(1):1-16.
- (365) Steinman RM, Lustig DS, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. III. Functional properties in vivo. *J Exp Med.* 1974 Jun 1;139(6):1431-45.
- (366) Steinman RM. The control of immunity and tolerance by dendritic cell. *Pathol Biol (Paris).* 2003 Mar;51(2):59-60. Review.
- (367) Steptoe RJ, Ritchie JM, Wilson NS, Villadangos JA, Lew AM, Harrison LC. Cognate CD4+ help elicited by resting dendritic cells does not impair the induction of peripheral tolerance in CD8+ T cells. *J Immunol* 2007;178: 2094–2103.
- (368) Stockinger B, Veldhoen M, Martin B. Th17 T cells: linking innate and adaptive immunity. *Semin Immunol.* 2007 Dec;19(6):353-61.
- (369) Stubbs KA, Macauley MS, Vocadlo DJ. A selective inhibitor Gal-PUGNAc of human lysosomal beta-hexosaminidases modulates levels of the ganglioside GM2 in neuroblastoma cells. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2009;48(7):1300-3.
- (370) Summers deLuca L, Gommerman JL. Fine-tuning of dendritic cell biology by the TNF superfamily *Nat Rev Immunol.* 2012 Apr 10;12(5):339-51. Review.
- (371) Sun H, Charles CH, Lau LF, Tonks NK. MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell.* 1993 Nov 5;75(3):487-93.
- (372) Süss G, Shortman K. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *Journal of Experimental Medicine.* 1996;183(4):1789–1796
- (373) Suzuki N, Suzuki S, Duncan GS, Millar DG, Wada T, Mirtsos C, Takada H, Wakeham A, Itie A, Li S, Penninger JM, Wesche H, Ohashi PS, Mak TW, Yeh WC. Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature.* 2002 Apr 18;416(6882):750-6.
- (374) Sweeley CC, Siddiqui B, Horowitz MI, Pigman W. (Eds.), *The Glycoconjugates*, 1 (1977), pp. 459–540
- (375) Tai T, Paulson JC, Cahan LD, Irie RF. Ganglioside GM2 as a human tumor antigen (OFA-I-1). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 Sep;80(17):5392-6.
- (376) Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:335-76.
- (377) Takeshita S, Toda M, Yamagishi H. Excision products of the T cell receptor gene support a progressive rearrangement model of the alpha/delta locus. *EMBO J.* 1989 Nov;8(11):3261-70.
- (378) Tanaka N, Kawakami T, Taniguchi T. Recognition DNA sequences of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2, regulators of cell growth and the interferon system. *Mol Cell Biol.* 1993 Aug;13(8):4531-8.
- (379) Taniguchi T, Lamphier MS, Tanaka N. IRF-1: the transcription factor linking the interferon response and oncogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 1997 Aug 8;1333(1):M9-17. Review.
- (380) Tews I, Perrakis A, Oppenheim A, Dauter Z, Wilson KS, Vorgias CE. Bacterial chitinase structure provides insight into catalytic mechanism and the basis of Tay-Sachs disease. *Nat Struct Biol.* 1996 Jul;3(7):638-48.
- (381) Tiribuzi R, D'Angelo F, Berardi AC, Martino S, Orlicchio A. Knock-down of HEXA and HEXB genes correlate with the absence of the immunostimulatory function of HSC-derived dendritic cells. *Cell Biochem Funct.* 2011 Oct 13.
- (382) Tobias PS, Soldau K, Gegner JA, Mintz D, Ulevitch RJ. Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14. *J Biol Chem* 1995; 270:10482–8.
- (383) Torres CR, Hart GW. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J Biol Chem.* 1984 Mar 10;259(5):3308-17.
- (384) Trakatelli M, Toungouz M, Blocklet D, Dodoo Y, Gordower L, Laporte M, Vereecken P, Sales F, Mortier L, Mazouz N, Lambermont M, Goldman S, Coulie P, Goldman M, Velu T. A new dendritic cell vaccine generated with interleukin-3 and interferon-beta induces CD8+ T cell responses against NA17-A2 tumor peptide in melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2006 Apr;55(4):469-74.
- (385) Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:133-146.
- (386) Trombetta ES, Ebersold M, Garrett W, Pypaert M, Mellman I. Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science.* 2003 Feb 28;299(5611):1400-3.
- (387) Troy AJ, Summers KL, Davidson PJ, Atkinson CH, Hart DN. Minimal recruitment and activation of dendritic cells within renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 1998;4:585–593
- (388) Tsuji D, Higashine Y, Matsuoka K, Sakuraba H, Itoh K. Therapeutic evaluation of GM2 gangliosidosis by ELISA using anti-GM2 ganglioside antibodies. *Clin Chim Acta.* 2007 Mar;378(1-2):38-41.

Literaturverzeichnis

- (389) Uchi H, Koga T, Urabe K, Moroi Y, Furue M. CX-659S, a diaminouracil derivative, indirectly inhibits the function of Langerhans cells by blocking the MEK1/2-Erk1/2 pathway in keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2003 Jun;120(6):983-9.
- (390) Ueno H, Schmitt N, Klechevsky E, Pedroza-Gonzalez A, Matsui T, Zurawski G, Oh S, Fay J, Pascual V, Banchereau J, Palucka K. Harnessing human dendritic cell subsets for medicine. *Immunol Rev.* 2010 Mar;234(1):199-212. Review.
- (391) Valladeau J, Saeland S. Cutaneous dendritic cells. *Semin Immunol.* 2005 Aug;17(4):273-83. Review.
- (392) van der Bijl P, Lopes-Cardozo M, van Meer G. Sorting of newly synthesized galactosphingolipids to the two surface domains of epithelial cells. *J Cell Biol.* 1996 Mar;132(5):813-21.
- (393) Vandenabeele S, Hochrein H, Mavaddat N, Winkel K, Shortman K. Human thymus contains 2 distinct dendritic cell populations. *Blood.* 2001 Mar 15;97(6):1733-41.
- (394) Vasilevko V, Ghochikyan A, Holterman MJ, Agadjanyan MG. CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) are functionally equivalent in the initiation and maintenance of CD4+ T-cell proliferation after activation with suboptimal doses of PHA. *DNA Cell Biol.* 2002 Mar;21(3):137-49.
- (395) Vermorken JB, Claessen AM, van Tinteren H, Gall HE, Ezinga R, Meijer S, Scheper RJ, Meijer CJ, Bloemena E, Ransom JH, Hanna MG Jr, Pinedo HM. Active specific immunotherapy for stage II and stage III human colon cancer: a randomised trial. *Lancet.* 1999 Jan 30;353(9150):345-50.
- (396) Vicari AP, Figueroa DJ, Hedrick JA, Foster JS, Singh KP, Menon S, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Bacon KB, Zlotnik A. TECK: a novel CC chemokine specifically expressed by thymic dendritic cells and potentially involved in T cell development. *Immunity.* 1997 Aug;7(2):291-301.
- (397) Vidalain PO, Azocar O, Servet-Delprat C, Rabourdin-Combe C, Gerlier D, Manié S. CD40 signaling in human dendritic cells is initiated within membrane rafts. *EMBO J.* 2000 Jul 3;19(13):3304-13.
- (398) Waithman J, Allan RS, Kosaka H, Azukizawa H, Shortman K, Lutz MB, et al. Skin-derived dendritic cells can mediate deletional tolerance of class I-restricted self-reactive T cells. *J Immunol* (2007) 179:4535-41
- (399) Wakkach A, Fournier N, Brun V, Breittmayer JP, Cottrez F, Groux H. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity.* 2003 May;18(5):605-17.
- (400) Walkley SU, Zervas M, Wiseman S. Gangliosides as modulators of dendritogenesis in normal and storage disease-affected pyramidal neurons. *Cereb Cortex.* 2000 Oct;10(10):1028-37.
- (401) Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature.* 2001 Jul 19;412(6844):346-51.
- (402) Wei-guo Z, Hui Y, Shan L, Yun Z, Wen-cheng N, Fu-lin Y, Fang-yan F, Jun-hua G, Jian-hua Z. PPAR-gamma agonist inhibits Ang II-induced activation of dendritic cells via the MAPK and NF-kappaB pathways. *Immunol Cell Biol.* 2010 Mar-Apr;88(3):305-12.
- (403) Wells L, Gao Y, Mahoney JA, Vosseller K, Chen C, Rosen A, Hart GW. Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: further characterization of the nucleocytoplasmic beta-N-acetylglucosaminidase, O-GlcNAcase. *J Biol Chem.* 2002 Jan 18;277(3):1755-61.
- (404) Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity.* 1997. 7: 837-847.
- (405) Wicklow BA, Ivanovich JL, Plews MM, Salo TJ, Noetzel MJ, Lueder GT, Cartegni L, Kaback MM, Sandhoff K, Steiner RD, Triggs-Raine BL. Severe subacute GM2 gangliosidosis caused by an apparently silent HEXA mutation (V324V) that results in aberrant splicing and reduced HEXA mRNA. *Am J Med Genet A.* 2004 Jun 1;127A(2):158-66.
- (406) Wietek C, Miggin SM, Jefferies CA, O'Neill LA. Interferon regulatory factor-3-mediated activation of the interferon-sensitive response element by Toll-like receptor (TLR) 4 but not TLR3 requires the p65 subunit of NF-kappa. *J Biol Chem* 2003; 278:50923-31
- (407) Wilkening G, Linke T, Sandhoff K. Lysosomal degradation on vesicular membrane surfaces. Enhanced glucosylceramide degradation by lysosomal anionic lipids and activators. *J Biol Chem.* 1998 Nov 13;273(46):30271-8.
- (408) Wilkening G, Linke T, Uhlhorn-Dierks G, Sandhoff K. Degradation of membrane-bound ganglioside GM1. Stimulation by bis(monoacylglycero)phosphate and the activator proteins SAP-B and GM2-AP. *J Biol Chem.* 2000 Nov 17;275(46):35814-9.
- (409) Wright CS, Li SC, Rastinejad F. Crystal structure of human GM2-activator protein with a novel beta-cup topology. *J Mol Biol.* 2000 Dec 1;304(3):411-22.
- (410) Wright CS, Mi LZ, Lee S, Rastinejad F. Crystal structure analysis of phosphatidylcholine-GM2-activator product complexes: evidence for hydrolase activity. *Biochemistry.* 2005 Oct 18;44(41):13510-21.
- (411) Wright CS, Mi LZ, Rastinejad F. Evidence for lipid packaging in the crystal structure of the GM2-activator complex with platelet activating factor. *J Mol Biol.* 2004 Sep 10;342(2):585-92.

Literaturverzeichnis

- (412) Wright CS, Zhao Q, Rastinejad F. Structural analysis of lipid complexes of GM2-activator protein. *J Mol Biol.* 2003 Aug 22;331(4):951-64.
- (413) Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990; 249:1431-3.
- (414) Wu L, Shortman K. Heterogeneity of thymic dendritic cells. Regulatory dendritic cells: there is more than just immune activation. *Semin Immunol.* 2005 Aug;17(4):304-12. Review.
- (415) Wu YY, Lockyer JM, Sugiyama E, Pavlova NV, Li YT, Li SC. Expression and specificity of human GM2 activator protein. *J Biol Chem.* 1994 Jun 10;269(23):16276-83.
- (416) Wu YY, Sonnino S, Li YT, Li SC. Characterization of an alternatively spliced GM2 activator protein, GM2A protein. An activator protein which stimulates the enzymatic hydrolysis of N-acetylneuraminic acid, but not N-acetylgalactosamine, from GM2. *J Biol Chem.* 1996 May 3;271(18):10611-5.
- (417) Xia CQ, Kao KJ. Suppression of interleukin-12 production through endogenously secreted interleukin-10 in activated dendritic cells: involvement of activation of extracellular signal-regulated protein kinase. *Scand J Immunol.* 2003;58:23-32.
- (418) Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science.* 1995 Nov 24;270(5240):1326-31.
- (419) Xie J, Qian J, Wang S, Freeman ME 3rd, Epstein J, Yi Q. Novel and Detrimental Effects of Lipopolysaccharide on In Vitro Generation of Immature Dendritic Cells: Involvement of Mitogen-Activated Protein Kinase p38 *J Immunol.* 2003 Nov 1;171(9):4792-800.
- (420) Xu W, Chen S, Huang J, Zheng Z, Chen L, Zhang W. The expression and distribution of S-100 protein and CD 83 in thyroid tissues of autoimmune thyroid diseases. *Cell Mol Immunol.* 2004 Oct;1(5):378-82.
- (421) Xu YH, Barnes S, Sun Y, Grabowski GA. Multi-system disorders of glycosphingolipid and ganglioside metabolism. *J Lipid Res.* 2010 Jul;51(7):1643-75. doi: 10.1194/jlr.R003996. Epub 2010 Mar 8. Review.
- (422) Yadao F, Hechtman P, Kaplan F. Formation of a ternary complex between GM2 activator protein, GM2 ganglioside and hexosaminidase A. *Biochim Biophys Acta.* 1997 Jun 20;1340(1):45-52.
- (423) Yan M, Peng J, Jabbar IA, Liu X, Filgueira L, Frazer IH, Thomas R. Activation of dendritic cells by human papillomavirus-like particles through TLR4 and NF-kappaB-mediated signalling, moderated by TGF-beta. *Immunol Cell Biol.* 2005 Feb;83(1):83-91.
- (424) Yao J, Mackman N, Edgington TS, Fan ST. Lipopolysaccharide induction of the tumor necrosis factor-alpha promoter in human monocytic cells. Regulation by Egr-1, c-Jun, and NF-kappaB transcription factors. *J Biol Chem.* 1997 Jul 11;272(28):17795-801.
- (425) Yates AJ, Rumpersaud A. Sphingolipids as receptor modulators. An overview. *Ann N Y Acad Sci.* 1998 Jun 19;845:57-71. Review.
- (426) Yi AK, Yoon JG, Yeo SJ, Hong SC, English BK, Krieg AM. Role of mitogen-activated protein kinases in CpG DNA-mediated IL-10 and IL-12 production: central role of extracellular signal-regulated kinase in the negative feedback loop of the CpG DNA-mediated Th1 response. *J Immunol.* 2002 May 1;168(9):4711-20.
- (427) Yogeewaran G, Hakomori S. Cell contact-dependent ganglioside changes in mouse 3T3 fibroblasts and a suppressed sialidase activity on cell contact. *Biochemistry.* 1975 May 20;14(10):2151-6.
- (428) Yu RK, Bieberich E, Xia T, Zeng G. Regulation of ganglioside biosynthesis in the nervous system. *J Lipid Res.* 2004 May;45(5):783-93. Review.
- (429) Yu RK, Saito M (1989) Structure and localization of gangliosides. In: Margolis RU and Margolis RK (eds) *Neurobiology of glycoconjugates.* Plenum Press, New York, pp 1-42
- (430) Yu RK, Tsai YT, Ariga T, Yanagisawa M. Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides--an overview. *J Oleo Sci.* 2011;60(10):537-44. Review.
- (431) Yu RK, Tsai YT, Ariga T. Functional roles of gangliosides in neurodevelopment: an overview of recent advances. *Neurochem Res.* 2012 Jun;37(6):1230-44. Review.
- (432) Yu RK, Yanagisawa M, Ariga T (2007) Glycosphingolipid structures. In: Kamerling J, Voragen AGJ, Lee Y, Boons G-J, Suzuki A and Taniguchi N (eds) *Comprehensive Glycoscience* (3). Elsevier, Amsterdam, pp 73-122
- (433) Yuziuk JA, Bertoni C, Beccari T, Orlacchio A, Wu YY, Li SC, Li YT. Specificity of mouse GM2 activator protein and beta-N-acetylhexosaminidases A and B. Similarities and differences with their human counterparts in the catabolism of GM2. *J Biol Chem.* 1998 Jan 2;273(1):66-72.
- (434) Zachara NE, Hart GW. Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc! *Biochim Biophys Acta.* 2006 May-Jun;1761(5-6):599-617. Review.
- (435) Zachara NE, Hart GW. O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Jul 6;1673(1-2):13-28. Review.

Literaturverzeichnis

- (436) Zajonc DM, Elsliger MA, Teyton L, Wilson IA. Crystal structure of CD1a in complex with a sulfatide self antigen at a resolution of 2.15 Å. *Nat Immunol.* 2003 Aug;4(8):808-15.
- (437) Zaru R, Ronkina N, Gaestel M, Arthur JS, Watts C. The MAPK-activated kinase Rsk controls an acute Toll-like receptor signaling response in dendritic cells and is activated through two distinct pathways *Nat Immunol.* 2007 Nov;8(11):1227-35.
- (438) Zhang M, Zhou J, Wang J, Zhou Q, Fang J, Zhou C, Chen W. Superparamagnetic iron oxide labeling limits the efficacy of rabbit immature dendritic cell vaccination by decreasing their antigen uptake ability in a lysosome-dependent manner. *Biotechnol Lett.* 2014 Sep 26.
- (439) Zhou LJ, Tedder TF. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Mar 19;93(6):2588-92.
- (440) Zhou LJ, Tedder TF. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol.* 1995 Apr 15;154(8):3821-35.
- (441) Zhu C, Gagnidze K, Gemberling JH, Plevy SE. Characterization of an activation protein-1-binding site in the murine interleukin-12 p40 promoter. Demonstration of novel functional elements by a reductionist approach. *J Biol Chem.* 2001 May 25;276(21):18519-28.
- (442) Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* 2000 Feb;12(2):121-7. Review.
- (443) Zschoche A, Fürst W, Schwarzmann G, Sanhoff K. Hydrolysis of lactosylceramide by human galactosylceramidase and GM1-beta-galactosidase in a detergent-free system and its stimulation by sphingolipid activator proteins, sap-B and sap-C. Activator proteins stimulate lactosylceramide hydrolysis. *Eur J Biochem.* 1994 May 15;222(1):83-90.
- (444) Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JI, Kwon ED, Carbone DP, Gabrilovich DI. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res.* 2000 May;6(5):1755-66.
- (445) Anderson KL, Perkin H, Surh CD, Venturini S, Maki RA, Torbett BE. Transcription factor PU.1 is necessary for development of thymic and myeloid progenitor-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2000 Feb 15;164(4):1855-61.
- (446) Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:767-811. Review.
- (447) Carotta S, Dakic A, D'Amico A, Pang SH, Greig KT, Nutt SL, Wu L. The transcription factor PU.1 controls dendritic cell development and Flt3 cytokine receptor expression in a dose-dependent manner. *Immunity.* 2010 May 28;32(5):628-41.
- (448) Castaneda JA, Lim MJ, Cooper JD, Pearce DA. Immune system irregularities in lysosomal storage disorders. *Acta Neuropathol.* 2008 Feb;115(2):159-74. Review.
- (449) Cernadas M, Lu J, Watts G, Brenner MB. CD1a expression defines an interleukin-12 producing population of human dendritic cells. *Clin Exp Immunol.* 2009 Mar;155(3):523-33.
- (450) Colino J, Snapper CM. Dendritic cells, new tools for vaccination. *Microbes Infect.* 2003 Apr;5(4):311-9. Review.
- (451) Conzelmann E, Sandhoff K. Purification and characterization of an activator protein for the degradation of glycolipids GM2 and GA2 by hexosaminidase A. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1979 Dec;360(12):1837-49.
- (452) Corr M, Tighe H, Lee D, Dudler J, Trieu M, Brinson DC, Carson DA. Costimulation provided by DNA immunization enhances antitumor immunity. *J Immunol.* 1997 Nov 15;159(10):4999-5004.
- (453) del Rio ML, Bernhardt G, Rodriguez-Barbosa JL, Förster R. Development and functional specialization of CD103+ dendritic cells. *Immunol Rev.* 2010 Mar;234(1):268-81. Review.
- (454) Dowling D, Hamilton CM, O'Neill SM. A comparative analysis of cytokine responses, cell surface marker expression and MAPKs in DCs matured with LPS compared with a panel of TLR ligands. *Cytokine.* 2008 Mar;41(3):254-62.
- (455) Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell.* 2004 Oct;6(4):313-9. Review.
- (456) Gunn MD, Tangemann K, Tam C, Cyster JG, Rosen SD, Williams LT. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jan 6;95(1):258-63.
- (457) Heitger A, Ladisch S. Gangliosides block antigen presentation by human monocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1996 Sep 27;1303(2):161-8.
- (458) Holowka D, Baird B. Fc(epsilon)RI as a paradigm for a lipid raft-dependent receptor in hematopoietic cells. *Semin Immunol.* 2001 Apr;13(2):99-105. Review.
- (459) Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, Schlomchick MJ. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease.* 6th edition. New York: Garland Science; 2005.
- (460) Kabouridis PS, Jury EC. Lipid rafts and T-lymphocyte function: implications for autoimmunity. *FEBS Lett.* 2008 Nov 12;582(27):3711-8. Review.

Literaturverzeichnis

- (461) Koerner TA Jr, Prestegard JH, Demou PC, Yu RK. High-resolution proton NMR studies of gangliosides. 1. Use of homonuclear two-dimensional spin-echo J-correlated spectroscopy for determination of residue composition and anomeric configurations. *Biochemistry*. 1983 May 24;22(11):2676-87.
- (462) Kornfeld R, Kornfeld S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem*. 1985;54:631-64. Review.
- (463) Kornfeld S. Lysosomal enzyme targeting. *Biochem Soc Trans*. 1990 Jun;18(3):367-74. Review
- (464) Langlet C, Bernard AM, Drevot P, He HT. Membrane rafts and signaling by the multichain immune recognition receptors. *Curr Opin Immunol*. 2000 Jun;12(3):250-5. Review.
- (465) Lanzavecchia A, Sallusto F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell*. 2001 Aug 10;106(3):263-6. Review.
- (466) Levery SB. ¹H-NMR study of GM2 ganglioside: evidence that an interresidue amide-carboxyl hydrogen bond contributes to stabilization of a preferred conformation. *Glycoconj J*. 1991 Dec;8(6):484-92.
- (467) Li SC, Serizawa S, Li YT, Nakamura K, Handa S. Effect of modification of sialic acid on enzymic hydrolysis of gangliosides GM1 and GM2. *J Biol Chem*. 1984 May 10;259(9):5409-10.
- (468) Li YT, Mazzotta MY, Wan CC, Orth R, Li SC. Hydrolysis of Tay-Sachs ganglioside by beta-hexosaminidase A of human liver and urine. *J Biol Chem*. 1973 Nov 10;248(21):7512-5.
- (469) Liu J, Ma X. Interferon regulatory factor 8 regulates RANTES gene transcription in cooperation with interferon regulatory factor-1, NF-kappaB, and PU.1. *J Biol Chem*. 2006 Jul 14;281(28):19188-95.
- (470) Lui K, Commens C, Choong R, Jaworski R. Colloidion babies with Gaucher's disease. *Arch Dis Child*. 1988 Jul;63(7):854-6.
- (471) Ma Y, Shurin GV, Peiyuan Z, Shurin MR. Dendritic cells in the cancer microenvironment. *J Cancer*. 2013;4(1):36-44.
- (472) Mamane Y, Heylbroeck C, Génin P, Algarté M, Servant MJ, LePage C, DeLuca C, Kwon H, Lin R, Hiscott J. Interferon regulatory factors: the next generation. *Gene*. 1999 Sep 3;237(1):1-14. Review.
- (473) Marecki S, Riendeau CJ, Liang MD, Fenton MJ. PU.1 and multiple IFN regulatory factor proteins synergize to mediate transcriptional activation of the human IL-1 beta gene. *J Immunol*. 2001 Jun 1;166(11):6829-38.
- (474) Orabona C, Grohmann U, Belladonna ML, Fallarino F, Vacca C, Bianchi R, Bozza S, Volpi C, Salomon BL, Fioretti MC, Romani L, Puccetti P. CD28 induces immunostimulatory signals in dendritic cells via CD80 and CD86. *Nat Immunol*. 2004 Nov;5(11):1134-42.
- (475) Prechtel AT, Turza NM, Theodoridis AA, Kummer M, Steinkasserer A. Small interfering RNA (siRNA) delivery into monocyte-derived dendritic cells by electroporation. *J Immunol Methods*. 2006 Apr 20;311(1-2):139-52.
- (476) Rehli M, Poltorak A, Schwarzfischer L, Krause SW, Andreesen R, Beutler B. PU.1 and interferon consensus sequence-binding protein regulate the myeloid expression of the human Toll-like receptor 4 gene. *J Biol Chem*. 2000 Mar 31;275(13):9773-81.
- (477) Reiner O, Dagan O, Horowitz M. Human sphingolipid activator protein-1 and sphingolipid activator protein-2 are encoded by the same gene. *J Mol Neurosci*. 1989;1(4):225-33.
- (478) Saeki H, Moore AM, Brown MJ, Hwang ST. Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *J Immunol*. 1999 Mar 1;162(5):2472-5.
- (479) Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med*. 1995 Aug 1;182(2):389-400.
- (480) Sandhoff K. The GM2-gangliosidosis and the elucidation of the beta-hexosaminidase system. *Adv Genet*. 2001;44:67-91.
- (481) Saththaporn S, Robins A, Vassanasiri W, El-Sheemy M, Jibril JA, Clark D, Valerio D, Eremin O. Dendritic cells are dysfunctional in patients with operable breast cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2004 Jun;53(6):510-8.
- (482) Scott CL, Aumeunier AM, Mowat AM. Intestinal CD103+ dendritic cells: master regulators of tolerance? *Trends Immunol*. 2011 Sep;32(9):412-9. Review.
- (483) Shurin GV, Ouellette CE, Shurin MR. Regulatory dendritic cells in the tumor immunoenvironment. *Cancer Immunol Immunother*. 2012 Feb;61(2):223-30. Review.
- (484) Steinman RM, Witmer MD. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978 Oct;75(10):5132-6.
- (485) Svennerholm L. The chemical structure of normal human brain and Tay-Sachs gangliosides. *Biochem Biophys Res Commun*. 1962 Nov 27;9:436-41.
- (486) Tacke PJ, de Vries IJ, Torensma R, Figdor CG. Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. *Nat Rev Immunol*. 2007 Oct;7(10):790-802. Review.
- (487) Tjomsland V, Spångeus A, Sandström P, Borch K, Messmer D, Larsson M. Semi mature blood dendritic cells exist in patients with ductal pancreatic adenocarcinoma owing to inflammatory factors released from the tumor. *PLoS One*. 2010 Oct 15;5(10):e13441.
- (488) Triantafilou M, Triantafilou K. Membrane partitioning: is location everything when it comes to endotoxin recognition?. *Subcell Biochem*. 2010;53:173-84. Review.

Literaturverzeichnis

- (489) Yoshizaki F, Nakayama H, Iwahara C, Takamori K, Ogawa H, Iwabuchi K. Role of glycosphingolipid-enriched microdomains in innate immunity: microdomain-dependent phagocytic cell functions. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Mar;1780(3):383-92. Review.
- (490) Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res*. 2002 Mar;12(1):9-18. Review.
- (491) Gupta N, DeFranco AL. Lipid rafts and B cell signaling. *Semin Cell Dev Biol*. 2007 Oct;18(5):616-26. Review.
- (492) Zhang YL, Dong C. MAP kinases in immune responses. *Cell Mol Immunol*. 2005 Feb;2(1):20-7. Review.
- (493) Wölfel M, Batten WY, Posovszky C, Bernhard H, Berthold F. Gangliosides inhibit the development from monocytes to dendritic cells. *Clin Exp Immunol*. 2002 Dec;130(3):441-8.