

Aus dem Lehrstuhl für Immunologie

Prof. Dr. Daniela Männel

Der Medizinischen Fakultät

Der Universität Regensburg

„Charakterisierung der Ficolin-B Expression in Immunzellen“

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades

der
Medizinischen Fakultät
Der Universität Regensburg

vorgelegt von
Johanna Maria Theresia Kürschner

2012

Aus dem Lehrstuhl für Immunologie

Prof. Dr. Daniela Männel

Der Medizinischen Fakultät

Der Universität Regensburg

„Charakterisierung der Ficolin-B Expression in Immunzellen“

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades

der
Medizinischen Fakultät
Der Universität Regensburg

vorgelegt von
Johanna Maria Theresia Kürschner

2012

Dekan: Prof. Dr. Dr. T.E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. D. N. Männel

2. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Salzberger

Tag der mündlichen Prüfung: 27.01.2012

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Zusammenfassung.....	4
I Das angeborene Immunsystem	5
I.1 Mechanismen des angeborenen Immunsystems	5
I.2 Rezeptoren des angeborenen Immunsystems.....	8
I.3 Pattern Recognition Molecules	9
I.3.1 Ficoline.....	10
I.3.1.1 Ficoline in Schweinen.....	12
I.3.1.2 Ficoline des Menschen.....	14
I.3.1.3 Ficoline in Mäusen.....	16
I.3.1.4 Klinische Bedeutung erniedrigter Ficolin-Spiegel beim Menschen	17
I.3.2 Collectine	18
I.4 Zellen des angeborenen Immunsystems	19
I.4.1 Dendritische Zellen.....	20
I.4.2 Monozyten/ Makrophagen.....	22
I.4.3 Neutrophile Zellen	23
I.5 Ziel der Arbeit.....	24
II Material und Methoden	25
II.1 Material	25
II.1.1 Chemikalien, Lösungen and Medien.....	25
II.1.2 Verbrauchsmaterial und Geräte.....	26
II.1.3 Kits	27
II.1.4 Master Mix	27
II.1.5 Vektor.....	27
II.1.6 Nukleinsäuren	28
II.1.7 Antikörper.....	28
II.1.8 Enzyme und Puffer.....	29
II.1.9 Zellen	29
II.1.10 Mäuse	29
II.1.11 Software und Datenbanken.....	29
II.2 Methoden.....	30
II 2.1 Zellbiologische Methoden.....	30
II.2.1.1 Zellkulturbedingungen	30

II.2.1.2 Bestimmung der Lebendzellzahl.....	30
II.2.1.3 Mykoplasmentest.....	30
II.2.1.4 Präparation von Zellen aus Mäusen	32
II.2.1.4.1 Knochenmarkzellen	32
II.2.1.4.2 Parenchymzellen der Milz.....	32
II.2.1.5 Produktion von Überständen	33
II.2.1.6 Produktion der Zellen	33
II.2.1.6.1 Produktion von Makrophagen aus Knochenmarkzellen (BMM)	33
II.2.1.6.2 Produktion von dendritischen Zellen aus Knochenmarkzellen (BMDC) ..	33
II.2.1.6.3 Produktion der ER Hoxb8-Neutrophilen.....	34
II.2.1.6.3.1 Auftauen und Einfrieren der Progenitorzellen.....	35
II.2.1.6.3.2 Kultur der Progenitorzellen	35
II.2.1.6.3.3 Herstellung von ER Hoxb8-Neutrophilen aus Vorläuferzellen	35
II.2.1.7 Stimulierung der Zellen.....	36
II.2.1.7.1 Stimulierung der BMM und BMDC	36
II.2.1.7.2 Stimulierung der ER Hoxb8-Neutrophilen	36
II.2.1.7.3 Stimulierung der PU5-1.8.....	36
II.2.1.8 Cytospin und Diff-Quick Färbung.....	37
II.2.1.9 Mikroskopie	38
II.2.3.10 Luciferase - Assay	38
II.2.2 DNA- und RNA-Techniken	40
II.2.2.1 Arbeiten mit RNA.....	40
II.2.2.1.1 RNA-Extraktion.....	40
II.2.2.1.2 Messung der RNA-Konzentration	40
II.2.2.1.3 Reverse Transkription.....	41
II.2.2.1.4 RNA-Gelelektrophorese.....	41
II.2.2.2 Arbeiten mit DNA.....	42
II.2.2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese	42
II.2.2.2.2 Die Polymerase-Ketten-Reaktion.....	42
II.2.2.2.2.1 Standard-PCR	43
II.2.2.2.2.2 Realtime-PCR	44
II.2.2.2.3 Plasmidaufreinigung - Maxiprep.....	45
II.2.2.2.4 transiente Transfektion	46
II.2.2.2.4.1 Tranfektion mit Fugene® HD Transfektion Reagent.....	46
II.2.2.2.4.2 Transfektion mit DOTAP Liposomal Transfektion Reagent	47
II.2.3 Immunologische Methoden	47

II.2.3.1 Allgemeine Durchflusszytometrie.....	47
II.2.3.2 Zellsortierung.....	49
II.2.3.3 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)	49
III Ergebnisse	50
III.1 Expression von Ficolin-B	50
III.1.1 Expression von Ficolin-B in aus Knochenmarkzellen kultivierten dendritischen Zellen (BMDC)	50
III.1.1.1 Morphologie der dendritischen Zellen	50
III.1.1.2 Kinetik der Ficolin-B Expression während der Differenzierung zu BMDC.....	51
III.1.1.3 Expresssion von Ficolin-B in BMDC unterschiedlicher Reifungsstadien	52
III.1.1.4 Stimulierung der BMDC	54
III.1.2 Expression von Ficolin-B in Makrophagen.....	55
III.1.2.1 Expression von Ficolin-B in aus Knochenmarkzellen kultivierten Makrophagen (BMM).....	55
III.1.2.1.1 Morphologie der Makrophagen	55
III.1.2.1.2 Kinetik der Ficolin-B-Expression während der Differenzierung zu BMM	55
III.1.2.1.3 Stimulierung der BMM	56
III.1.2.2 Expression von Ficolin-B in Milzmakrophagen unterschiedlicher Reifungsstadien	57
III.1.3 Expression von Ficolin-B in ER Hoxb8 neutrophilen Zellen	59
III.1.3.1 Morphologie und FACS-Analyse der Hoxb8-Zellen während der Differenzierung.....	59
III.1.3.2 Nachweis der Ficolin-B mRNA-Expression und ihre Kinetik während der Differenzierung zu Hoxb8-Neutrophilen.....	61
III.1.3.4 Stimulierung der ausdifferenzierten Hoxb8 Neutrophilen	63
III.3 Untersuchung des Ficolin-B-Promotors.....	64
IV Diskussion.....	67
IV.1 Bisherige Erkenntnisse über die Funktion von Ficolin-B	67
IV. 2 Expression von Ficolin-B.....	68
IV.2.1 Expression von Ficolin-B in verschiedenen Zellreihen	68
IV.2.2 Expression von Ficolin-B während der Zelldifferenzierung	69
IV.2.3 Expression von Ficolin-B in BMDC während spontaner Reifung und Aktivierung	71
IV.2.4 Expression von Ficolin-B in BMM während Reifung und Stimulierung.....	72

IV.2.5 Veränderungen der Ficolin-B Expression in ER Hoxb8-Neutrophilen nach Stimulierung	74
IV.3 Promotorstudien	74
Anhang	76
Danksagung	77
Literaturverzeichnis	78

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
APC	Antigenpräsentierende Zellen
BMDC	aus Knochenmarkzellen generierte dendritische Zellen
BMM	aus Knochenmarkzellen generierte Makrophagen
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CRD	<i>Carbohydrate Recognition Domain</i>
CRP	C-reaktives Protein
DC	dendritische Zellen
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethyldicarbonat,
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleotide
E. coli	Escherischia coli
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
FACS	Durchflusszytometrie, fluorescence activated cell sorter
fbg	Fibrinogen
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceninisothiocyanat
G	Guanin
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GalNAc	N-Acetyl-Galactosamin
GlcNAc	N-Acetyl-D-glucosamin
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton

KM	Knochenmark
Leu	Leucin
LPS	Lipopolsaccharid
LTS	Lipoteichonsäure
M	Molar (mol/l)
Mac-1	<i>murine macrophage-granulocyte specific antigen = CD11b</i>
ManNAc	N-Acetyl-Mannosamin
MBL	Mannan-bindendes-Lektin
M-CSF	Makrophagen koloniestimulierender Faktor
Met	Methionin
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
MOPS	<i>3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure</i>
MR	Makrophagen-Mannose-Rezeptor
MW	Molekulargewicht
n	nano
NaCl	Natriumchlorid
NeuNAc	N-Acetylneuraminsäure
NF-κB	Nukleärer Faktor κB
OD	optische Dichte
PBM	Peripherer Blutmonozyt, <i>Peripheral Blood Monozyte</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PerCept	Peridinin Chlorophyll-a Protein
Phe	Phenylalanin
PMA	Phorbol-Myristataacetat
PMNs	polymorphonuclear cells
PRM	<i>Pattern Recognition Molecule</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
r	rekombinant
RNA	komplementäre RNA
RNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	deoxyribonucleic acid
RNA	Boten-RNA, messenger RNA
RNA	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure

SCF	Stammzellfaktor
sec	Sekunde
SiaLacNAc	n-Acetylsialin
Strept	Streavidin
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE –Puffer	Tris-Aacetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
U	Einheiten
u.a.	unter anderem
v/v	Volumen/Volumen
vol	Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
µ	mikro

Zusammenfassung

Das angeborene Immunsystem verfügt über verschiedene Erkennungs- und Effektormechanismen, die einen wichtigen Beitrag für den Erfolg des gesamten Systems darstellen. Einer davon ist die Identifizierung pathogenspezifischer Strukturen, die u.a. über *pattern recognition molecules* (PRM) erfolgt, zu denen auch die Ficoline gehören.

Dabei handelt es sich um Proteine, die sowohl kollagen- als auch fibrinogenartige Domänen besitzen und mit letzterer allesamt an N-Acetyl-D-Glucosamin (GlcNAc) binden können. Im Menschen konnten bisher 3 verschiedene Ficoline detektiert werden, während Mäuse Ficolin-A (als Plasmaficolin) und Ficolin-B (als Nicht-Plasmaficolin) bilden.

Ficolin-B mRNA wird in adulten Mäusen in Milz und Knochenmark exprimiert, in letzterem in Zellen der myeloischen Reihe. Das Protein konnte bisher nur in Peritonealmakrophagen nachgewiesen werden und im Gegensatz zu den anderen humanen und murinen Ficolinen konnte keine Aktivierung des Komplementsystems gezeigt werden. Um Informationen über die Funktion von Ficolin-B zu erhalten, sollte nun genauer gezeigt werden, in welchen Zellen der myeloischen Reihe Ficolin-B mRNA exprimiert wird und wie sich die Expression während Zelldifferenzierung, -reifung und -Stimulierung verändert.

Dazu wurden aus Knochenmarkzellen Makrophagen (BMM) und unreife dendritische Zellen (BMDC) kultiviert und die mRNA-Expression mittels reverser Transkription und Real-Time-PCR dargestellt. Neutrophile Zellen wurden aus Östrogen-abhängigen Hoxb8-Neutrophilen-Vorläuferzellen gewonnen und gleichfalls während ihrer Differenzierung auf ihre mRNA-Expression hin getestet. Zugleich wurde die Differenzierung der Neutrophilen mittels FACS-Analysen nachverfolgt und auch lichtmikroskopisch dargestellt. In weiteren Versuchen wurden die ausdifferenzierten Zellen unterschiedlich stimuliert und der Einfluss auf die Ficolin-B mRNA-Expression untersucht. Ferner wurden BMDC mit dem FACS-Zellsortierungssystem in Populationen unterschiedlicher Reifegrade eingeteilt und einzeln mittels Standard- und Real-Time-PCR auf ihren Ficolin-B mRNA-Gehalt hin getestet. Ebenso wurde mit Milzmakrophagen verfahren.

Dabei zeigte sich, dass BMDC und BMM weniger Ficolin-B mRNA exprimieren als Knochenmarkzellen und die Expression während der Kulturzeit abnimmt. Ebenso konnte eine Reduktion der Expression nach Stimulierung der Zellen gesehen werden, und auch reife BMDC und Milzmakrophagen exprimieren weniger Ficolin-B mRNA als die unreiferen Zellen. Bei den Untersuchungen an neutrophilen Zellen zeigte sich ein starker Anstieg der Expression in der Mitte der Differenzierungsvorgänge und ihre Stimulierung konnte eine Steigerung der Ficolin-B mRNA-Expression auslösen. Daraus ergibt sich, dass Ficolin-B in den verschiedenen Immunzellen eine unterschiedliche Funktion ausüben könnte, wobei selbst eine Funktion in der Zelldifferenzierung möglich erscheint.

I Das angeborene Immunsystem

I.1 Mechanismen des angeborenen Immunsystems

Unser Körper verfügt über zahlreiche Mechanismen Krankheitserreger abzuwehren. Meist werden diese einem angeborenen und einem erworbenen Systeme zugeordnet. Während die erworbene Immunantwort einen teilweise lebenslangen, spezifischen Schutz vor Erregern ermöglicht, bildet der angeborene Teil des Immunsystems einen unspezifischen Basisschutz. Vereinfacht lassen sich drei Funktionen des angeborenen Systems herausstellen. Erstens versucht es Pathogene bereits am Eindringen in den Körper zu hindern, zweitens verfügt es über verschiedene Mechanismen Pathogene selbständig zu eliminieren und drittens aktiviert und moduliert es eine Antwort des erworbenen Immunsystems und überbrückt die Zeit, bis dieses System wirksam werden kann (Janeway, 2008).

Haut und Schleimhäute bilden eine große Angriffsfläche für Pathogene. Doch schon eine erste physische Barriere für pathogene Keime wird von den Epithelzellen der Haut, des Urogenital-, Gastrointestinal- und Respirationstrakts gebildet. Weitere Abwehrmechanismen, die ein Erreger erst zu überwinden hat, sind zum Beispiel die Darmperistaltik im Gastrointestinaltrakt oder der retrograde Zilienschlag in den Atemwegen. Unsere Epithelien und Drüsen produzieren zudem Stoffe, die mikrozid wirken. Tränen und Speichel enthalten Lysozym, das die Zellwand gram-positiver Bakterien abbaut, Laktoferrin, das für viele Bakterien essentielle Eisenionen bindet und ihnen damit entzieht und die *Surfactant*-Proteine SP-A und SP-D in den Alveolen der Lunge (siehe I.3.2) (Janeway, 2008).

Gelingt es einem Erreger doch in das Gewebe einzudringen, sind ortständige Makrophagen, die in Bindegewebe, Submukosa und Lunge vorkommen, die ersten Zellen, die ihn als körperfremd erkennen können. Sie werden schon bald von neutrophilen Zellen, die aus den Blutgefäßen austreten und in das betroffene Gewebe einwandern, unterstützt. Beide Zellgruppen gehören zu den Phagozyten, die über verschiedenen Rezeptoren, wie dem Mannose-Rezeptor und Toll-like-Rezeptoren, Pathogene erkennen und sie phagozytieren. Dies geschieht, indem sie diese mit ihrer Zellmembran vollständig umgeben, und sie anschließend in einem aus Membran gebildeten Vesikel, dem sogenannten Phagosom, in sich aufnehmen. Eine genauere Betrachtung der Rezeptoren, der Makrophagen und Monozyten erfolgt später (siehe I.4). Das Abtöten der Erreger erfolgt einerseits durch Senkung des pH-Wertes im Phagosom, ein anderer Mechanismus ist die Fusion des Phagosoms mit den für Phagozyten typischen Lysosomen, die mikrozide Enzyme und Peptide enthalten (Janeway, 2008).

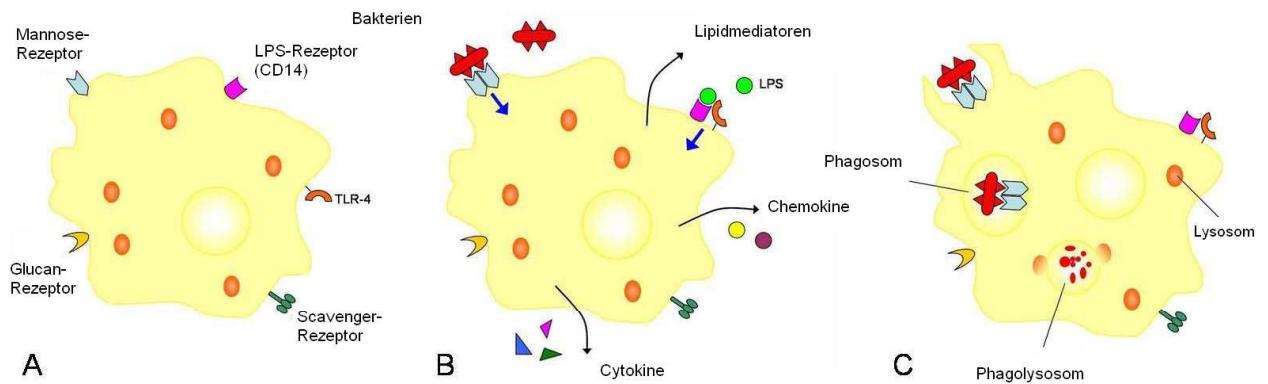


Abbildung I.1: Makrophagen erkennen und phagozytieren Pathogene

A) Makrophagen exprimieren Rezeptoren zur Erkennung verschiedener Bakterienbestandteile, so zum Beispiel für Saccharide (Mannose- und Glucan-Rezeptoren), Lipide (TLR-4/CD14) und andere Bestandteile von Erregern (Toll-like- und Scavengerrezeptoren). **B)** Die Bindung an diese Rezeptoren bewirkt über unterschiedliche Signalwege die Ausschüttung verschiedener Chemokine, Lipidmediatoren und Cytokine, wie Interleukin-1 (IL-1) und Tumornekrosefaktoren (TNF). **C)** Es erfolgt die Aufnahme der Pathogene in intrazelluläre Vesikel, die sogenannten Phagosomen, die mit den Lysosomen fusionieren, wo sie zerstört werden (Janeway, 2008)

Den wohl wichtigsten Mechanismus stellt hingegen der sogenannte *respiratory burst* dar. Enzyme, wie die NADPH-Peroxidase und die induzierbare NO-Synthetase (iNOS2) produzieren große Mengen an zelltoxischen Superoxidanionen (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Stickoxid (NO) (Janeway, 2008) (Robinson, 2008).

Der Kontakt mit Pathogenen löst auch eine Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen und weiteren Mediatoren aus, die unter anderem weitere Immunzellen in das Entzündungsgebiet locken oder die Differenzierung von Zellen bewirken (Fang, 2004).

Nach Phagozytose der Erreger, zu der auch dendritische Zellen (DC) befähigt sind, werden die Antigene in Makrophagen und dendritischen Zellen weiter prozessiert und schließlich auf der Zelloberfläche präsentiert. Sie gehören damit zur Gruppe der professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC), die letztendlich naive T-Zellen aktivieren und die erworbene Immunantwort mit initiieren und steuern (siehe I.4). Dabei erfolgt die antigenspezifische Interaktion zwischen DCs bzw. Makrophagen und T-Zellen über die *major histocompatibility complexes* (MHC). Wie alle kernhaltigen Zellen exprimieren auch APCs MHC Klasse I-Moleküle, die intrazelluläre Proteine präsentieren. Zudem bilden sie in hoher Anzahl MHC Klasse II. Diese werden mit Peptidfragmenten der phagozytierten extrazellulären Proteine beladen. Zytotoxische CD8⁺ T-Zellen sind in der Lage, mit ihrem T-Zellrezeptor an MHC Klasse I Antigene zu binden, während CD4⁺ T-Helferzellen an MHC II Antigene binden. Zusätzlich erfordert eine Aktivierung der T-Helferzellen weitere

kostimulatorische Signale, zum Beispiel über CD80/86 Interaktion mit CD28. Die Entscheidung, in welche Subpopulationen eine T-Helferzelle differenziert, ob über den Th₁-Weg die zellvermittelte Immunantwort, oder über Th₂-Zellen die humorale Immunantwort gefördert wird, wird über Zytokine und andere Mechanismen getroffen (Janeway, 2008).

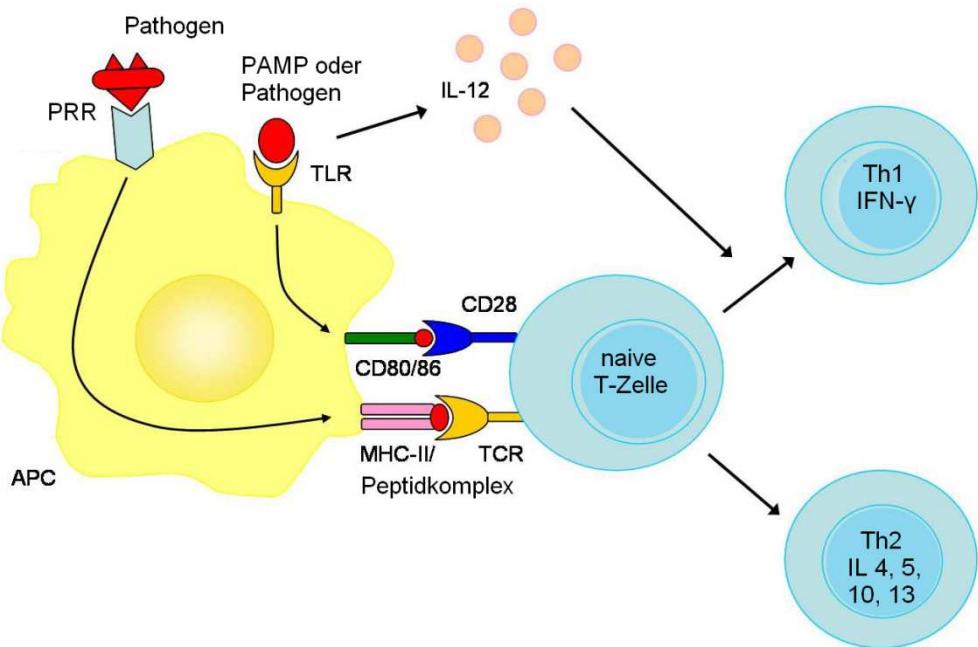


Abbildung I.2: Die Interaktion zwischen Pathogenen und antigenpräsentierenden Zellen ist wichtig für die Aktivierung von naiven T-Zellen und die Einleitung der adaptiven Immunantwort

Phagozytierte Pathogene werden in den APCs weiterverarbeitet und Peptide auf MHC-II-Molekülen präsentiert. Zusätzlich wird durch die Bindung des Pathogens an Toll-like-Rezeptoren die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80/86 induziert. Erst durch die gemeinsame Interaktion von MHC-II und CD80/86 mit dem T-Zellrezeptor und CD28, wird die Aktivierung der T-Zellen bewirkt und eine Differenzierung in Th1- und Th2-Zellen eingeleitet, die über bestimmte Interleukine, die teilweise von den APCs selbst produziert werden, in eine bestimmte Richtung gelenkt wird (nach Jones, 2005)

Ein weiteres wichtiges Standbein des angeborenen Immunsystems stellt das Komplementsystem dar. Es wird von Plasmaproteinen und – enzymen gebildet und bewirkt neben der Opsonierung von Pathogenen, auch Zellyse und Chemotaxis. Die Aktivierung des Komplementsystems erfolgt auf drei verschiedene Wegen, dem klassischen Weg (Bindung an Antigen-Antikörper-Komplexe), dem Lektin-Weg (Bindung von Mannose-bindendem Lektin (MBL) oder bestimmten Ficolinen an Kohlenhydratstrukturen) und dem alternativen Weg (selbstaktivierend), die jedoch alle dieselbe Endstrecke besitzen. Beim Lektin-Weg führt die Bindung von MBL/Ficolinen an pathogene Kohlenhydratstrukturen zur Assoziation mit MBL-assoziierten Serinproteasen (MASP) und der Spaltung der Komplementfaktoren C2 und

C4, die als C3-Convertase fungieren und das System weiter aktivieren (Janeway, 2008) (Walport, 2001)

I.2 Rezeptoren des angeborenen Immunsystems

Eine wichtige Funktion des Immunsystems besteht darin, körpereigene von fremden Strukturen zu unterscheiden. Dies gelingt anhand von Molekülen und Strukturen, die typisch für Pathogene sind und auf Zellen des Wirts nicht vorkommen. Diese Erkennungsmuster werden als *pathogen associated molecular patterns* (PAMP) bezeichnet. Dabei kann es sich zum Beispiel um extrazelluläre Bestandteile, wie Lipopolysaccharide (LPS), einem Teil der Zellwand von gram-negativen Bakterien, handeln, aber auch um ursprünglich intrazellulär vorkommende Moleküle, wie bakterielle DNA, die sich durch einen höheren Gehalt an Guanin und Cytosin und einen geringeren Methylierungsgrad auszeichnet. Wichtig sind auch Kohlenhydratstrukturen auf Zelloberflächen. So sind auf Wirtszellen viele Zucker nicht frei zugängig, weil endständige Sialinsäure sie verdeckt. Diese PAMPs werden von sogenannten *pattern recognition receptors* (PRR) erkannt, die zum einen auf Makrophagen, Neutrophilen und dendritischen Zellen membrangebunden sind, zum anderen aber auch sezerniert werden oder intrazellulär vorkommen (Janeway et al., 2002) (Janeway, 2008) (Medzhitov et al., 2002).

Zwar erkennen PRRs keine spezifischen Antigene und die Ligandenbindung bewirkt auch kein immunologisches Gedächtnis, aber der große Vorteil der PRRs liegt darin, dass sie Pathogene ohne Zeitverzögerung erkennen können und eine Immunantwort schon vor Beginn der Antikörperproduktion, die erst nach vier bis fünf Tagen einsetzt, stattfinden kann (Janeway, 2008).

Die Funktionen der PRRs sind vielgestaltig. Zum einen wirken sie als Opsonine fördernd auf die Phagozytose, können aber auch direkt als Phagozytoserezeptoren fungieren. Des Weiteren kommt es zu Induktion pro-inflammatorischer Signalwege und Effektormoleküle, welche die weitere Immunantwort steuern und das adaptive Immunsystem aktivieren. Auch die Aktivierung des Komplement- und Gerinnungssystems gehört zu ihren Aufgaben (Janeway et al., 2002).

Zu den **löslichen** PRR, die treffender als *pattern recognition molecules* (PRM) bezeichnet werden, zählen Lektine wie MBL (siehe I.3.2), die Surfactantproteine SP-A und SP-D und Ficoline (siehe 1.3.1) aber auch Pentraxine, wie das C-reaktive Protein (CRP) und Serum Amyloid Protein (SAP), die in der frühen Entzündungsphase in der Leber produziert werden (Janeway et al., 2002). Ein genauer Überblick über die Ficoline wird weiter unten erfolgen (siehe 1.3.1).

Zu den **membrangebundenen** Rezeptoren gehören unter anderem der Makrophagen-Mannose-Rezeptor (MR), der Scavenger-Rezeptor und die Gruppe der Toll-like-Rezeptoren. Beim MR handelt es sich um ein Calcium-abhängiges Lektin, das an verzweigte, α -vernetzte Oligomannosen bindet. Es erkennt Bakterien, Pilze, Viren und Protozoen, wobei es nach Bindung an *Klebsiella pneumoniae* oder *Pneumocystis carinii* direkt als Phagozytoserezeptor wirkt (Linehan *et al.*, 2000) (Janeway *et al.*, 2002).

Der Scavenger-Rezeptor auf Makrophagen erkennt eine Vielzahl negativ geladener Liganden, so zum Beispiel doppelsträngige RNA oder LPS. Er induziert Phagozytose und ist wichtig für die Infektabwehr bei *Listeria monocytogenes* und *Herpes simplex* Viren (Janeway *et al.*, 2002). Die Toll-like-Rezeptoren (TLR) wurden erstmals bei Taufliegen der Gattung *Drosophila* untersucht. Bisher sind 11 verschiedene bekannt, die jeweils unterschiedlich Strukturen, wie LPS (TLR 4), Flagellin (TLR 5) und bakterielle DNA (TLR 9) erkennen. Im Gegensatz zu den oben erwähnten Rezeptoren wird durch eine Ligandenbindung keine Phagozytose ausgelöst. Vielmehr bewirken sie eine Aktivierung des NF- κ B-Signalweges. Über diesen Weg wird die Bildung verschiedener proinflammatorischer Zytokine, so zum Beispiel Tumornekrosefaktor (TNF), IL-4, IL-6 und IL-12 bewirkt und es kommt zur Expression der kostimulatorischen Moleküle, wie CD80/86 auf Makrophagen und DCs (Iwasaki *et al.*, 2004) (Janeway *et al.*, 2002) (Janeway, 2008).

Daneben gibt es auch Rezeptoren, die **intrazellulär** wirken. Dazu zählt unter anderem der oben erwähnte TLR 9, der membrangebunden in Lysosomen gefunden wird (Janeway, 2008), aber auch Rezeptoren, die frei im Zytosol vorliegen. Beispiele dafür sind die Protein Kinase R (PKR), die an doppelsträngige virale RNA bindet und den Translationsfaktor eIF2 α inhibiert, um dadurch eine Replikation der infizierten Zelle zu hemmen, sowie die NOD-Proteine (*Nucleotid binding Oligomerization Domain*). Diese werden in Epithelzellen, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert und wirken ebenfalls über den NF κ B-Signalweg aktivierend auf die Immunantwort (Janeway *et al.*, 2002) (Janeway, 2008).

I.3 Pattern Recognition Molecules

Zu den PRM zählen sowohl Ficoline, als auch Collectine. Beide sind Proteine des angeborenen Immunsystems, die PAMPs erkennen. Das erste Lektin namens Conglutinin wurde 1906 von Bordet und Streng durch seine Fähigkeit entdeckt, Erythrozyten zu agglutinieren, die mit Komplement und Antikörper bedeckt waren (Bordet *et al.*, 1909). Bis heute sind weitere Collectine, wie MBL, SP-A und SP-D, die Lebercollectine CL-L1 und CL-P1, sowie Conglutinin und CL 43 (in Rindern) bekannt. Den beiden PRM-Gruppen gemeinsam ist, dass sie (bis auf SP-A) aus Homooligomeren aufgebaut sind, wobei jeweils 3

Polypeptidketten eine Untereinheit bilden und die Ketten über eine N-ständige Kollagenartige und eine C-ständige Kohlenhydrat-bindende Domäne (*Carbohydrate Recognition Domain*, CRD) verfügen. Die kollagenartigen Domänen sind von stark unterschiedlicher Länge zwischen 19 Triplets bei MBL und 59 im Falle von SP-D. Während die CRD in Ficolinen aus einer fibrinogenartigen Domäne besteht, wird sie in Collectinen aus einer Ca^{2+} -abhängigen Lektindomäne (*C-type lectin domain*) gebildet. Die Bindung zwischen einer einzelnen CRD und Monosacchariden ist nur schwach, erst wenn mehrere Domänen binden, ist die Avidität hoch. Dies ist beispielsweise bei hochkomplexen Zuckern auf der Oberfläche von Pathogenen der Fall. In den 90er Jahren wurde außerdem zum ersten Mal festgestellt, dass PRM, in diesem Fall MBL, auch das Komplementsystem aktivieren können. (Holmskov *et al.*, 2003) (Lu *et al.*, 2002)..

I.3.1 Ficoline

Ficoline wurden zuerst in der Uterusschleimhaut von Schweinen als *transforming growth factor-1-binding* Proteine gefunden (Ichijo *et al.*, 1991). Da das Protein sowohl aus kollagen-, als auch fibrinogenähnlichen Domänen aufgebaut ist, nannte die Forschergruppe die neu entdeckten Proteine Ficoline. Seit dieser Zeit wurden Ficoline auf Protein- oder DNA/RNA-Ebenen noch im Menschen (Matsushita *et al.*, 1996) (Lu *et al.*, 1996) (Sugimoto *et al.*, 1998), in Mäusen (Fujimori *et al.*, 1998) (Ohashi *et al.*, 1998), in Igeln (Omori-Satho *et al.*, 2000), in Wirbellosen (Kenjo *et al.*, 2001) und in Fröschen der Gattung *Xenopus* (Kakinuma *et al.*, 2003) entdeckt.

Ficoline sind aus einer unterschiedlichen Anzahl gleicher Untereinheiten aufgebaut, die wiederum aus drei identischen Polypeptidketten bestehen. Diese enthalten eine kurze N-ständige Region mit ein bis zwei Cysteinresten, gefolgt von einer kollagenähnlichen Region, die durch 11 bis 19 Gly-X-Y Triplets gekennzeichnet ist. Sie weist im Gegensatz zu anderen Lectinen keinen Knick auf. Nach einer kurzen Verbindungsregion (*link region*) schließt sich die fibrinogenähnlichen Domäne (*Fbg-Domäne*) an. Über N-ständige Disulfidbrücken erfolgt die Bindung der Ketten aneinander (Holmskov *et al.*, 2003). In den meisten Fällen werden Ficoline aus 4 Untereinheiten à 3 Polypeptidketten gebildet, wobei sich die Untereinheiten unter anderem kovalent an der N-terminalen Region verbinden und die Fbg-Domänen wie die Blüten eines Tulpenstraußes auseinander ragen (Holmskov *et al.*, 2003).

Die Bindung an verschiedene Kohlenhydratstrukturen erfolgt über die Fbg-Domänen, wobei noch nicht ganz geklärt ist, ob die Bindung Ca^{2+} -abhängig ist (Matsushita *et al.*, 1996) (Le *et al.*, 1997) (Ohashi *et al.*, 1997). Die Fbg-Domäne besteht aus 220-250 Aminosäuren, wobei

24 zumeist hydrophobe Aminosäuren immer vorhanden und 40 weitere stark konserviert sind (Lu et al., 1998).

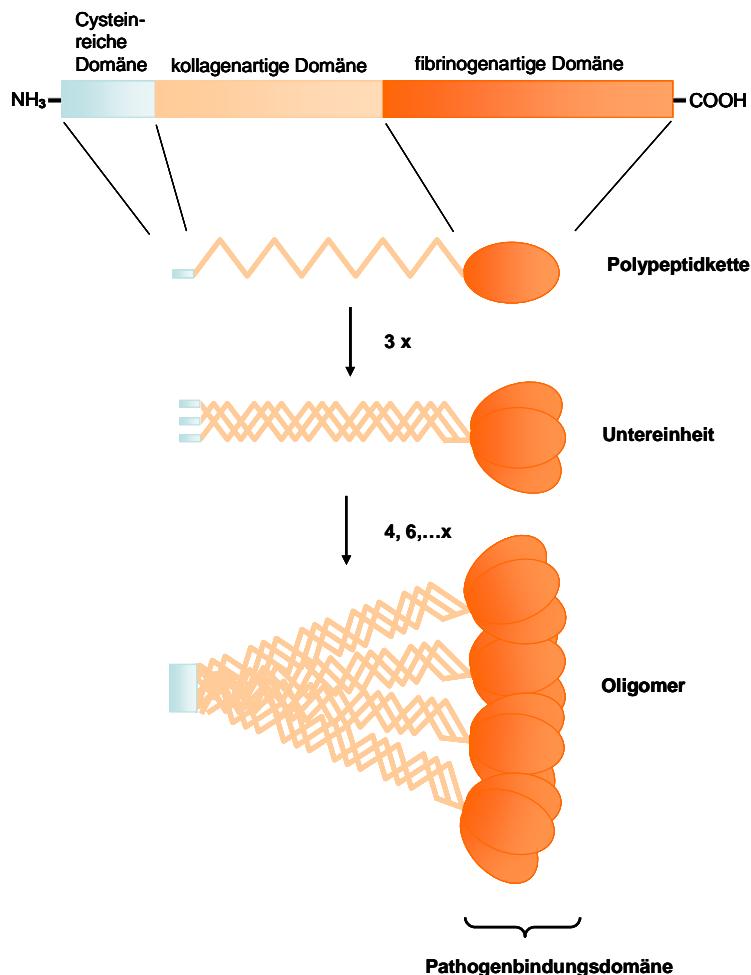


Abbildung I.3: Struktureller Aufbau von Ficolin

Drei, aus einer N-terminalen Cystein-reichen Domäne, einer darauf folgenden kollagenartigen Domäne und einer C-terminalen fibrinogenartigen Domäne aufgebauten Polypeptidketten, bilden eine Untereinheit. Mehrere identische Untereinheiten bilden ein Oligomer.

Um die Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz, sowie die Funktion und Gewebeverteilung der verschiedenen Ficoline in unterschiedlichen Spezies zu erklären, führten Endo und Mitarbeiter vergleichende Studien an den verschiedenen Ficolingenen durch. Noch vor dem Auftreten von *Xenopus* kam es vermutlich durch Genduplikationen zu zwei verschiedenen Genprototypen, die H-Ficolin- und B/M-Linie. H-Ficolin wird nur in Menschen gebildet und liegt bei Mäusen als Pseudogen vor. Im Verlauf kam es zur weiteren Abspaltung des Ficolin-A-Gens aus der B/M-Linie, so dass Ficolin-A nicht als Ortholog zum humanen L-Ficolin zu sehen ist, welches sich erst später aus der B/M-Linie absprangt. Vermutlich hat ein ähnlicher Selektionsdruck auf Mäuse und Menschen zur unabhängigen Entwicklung eines

Serumficolins geführt. Hingegen wird davon ausgegangen, dass es sich beim humanen M-Ficolin und beim murinen Ficolin-B um homologe Proteine handelt (Endo *et al.*, 2004).

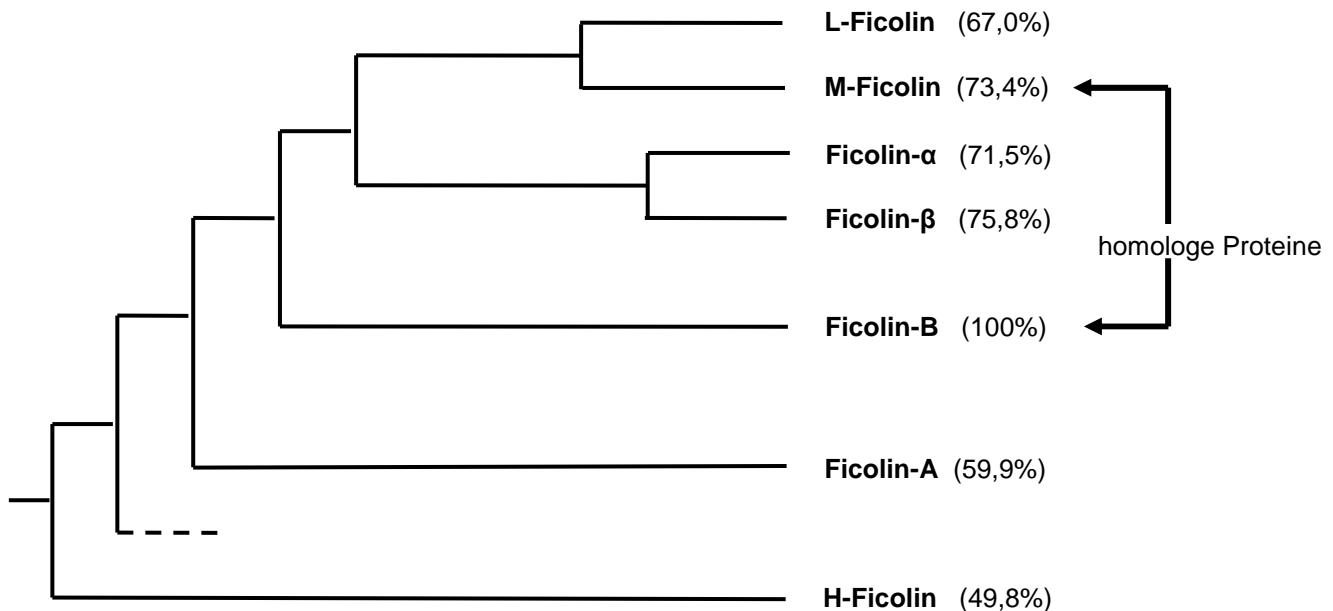


Abbildung I.4: Phylogenetischer Stammbaum der fibrinogenähnlichen Domäne und prozentuale Übereinstimmung der Ficoline auf Aminosäuresequenz

Der Stammbaum wurde über den Abgleich der Aminosäuresequenzen der fibrinogenähnlichen Domänen gebildet (nach Endo *et al.*, 2004 abgeändert). Die Prozentangaben beschreiben die Übereinstimmung der verschiedenen Ficoline im Vergleich zu Ficolin-B auf Aminosäureniveau (nach Ohashi und Erickson *et al.*, 1998)

In den meisten Spezies konnte ein Plasmaficolin und ein Nicht-Plasmaficolin nachgewiesen werden. Dabei besitzen alle Ficoline einen Bindungsspezifität zu GlcNAc (Matsushita *et al.*, 1996).

Im Folgenden werden die verschiedenen Ficoline von Schweinen, Menschen und Mäusen genauer dargestellt.

I.3.1.1 Ficoline in Schweinen

In Schweinen konnten zwei verschiedene Ficolingene nachgewiesen werden: Ficolin- α und Ficolin- β (Ichijo *et al.*, 1993). Während Ficolin- α in Lungengewebe, Leber, Milz, Knochenmark (Ohashi *et al.*, 1998) und geringfügig auch im Uterus exprimiert wird (Ichijo *et al.*, 1993), wird Ficolin- β im Knochenmark, in Neutrophilen (Brooks *et al.*, 2003b) und im Skelettmuskel exprimiert (Ichijo *et al.*, 1993). Auf Aminosäureebene besteht eine 81%-ige Übereinstimmung der beiden Proteine. Bei Studien mit rekombinantern Ficolin- α bei dem die

N-ständigen Cysteinreste durch Serin ersetzt wurden (Cys^4 , Cys^{24} und $\text{Cys}^4/\text{Cys}^{24}$), konnte nachgewiesen werden, dass Cys^{24} – Cys^{24} -Disulfidbrücken für die Bildung der Multimere essentiell sind (Ohashi *et al.*, 2004).

Ficolin- α kann im Plasma nachgewiesen werden und besteht zumeist aus 3 oder 6 Untereinheiten (12- und 24-mere), wobei die Form mit 6 Untereinheiten vorherrscht. Eine Polypeptidkette besitzt dabei ein Molekulargewicht von 35 kD (Ohashi *et al.*, 1998). Ficolin- α bindet, wie andere Plasmaficoline auch, an Elastin (Harumiya *et al.* 1996) sowie GlcNac-abhängig an *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotyp 5 (APP5) (Brooks *et al.*, 2003a). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass aus Serum extrahiertes Ficolin- α an LPS gramnegativer Bakterien, wie *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. abortus equi*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, und *Serratia marcescens* aber auch an LTS grampositiver Bakterien, wie *Streptococcus sanguis*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes* und *Staphylococcus aureus* bindet (Nahid *et al.*, 2006).

Kürzlich konnte zum ersten Mal die Bindung von Ficolinen an Viren nachgewiesen werden. Sowohl rekombinantes, als auch aus Plasma gereinigtes Ficolin- α bindet GlcNac-abhängig an das *porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV) (Keirstead *et al.*, 2008).

Ficolin- β besitzt ein Molekulargewicht von 39 kD pro Untereinheit und wurde in neutrophilen Zellen sowohl im Zytoplasma als auch membranständig vorgefunden. Wurden die Neutrophilen stimuliert, kam es zur Sekretion von Ficolin- β , zusammen mit weiteren antimikrobiellen Substanzen, wodurch angenommen werden kann, dass Ficolin- β als PRM eine Rolle in der lokalen Abwehr von Erregern spielt. In aus Blut gewonnenen Monozyten (*peripheral blood monocytes*, PBM) und in Thrombozyten konnte es nicht nachgewiesen werden (Brooks *et al.*, 2003b).

I.3.1.2 Ficoline des Menschen

Insgesamt konnten im Menschen drei verschiedene Ficoline nachgewiesen werden: M-Ficolin (auch bekannt als Ficolin-1 oder Ficolin/P53-related protein), L-Ficolin (auch bekannt als Ficolin-2, Ficolin/P35, EBP-37 oder Hucolin) und H-Ficolin (auch bekannt als Hakata-Antigen, Ficolin-3 oder thermolabiles β -2 Makroglycoprotein). Da L-Ficolin, wie oben ausgeführt, aus einer Duplikation des M-Ficolingens hervorging, besteht eine 75-prozentige Übereinstimmung zwischen den Aminosäuresequenzen der beiden Proteine. Hingegen beträgt die Übereinstimmung zwischen M-Ficolin und H-Ficolin nur 48%, was mit der frühen Abspaltung der H-Ficolin-Linie erklärbar ist (Ohashi *et al.*, 2004) (Endo *et al.*, 2004).

M-Ficolin wurde 1996 entdeckt und sein Gen konnte auf Chromosom 9 lokalisiert werden (Lu *et al.*, 1996). Der Hauptsyntheseort sind Leukozyten. Aus Westernblotuntersuchungen ging hervor, dass es aus einem Tetramer von Dreieruntereinheiten besteht, wobei eine Polypeptidkette ein Molekulargewicht von ungefähr 37 kD besitzt (Frederiksen *et al.*, 2005). Bei der Untersuchung verschiedener Leukozytenlinien konnte gezeigt werden, dass seine mRNA in Monozyten des Blutes gebildet wird. Auch in der Monozyten-ähnlichen Zelllinie U937 konnte eine Expression belegt werden, die jedoch sistiert, wenn die Zellen zu Makrophagen ausreifen (Lu *et al.*, 1996). Zwar fehlt M-Ficolin eine typische Transmembrandomäne, doch konnte es mittels Durchfluszytometrie auch auf der Oberfläche von Monozyten und U937-Zellen nachgewiesen werden (Teh *et al.*, 2000). Darüber hinaus wurde M-Ficolin in Granula von Monozyten, Neutrophilen und Typ II Alveolarzellen der Lunge entdeckt, was die Vermutung nahe legte, dass es sich bei M-Ficolin um ein Akutphasenprotein handelt, dass am Ort der Entzündung sezerniert wird (Liu *et al.*, 2005b). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass M-Ficolin tatsächlich von Makrophagen, nicht aber von dendritischen Zellen, sezerniert wird und vermutlich doch in humanem Serum vorkommt (Honoré *et al.*, 2008). Durch Messung der mRNA-Expression in Monozyten und Makrophagen erkannte man, dass die M-Ficolin-Expression während des Reifungsprozesses abnimmt und ein starker Stimulus durch Bakterienbestandteile nötig ist, um die Expression der reifen Makrophagen wieder zu steigern (Frankenberger *et al.*, 2008).

M-Ficolin bindet an acetylierte Kohlenhydrate und Nicht-Kohlenhydrate wie GlcNAc, ManNAc, GalNAc, Acetylcholine und SiaLacNAc-BSA, wobei die Bindung an GlcNAc mit am stärksten ist (Frederiksen *et al.*, 2005) (Liu *et al.*, 2005b). Es konnte auch direkt eine Bindung an Bakterien gezeigt werden. So bindet es schwach an glatte Stämme (LT2) von *Staphylococcus aureus*, während keine Bindung an raue Stämme (TV119) stattfindet (Liu *et al.*, 2005b).

In Studien mit rekombinantem M-Ficolin konnte eine Komplexbildung mit MASP-2 und eine daraus resultierende Spaltung des Komplementfaktors C4 nachgewiesen werden (Frederiksen *et al.*, 2005). Neben einer Rolle als Komplementfaktor, wird für M-Ficolin auch eine Funktion als Phagozytoserezeptor angenommen. Zum Beispiel kann die Phagozytose von *Escherischia coli* (K12) durch U937-Monozytenvorläuferzellen mit anti-M-fbg-Antikörper gehemmt werden (Teh *et al.*, 2000).

L-Ficolin wurde ebenfalls 1996 entdeckt und sein Gen ist wie das M-Ficolingen auf Chromosom 9 gelegen (Matsushita *et al.*, 1996). Da beide eine ähnliche Exon-Intron-Stuktur besitzen und sich die Primärstruktur der beiden Proteine stark gleicht (s.o.), wird eine Genduplikation vermutet. Für die Molekularmasse von L-Ficolin aus menschlichem Plasma wurde durch Chromatographie ein Wert von ungefähr 650 kD ermittelt (Krarup *et al.*, 2004). L-Ficolin wird hauptsächlich in der Leber produziert. Dabei liegt der mediane Plasmagehalt des Proteins in gesunden Menschen bei ca. 4,1 µg/ml und schwankt zwischen 1 und 7 µg/ml (Le *et al.*, 1998).

L-Ficolin bindet spezifisch an Acetylgruppen, besonders an Zuckern (GlcNAc, GalNAc), aber auch an Nichtkohlenhydraten (N-Acetylglycin, Acetylcholin), wodurch die Einteilung von L-Ficolin in die Gruppe der Lektine, wie im Fall des M-Ficolins in Frage gestellt werden kann (Krarup *et al.*, 2004) (Krarup *et al.*, 2008). Eine physiologische Relevanz von L-Ficolin ist wahrscheinlich, da es an bekapselte Stämme von *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pneumoniae* bindet, nicht jedoch an unbekapselte. Allerdings konnte keine einheitliche Struktur unter den *S. pneumoniae*-Stämmen ermittelt werden, an denen die Bindung von L-Ficolin wahrscheinlich erfolgt (Krarup *et al.*, 2005). Es bindet zudem an LTS von *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* und *Bacillus subtilis* und löst im Komplex mit MASP-2 die Spaltung von C4 und damit die Aktivierung des Komplementsystems aus (Lynch *et al.*, 2004). Die Aktivierung des Komplementsystems konnte auch über den Verbrauch von C4 bei Bindung von L-Ficolin/MASP-Komplexen an Bakterienstämmen der Typ B Streptokokken (Ib, III-2 und III-3 und V) gezeigt werden. Auch ließ sich feststellen, dass die Bindung von L-Ficolin an diese Bakterienstämmen abnimmt, wenn den Kapselpolysacchariden N-Acetylneuraminsäure (NeuNAc) entfernt wurde (Aoyagi *et al.*, 2008).

Am Bakterium *Salmonella typhimurium* (TV119) konnte die verstärkende Wirkung des Ficolins auf die Phagozytose durch Neutrophile und Monozyten ermittelt werden und auch ein Aktivierung des Komplementsystems gezeigt werden. Angenommen wird, dass die Kollagendomäne als Opsonin wirkt (Matsushita *et al.*, 1996) (Matsushita *et al.*, 2000).

Außerdem bindet L-Ficolin an apoptotische Zellen und vermittelt über eine Aktivierung des Komplementsystems einen Abbau dieser Zellen (Kuraya *et al.*, 2005).

H-Ficolin wurde schon 1990 als Serumprotein identifiziert, gegen das Systemische Lupus Erythematosus-Patienten Auto-Antikörper bilden (Inaba *et al.*, 1990). Das Gen befindet sich auf Chromosom 1 und codiert für 299 Aminosäuren (Sugimoto *et al.*, 1998).

Mit Hilfe der SDS-PAGE-Chromatographie wurde die Molekularmasse einer Polypeptidkette auf 35 kDa geschätzt. Das Protein kommt mit einer Serumkonzentration von 7-23 µg/ml in gesunden Populationen vor und bildet Monopolymere, wobei Uneinigkeit besteht ob sie gewöhnlich aus 12 oder 18 Untereinheiten gebildet werden (Sugimoto *et al.*, 1998) (Ohashi *et al.*, 1998).

Die Bildung von H-Ficolin findet in Hepatozyten und Gallengangsepithelzellen der Leber und in Epithelzellen der Bronchien und Alveolen der Lunge statt (Akaiwa *et al.*, 1999). Es bindet LPS von *Streptococcus typhimurium* und *Streptococcus minnesota*, wobei die Bindung durch GalNAc und GlcNAc gehemmt werden kann (Sugimoto *et al.*, 1998).

Darüber hinaus konnte die Bindung von H-Ficolin an *Aerococcus viridans*, genauer an das Polysaccharid PSA (Polysaccharid A. viridans), belegt werden, ein Umweltkeim, der für keine schwerwiegenden Infektionen verantwortlich gemacht wird (Matsushita *et al.*, 2002). Über eine Bindung der verschiedenen MASPs kann das Hakata-Antigen C4 spalten und die Komplementkaskade aktivieren (Matsushita *et al.*, 2002). Zudem konnte gezeigt werden, dass H-Ficolin an Zellen, die sich in einer späten Phase der Apoptose befinden, bindet und die Phagozytose durch Makrophagen steigert (Honoré *et al.*, 2007).

I.3.1.3 Ficoline in Mäusen

In Mäusen, sowie auch in Ratten kommen zwei verschiedene Ficollintypen vor: Ficolin-A und Ficolin-B.

Das **Ficolin-A**-Gen wurde 1998 in der Gendatenbank einer Mäuseleber entdeckt und auf Chromosom 2 lokalisiert (Fujimori *et al.*, 1998).

Das Protein besteht aus ungefähr 36 kD schweren Polypeptidketten, bindet an Elastin und GlcNAc und wird stark in Leber und Milz exprimiert (Fujimori *et al.*, 1998).

Untersuchungen über die Expression von Ficolin-A während der embryonalen Entwicklung zeigten, dass Ficolin-A schon früh in der Leber exprimiert wird (schon 12 Tage nach Kopulation) und die Bildung der mRNA auch bis zur Geburt ansteigt, um im Anschluss leicht abzusinken (Liu *et al.*, 2005a).

Durch Studien mit *in-situ*-Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass Ficolin-A eine ähnliche Gewebeverteilung in Leber und Milz aufweist, wie Kupfferzellen und Milzmakrophagen, was vermuten lässt, das Ficolin-A von Makrophagen gebildet wird (Liu *et al.*, 2005a).

Die Expression von **Ficolin-B** wurde zuerst 1998 von Ohashi und Erickson untersucht. Sie zeigten, dass Ficolin-B mRNA stark im Knochenmark, aber auch in geringerem Maße in der Milz gebildet wird (Ohashi *et al.*, 1998), wobei während der Embryonalentwicklung von Liu und Mitarbeitern sogar eine Expression in der Leber gezeigt werden konnte (Liu *et al.*, 2005a).

Eine genauere Untersuchung, welche Zelllinien im Knochenmark Ficolin-B exprimieren, ließ erkennen, dass die mRNA stark in Zellen der myeloiden Zellreihe (Gr-1^+ und Mac-1^+), nicht aber in T-Zell- (CD3e^+), B-Zell-Linien (B220^+), bzw. in Zellen der Erythropoese (Ter119^+) exprimiert wird (Liu *et al.*, 2005a).

Ficolin-B bindet an GlcNAc, GalNAc und SiaLacNAc und Fetuin, wobei ermittelt werden konnte, dass Ficolin-B bei den beiden letztgenannten an N-Acetyl-Neuraminsäure bindet (Endo *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu den humanen Ficolinen und Ficolin-A, konnte bisher keine Komplementaktivierung durch Ficolin-B gesehen werden. Nachgewiesen wurde vielmehr, dass rekombinantes Ficolin-B nicht an MASP-2 bindet (Endo *et al.*, 2005). Vermutlich liegt dies an dem Einbau von Glutamat, statt Methionin wie bei Ficolin-A, im Bereich der MASP-2 Bindungssequenz (Girija *et al.*, 2007).

Wie oben dargestellt, wird M-Ficolin als Ortholog zu Ficolin-B angesehen (Endo *et al.*, 2004). Eine vor kurzem durchgeführte Studie konnte erstmals Ficolin-B auf Proteinniveau nachweisen und zeigen, dass Ficolin-B in Peritonealmakrophagen gebildet und in Lysosomen und späten Endosomen gespeichert wird, aber wohl nicht auf der Zelloberfläche exprimiert wird (Runza *et al.*, 2006).

1.3.1.4 Klinische Bedeutung erniedrigter Ficolin-Spiegel beim Menschen

Bisher wurden für Ficoline noch keine klinisch wichtigen Mangelzustände beschrieben. Zwar wurde in Studien nachgewiesen, dass bei L-Ficolin verschiedenen Polymorphismen des Gens existieren, die auch Einfluss auf den Serumspiegel oder die Bindungsaffinität zu N-Acetyl-D-Glucosamin haben (Hummelholz *et al.*, 2005) (Herpes *et al.*, 2005), allerdings sind die individuellen Schwankungen der Ficolinspiegel viel geringer als zum Beispiel beim MBL. Ein Zusammenhang zwischen der Anfälligkeit für Infektionen, zum Beispiel nach Chemotherapien, und einem erniedrigtem Ficolinserumspiegel konnte nicht gezeigt werden (Kilpatrick *et al.*, 2003). In einer weiteren klinischen Studie ließ sich ebenfalls kein

Zusammenhang zwischen verschiedenen L-Ficolin-Polymorphismen und einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Infektionen mit Pneumokokken zeigen (Chapman et.al., 2007). Einzig bei Kindern mit rezidivierenden, respiratorischen Infekten und gleichzeitig ausgeprägter Atopie, wurde von einem Zusammenhang mit erniedrigten L- Ficolinspiegeln berichtet (Atkinson et al., 2004).

I.3.2 Collectine

Von allen Collectinen ist das MBL am besten untersucht. Es besitzt die typische Collectinstruktur, bestehend aus seiner N-terminalen Cystein-reichen Domäne, gefolgt von einer kollagenartigen Domäne mit Knick, einer Halsregion und einer C-type CRD. Meist vier, aber auch mehr oder weniger Dreieruntereinheiten bilden ein Oligomer, welches die Form eines Tulpenstraußes einnimmt (Turner *et al.*, 2000).

Während im Menschen nur ein MBL gebildet wird, kommen in Mäusen zwei verschiedene (MBL-A und MBL-C) vor (Hansen *et al.*, 2000). Hauptsyntheseort von MBL ist die Leber (Lu et al., 2002). Es bindet an Monosaccharide (Mannose, GlcNAc), sowie an LPS und LTS gramnegativer bzw. grampositiver Bakterien (Holmskov *et al.*, 2003). Durch Bindung der MASP kann MBL über den Lektinweg Komplement aktivieren (Lu *et al.*, 2002).

Die Surfactantproteine SP-A und SP-D werden hauptsächlich in Typ II Alveolarzellen gebildet. Ursprünglich wurde angenommen, dass ihre alleinige Funktion die Herabsetzung der Oberflächenspannung in den Alveolen wäre. Heute weiß man, dass sie als Opsonine wirken, über Bindung an C1q-Rezeptoren die Phagozytose bestimmter Bakterien steigern, aber auch Antigene neutralisieren können und einen modulierenden Einfluss auf die Inflammation der Lunge besitzen (Lu *et al.*, 2002) (Kuroki *et al.*, 2007).

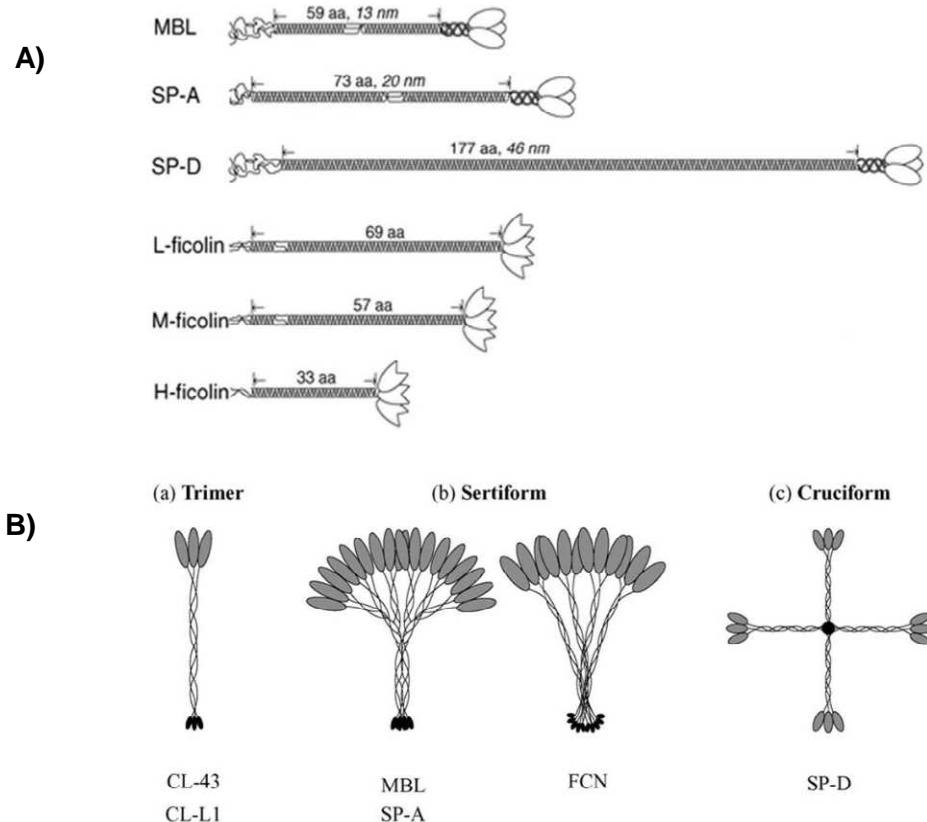


Abbildung I.5: Struktur verschiedener Lektine

A) Der Aufbau der Untereinheit menschlicher Collectine und Ficoline Die Moleküle wurden im Verhältnis zu ihrer wahren Größe gezeichnet, wobei die Fbg-Domäne als globuläre Struktur gezeichnet wurden.

B) Struktur verschiedener Oligomere, wie a) CL-L1 und CL-43 (die Untereinheit bleibt für sich allein), b) MBL, SP-A und Ficoline (Oligomer aus unterschiedlicher Anzahl von Untereinheiten, die eine Tulpenstraußform bilden) und c) SP-D (gebildet aus 4 Untereinheiten, die ein Kreuz bilden) (Lillie et al., 2005)

I.4 Zellen des angeborenen Immunsystems

Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems zählen Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen, Lymphozyten, Mastzellen und natürliche Killerzellen. Alle hämatopoetischen Zellen stammen von pluripotenten Stammzellen (*hematopoietic stem cell*, HSC) im Knochenmark ab. Unter dem Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren kommt es zur Bildung von lymphoiden und myeloisch-erythrozytären Vorläuferzellen. Aus letzterer entwickelt sich schließlich die myeloische Vorläuferzelle, der Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen und dendritische Zellen entspringen (Janeway, 2008).

Obwohl alle drei Zelltypen in der Lage sind zu phagozytieren, verfolgen alle unterschiedliche Zielsetzungen. Dendritische Zellen phagozytieren kleine Mengen Antigene, um sie

anschließend den Zellen des adaptiven Immunsystems zu präsentieren und dieses mitzuaktivieren (Janeway, 2008).

Makrophagen und Neutrophile werden auch als Phagozyten bezeichnet, da die Phagozytose großer Mengen Pathogene zu ihren Hauptaufgaben gehört. Während Makrophagen jedoch in der Lage sind, ihre Granula zu regenerieren und die internalisierten Antigene auch auf MHC II Komplexen zu präsentieren, ist die Lebensdauer der Neutrophilen im Gewebe nur äußerst gering und sie präsentieren Antigene nur, wie alle kernhaltigen Zellen, über MHC I (Dale *et al.*, 2008).

I.4.1 Dendritische Zellen

Bei den dendritischen Zellen (DC) handelt es sich um eine sehr heterogene Zellgruppe, die sich in Morphologie, Funktion und Phänotyp unterscheidet, wobei selbst eine einzelne dendritische Zelle im Lauf ihres Lebens diese Eigenschaften ändert.

Dendritische Zellen können sich *in vitro* zum einen unter dem Einfluss von Endothelzellen (Randolph *et al.*, 1998) oder durch Stimulierung mit GM-CSF und IL-4 aus Monozyten entwickeln (Sallusto *et al.*, 1995), sich aber auch unter dem Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren, so zum Beispiel GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor) aus Vorläuferzellen im Knochenmark entwickeln (Lutz *et al.*, 1999) (Keller, 2001).

Sie gelangen über den Blutweg ins Gewebe, wo sie als unreife DCs verweilen. Am bekanntesten sind hierbei die Langerhanszellen der Epidermis. Erhalten sie dort Kontakt mit Antigenen, nehmen sie diese auf und wandern über die Lymphbahnen in das nächste drainierende Lymphorgan, zumeist ein Lymphknoten, ab. Währenddessen entwickeln sie sich zu reifen DCs. Im Lymphknoten treten sie im Parakortex in Kontakt mit T-Zellen und präsentieren ihr prozessiertes Antigen. Im Anschluss werden die meisten DCs apoptotisch (Keller, 2001).

Unreife DCs sind spezialisiert auf die Aufnahme von Antigenen. Dazu exprimieren sie eine große Anzahl verschiedenener unspezifischer Antigenrezeptoren, darunter einige C-Typ Lektin-Rezeptoren (CTLR), wie Langerin (Valladeau *et al.*, 2000) oder den Mannose-Rezeptor, der Antigenpräsentation auf MHC II ermöglicht (Sallusto *et al.*, 1995). Typisch für DCs sind aber auch Fc γ - und Komplementrezeptoren (Rescigno *et al.*, 2000). Außerdem können sie über av β 5-Integrin und CD36 apoptotische Zellen erkennen und phagozytieren (Albert *et al.*, 1998).

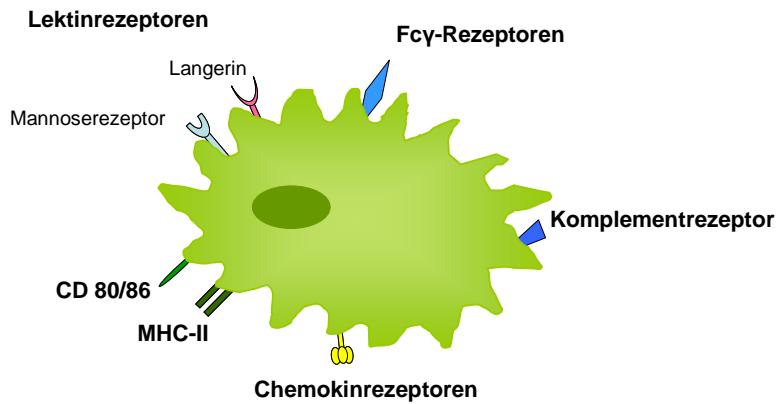


Abbildung I.6: Rezeptoren auf dendritischen Zellen (DCs)

Dendritische Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche Lektinrezeptoren, wie den Mannoserezeptor und Langerin, zur Steigerung der Phagozytose Fcy-Rezeptoren und Komplementrezeptoren, außerdem Chemokinrezeptoren. Reife dendritische Zellen exprimieren im erhöhten Maße MHC-II und CD 80/86 (Sallusto *et al.*, 1995) (Rescigno *et al.*, 2000) (Valladeau *et al.*, 2000).

Die Entwicklung zu reifen DCs wird unter anderem über den Pathogenkontakt oder proinflammatorischer Zytokine eingeleitet und hat sowohl Auswirkungen auf die Funktion, als auch auf den Phänotyp der DCs. So sinkt die Fähigkeit der DCs Antigene aufzunehmen; gleichzeitig werden vermehrt Peptide auf MHC-Molekülen präsentiert. Zudem kommt es zur Expression der kostimulatorischen Moleküle, wie CD80/86 und CD40, die für die spätere Aktivierung der T-Zellen essentiell sind (Keller, 2001). Im Lymphorgan findet schließlich die Interaktion mit naiven T-Zellen statt, wobei sich beide Zellarten gegenseitig beeinflussen. So aktivieren T-Lymphozyten über den CD40L/CD40 Singalweg DCs und steigern die Expression kostimulatorischer Moleküle und die Sekretion von Zytokinen (van Kooten *et al.*, 1996). Gleichzeitig kommt es zur Aktivierung von T-Helferzellen über den T-Zellrezeptor/MHC-Komplex und je nach Unterart der dendritischen Zelle, vor allem aber je nach Reifungsgrad der DC und der Zytokine in der Umgebung, kommt es zur Förderung des Th₁-oder Th₂-Weges (Keller, 2001). So wird zum Beispiel die Th1-Antwort durch IL-12 und IFN- α gefördert (Cella *et al.*, 2000).

I.4.2 Monozyten/ Makrophagen

Monozyten gelangen über den Blutweg in ihre Zielorgane. Diese sind neben allen Lymphorganen, unter anderem Submucosa, Leber und Lunge. Dort verharren sie als inaktive Makrophagen, die nur in geringen Mengen MHC II und keine kostimulatorischen Oberflächenmoleküle exprimieren. Zu ihren Aufgaben gehören die Phagozytose von Pathogenen, von alten Körperzellen (wie Erythrozyten) und Zelldebris, die Präsentation von Antigenen und die Modulation des Immunsystems (Janeway, 2008).

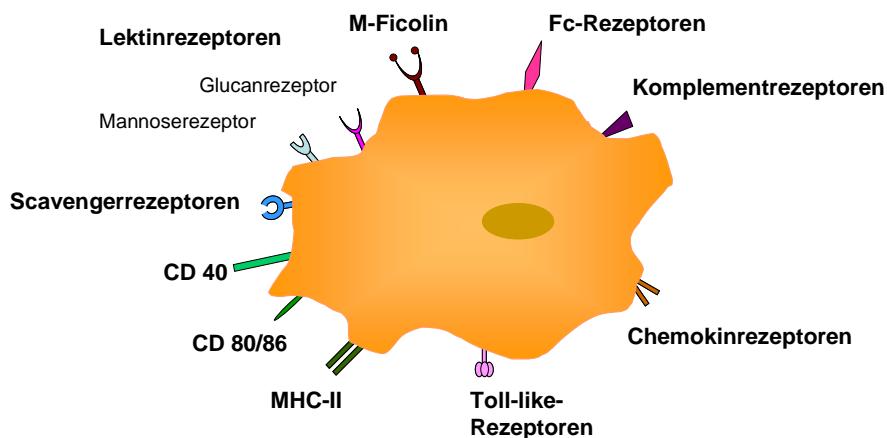


Abbildung I.7: Rezeptorstatus und Oberflächenmoleküle von Makrophagen/ Monozyten

Makrophagen/ Monozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche für die Erkennung von Pathogenen Lektinrezeptoren, wie Mannose- und Glucanrezeptoren, Scavengerrezeptoren und Toll-like-Rezeptoren, sowie Fc- und Komplementrezeptoren. Chemokinrezeptoren locken Monozyten an den Ort der Entzündung und über MHC-II und CD80/86 werden T-Zellen aktiviert (Teh et al., 2000) (Linehan et al., 2002) (Kawamoto et al., 2004) (Dale et al., 2008).

Makrophagen exprimieren eine Vielzahl von Rezeptoren. Zum einen PRR, wie Scavenger-Rezeptoren und Lektinrezeptoren, wie den Dectin-1-Rezeptor, der β -Glucan bindet, Mannose-Rezeptoren, aber auch Rezeptoren, die bereits opsonierte Pathogene erkennen. So unter anderem Fc-Rezeptoren und den Komplementrezeptor CR1 (Kawamoto et al., 2004) (Linehan et al., 2002). Darüber hinaus kommt es durch Ligandenbindung an Toll-like-Rezeptoren zur Aktivierung des NF κ B-Signalweges (Dale et al., 2008). Das Anlocken weiterer Makrophagen aus der Umgebung, bzw. von Monozyten aus der Zirkulation gelingt über verschiedene Chemokinrezeptoren, wie CC- und CXC-Rezeptoren, oder den C3a-Komplementrezeptor. Adhäsionsmoleküle wie β -Integrin sorgen für die nötige Bindung an Endothelzellen während der Diapedese (Kawamoto et al., 2004). Auch M-Ficolin konnte auf

der Oberfläche humaner Monozyten nachgewiesen werden (Teh et al., 2000), sowie Ficolin-B in Lysosomen muriner Peritonealmakrophagen (Runza et al., 2006).

Über MHC-II/T-Zellrezeptorbindungen werden naive T-Zellen aktiviert (siehe I.1), aber auch aktivierte Th₁-Zellen können über Zellkontakte und IFN-γ Makrophagen aktivieren, so dass sich deren Phagozytosefähigkeit erhöht und die Expression von MHC-II, CD40, CD80/86 und der induzierbaren NO-Synthetase ansteigt (Janeway, 2008).

I.4.3 Neutrophile Zellen

Die neutrophilen Zellen stellen alleine ca. 60% der Blutleukozyten. Allerdings besitzen sie mit ungefähr 7 Stunden eine sehr kurz Halbwertszeit im Blut, woraus der sehr hohe periphere Umsatz der Granulozyten resultiert (Handin et al., 2003) (Kawamoto et al., 2004).

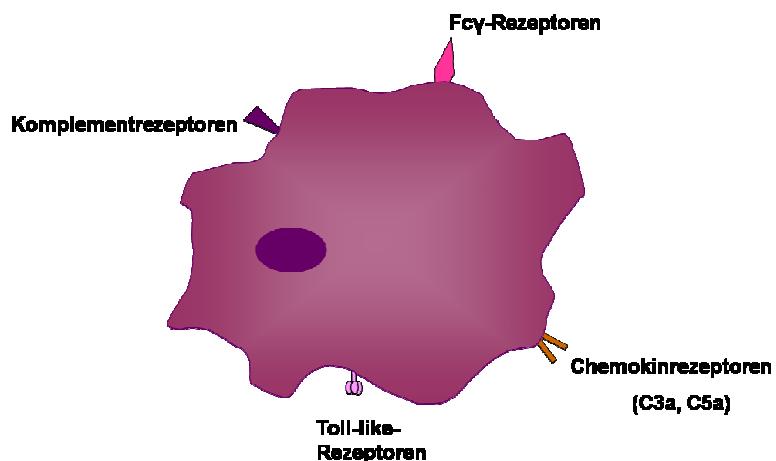


Abbildung I.8: Rezeptorstatus von neutrophilen Zellen

Um ihre Funktion als Phagozyten erfüllen zu können, exprimieren neutrophile Zellen Chemokinrezeptoren mit deren Hilfe sie an den Ort der Entzündung zu gelangen. Außerdem erleichtern Fcγ-Rezeptoren und Komplementrezeptoren die Phagozytose von Pathogenen und über Toll-like-Rezeptoren kommt es zur Aktivierung des NF-κB-Signalweges (Hayashi et al., 2003) (Dale et al., 2008).

Zu ihren Hauptaufgaben gehören die Phagozytose von Pathogenen und das Abtöten von Erregern. Angelockt von verschiedenen Chemokinen wandern sie aus dem Blut in das entzündete Gewebe und phagozytieren dort Krankheitserreger bzw. zerstören sie mit Hilfe der von ihnen produzierten Radikale (siehe I.1). Anschließend gehen sie in Apoptose (Janeway, 2008) (Nathan et al., 2006).

Um diese Funktionen erfüllen zu können, besitzen sie eine Vielzahl an Oberflächlichenrezeptoren, z.B. für Lipidmediatoren wie den Plättchen-aktivierenden Faktor

(PAF) und Leukotrien-4 oder C3a- und C5a-Komplementfragmente. Wie Makrophagen besitzen sie Adhäsionsmoleküle (Integrine und Selektine), die für die Adhäsion an das Endothel und für die Diapedese essentiell sind. Opsonierte Antigene können sie über Fc- und Komplementrezeptoren erkennen und somit schneller phagozytieren (Dale *et al.*, 2008). In den Granula humaner neutrophiler Zellen konnte auch M-Ficolin-Protein nachgewiesen werden (Liu *et al.*, 2005b). Da sie ihre Granula nicht regenerieren können, sind sie nur kurze Zeit in der Lage Pathogene zu zerstören. (Dale *et al.*, 2008).

I.5 Ziel der Arbeit

Bei Voruntersuchungen wurden aus Knochenmarkzellen generierte Makrophagen, dendritische Zellen sowie ER-Hoxb8 Neutrophile positiv auf Ficolin-B mRNA-Expression getestet (siehe Abbildung I. 9). Ziel der Arbeit war es, die mRNA-Expression während Differenzierung, Reifung und Stimulierung dieser Immunzellen quantitativ mittels real-time-PCR zu untersuchen.



Abbildung I.9: Expression von Ficolin-B mRNA in verschiedenen Zellreihen

Zellen der verschiedenen Zellreihen wurden lysiert, RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Eine Standard-PCR wurde mit Ficolin-B ATG/STOP-Primern durchgeführt. Die Amplifizierungsprodukte wurden auf ein 1-prozentiges Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetragen. MΦ, Makrophagen; DC, dendritische Zellen; KM, Knochenmark; PMN, Polymorphkernige Neutrophile (ER Hoxb8-Neutrophile).

II Material und Methoden

II.1 Material

II.1.1 Chemikalien, Lösungen and Medien

Agarose	Peqlab, Erlangen
BSA	PAN Biotech, Aidenbach
CpG	Metabion, Matinsried
DAPI	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DEPC	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DMSO	Sigma, Deisenhofen
6 x DNA-Ladepuffer	New England BioLabs, Frankfurt-Höchst
DNA-Molekulargewicht-Standards X and XIV	New England BioLabs, Frankfurt-Höchst
EDTA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Promega, Madison, USA
FCS, fetales Kälberserum	PAN Biotech, Aidenbach
fMLP	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Formaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Glutamin	PAN Biotech, Aidenbach
GpG	Metabion, Matinsried
H2O (deionisiert)	Milli Q UF Plus System
HEPES	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
IgG von Mausserum	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
LPS <i>Escherischia coli</i>	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
LPS <i>Salmonella abortus equi</i>	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
6 x Mass Ruler Loading Dye	Fermentas, St. Leon-Rot
MOPS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
nukleasefreies Wasser	Promega, Madison, USA
Opti-MEM® mit GlutaMAX™	Invitrogen, Carlsbad, USA
PBS	PAA, Pasching, Österreich
Penicillin/ Streptomycin	PAA, Pasching, Österreich
PFA (Paraformaldehyd)	Merck, Darmstadt
PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Aacetat)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

RNaseZAP	Sigam-Aldrich, Deisenhofen
RPMI-1640	PAN Biotech, Aidenbach
β-Estradiol	Sigma, Deisenhofen
β-Mercaptoethanol für Molekularbiologie	Sigma, Deisenhofen
β-Mercaptoethanol für Zellkultur	Invitrogen, Carlsbad, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypsin	PAN Biotech, Aidenbach
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
alle anderen Chemikalien und Lösungen	Sigma-Aldrich oder Merck

II.1.2 Verbrauchsmaterial und Geräte

Begasungsbrutschrank, Cell Safe	Integra Biosciences, Baar, Schweiz
Digitalkamera ColorView I	Olympus, Hamburg
ELISA Reader	Perkin Elmer, Waltham, USA
Eppendorfcups	Eppendorf, Hamburg
FACS ARIA Durchflusszytometer	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS LSR II Flow Cytometer	BD Bioscience, San Jose, USA
FACS Röhrchen	Sartstedt, Nümbrecht
Fusion™ Universal Microplate Reader	Packard Bioscience, Meriden, USA
Gelelektrophoreseapparaturen	Biorad, München
Gene Genius <i>Bioimaging</i> System	Syngene, Cambridge, UK
iQ5 Real Time Detection System	Biorad, München
Mikroskop (Diaplan Fotomikroskop)	Leica, Wetzlar
Mikroskop (Zellkultur)	Olympus, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Brand, Gießen
PCR Thermocycler, MyCycler	Biorad, München
Photometer, BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (mit Filter)	Abimed, Langenfeld
Pipettenspitzen (ohne Filter)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 5, 10, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettierhilfe, Accu-jet pro	Braun, Melsungen
Polypropylenröhrenchen	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilbank, HERAsafe ® KS	Hereaus, Hanau

Ultraschallbad	Bandelin, Berlin
Vortexer, MS2 Minishaker	IKA Works, Wilmington, USA
Waage, Mettler PJ400	Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz
Wasserbad, Thermomix BU	Braun, Melsungen
Zellkulturflaschen	BD Falcon, San Jose, USA
Zellkulturschalen	BD Bioscience, San Jose, USA
Zellkulturschalen und -platten	BD Falcon, Durham, USA
Zellsiebe:	
Zellsieb 0,20 µm	Sartorius, Göttingen
Zellsieb 0,45 µm	Pall, New York, USA
Zellsieb 0,80 µm	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen:	
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Shandon Cytospin® 4	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

II.1.3 Kits

RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAshredder Kit	Qiagen, Hilden
EndoFree Plamid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Fugene ® Transfection Reagent	Roche, Mannheim
DOTAP Liposomal Transfection Reagent	Roche, Mannheim
Dual-Glo® Luciferase Assay	Promega, Madison, USA
DuoSet Elisa Development Kit	R & D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt

II.1.4 Master Mix

GoTaq® Green Master Mix	Promega, Madison, USA
2x SensiMix Plus SYBR Kit & Fluorescein	Peqlab, Erlangen

II.1.5 Vektor

pRL-TK Vektor	Promega, Madison, USA
---------------	-----------------------

II.1.6 Nukleinsäuren

Alle Primer die für die PCR verwendet wurden, wurden in einer Konzentration von 100 µM von der Firma Metabion gekauft und bei -20°C gelagert.

Folgende Primer wurden in dieser Arbeit verwendet:

Name	Sequenz
Ficolin-B STOP Rev	5'-CCC CTC GAG CTA GAT GAG CCG CAC CTT CAT C-3'
Ficolin-B ATG Fw	5'-CCC GAA TTC CCA GCC ATG GCC CTG GGA TCT GCT GCA C-3'
Ficolin-B PP4 Rev	5'-GCC GTC ATT GTC TTG GTC TT-3'
Ficolin-B PP4 Fw	5'-TCA TAC AAG AGG GGC TTT GG-3'
18S Rev	5'-CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG-3'
18S Fw	5'-GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT-3'
β-Actin Rev	5'-CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG-3'
β-Actin Fw	5'-GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT-3'
weitere Primer:	
Oligo(dT)15	Promega, Madison, USA

II.1.7 Antikörper

Bezeichnung	Klon	
Anti-Maus MHC-II-FITC	25-9-17	BD Pharmingen
Anti-Maus CD11c-PE	HL3	BD Pharmingen
Anti-Maus CD80 biotiniert	16-10-A1	BD Pharmingen
Anti Maus CD86 biotiniert	Gr-1	BD Pharmingen
Anti-Maus CD11b-PE	M1/70	BD Pharmingen
Anti-Maus CD11b-FITC	M1/70	BD Pharmingen
Anti-Maus F4/80-PerCP	BM-8	Serotec
Anti-Maus Gr-1-FITC		BD Pharmingen
Strept-Alexa 350		Invitrogen
Ratte α Anti-Maus-Fcγ-Rezeptor _{II/III}	2462	Institut für Immunologie, Universität Regensburg

II.1.8 Enzyme und Puffer

M-MLV Reverse Transkriptase
M-MLV Reverse Transkriptase 5 x Puffer

Promega, Madsion, USA
Promega, Madison, USA

II.1.9 Zellen

CHO
transformierte E. coli (Stamm XL-1 blue)
(eingebrachte Vektoren siehe II.2.2.2.3)
ER Hoxb8

L 929

PU5-1.8
RAW 264.7
X 6310

Chinese Hamster Ovary cells (ATCC)
Valeria Runza, Universität Regensburg

Georg Häcker, TU München
Maus-Granulozytenvorläuferzellen
Fibrosarkomzellen, Universität Regensburg,
Institut für Immunologie
Maus-Makrophagen-ähnliche Zellen (ATCC)
Maus-Makrophagen-ähnliche Zellen (ATCC)
Hybridomazellen, Universität Regensburg,
Institut für Immunologie

II.1.10 Mäuse

C57BL/6 Wildtyp

Charles River, Sulzfeld

II.1.11 Software und Datenbanken

Microsoft Exel 2003
WinMDI 2.8
Cell^F Imaging Software
iCycler Analysis Software

Microsoft, Redmond, USA
Freeware
Olympus, Hamburg
Biorad, München

II.2 Methoden

II.2.1 Zellbiologische Methoden

II.2.1.1 Zellkulturbedingungen

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden in einer Sterilbank (Herasafe®) durchgeführt. Alle verwendeten Zelllinien bzw. Primärkulturen wurden in Kulturflaschen mit dem angegebenen Medium bei 37 °C, 5% CO₂-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit in einem Begasungsbrutschrank kultiviert. Falls nicht anders angegeben, wurden die Zellkulturen dreimal wöchentlich im Verhältnis 1:5 passagiert. Medienwechsel oder Waschschrifte wurden ausgeführt, indem die Zellen in sterilen Falconrörchen 7-10 min bei 300 x g zentrifugiert und anschließend das Zellpellet in der entsprechenden Lösung resuspendiert wurde.

II.2.1.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl, wurden die lebenden Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Dazu wurde eine Zellsuspension mit einer passenden Menge Trypanblaulösung 0,5-prozentig versetzt (meist im Verhältnis 1:7) und aufgetragen. Tote Zellen erschienen durch den in das Zytosol eindringenden Farbstoff blau und konnten so von vitalen, transparenten Zellen unterschieden werden.

II.2.1.3 Mykoplasmentest

In regelmäßigen Abständen wurden sämtliche Zelllinien mit Hilfe einer DAPI Färbung fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Nicht-kontaminierte Zellen zeigten nur eine Färbung des Kerns, wohingegen eine Kontamination mit Mykoplasmen durch eine starke Färbung des Cytosols, verursacht durch die DNA der Bakterien, ersichtlich war.

CHO - Medium	Optimiert + 1% Pen/Strep + 10 % FCS + 30 µM β-Mercaptoethanol
BMDC - Medium	RPMI + 10 % FCS + 50 µM β-Mercaptoethanol + 2 mM Glutamin + 100 U/ml Pen/Strep + 10 ml GM-CSF-Überstand
BMM - Medium	RPMI + 10 % FCS + 50 µM β-Mercaptoethanol + 2 mM Glutamin + 100 U/ml Pen/Strep + 10 ml M-CSF-Überstand
Hoxb8 – Medium	Opti-MEM mit GlutaMAX + 1% Pen/Strep + 10 % FCS + 30 µM β-Mercaptoethanol + SCF-Überstand 1:25 (+1 µM β-Estradiol)
Medium für L 929, PU5-1.8, RAW 264.7 Und X 6310	RPMI + 10 % FCS + 0,1 % Gentamycin

Tabelle II.1: verwendet Nähmedien

II.2.1.4 Präparation von Zellen aus Mäusen

II.2.1.4.1 Knochenmarkzellen

Die Extraktion von Knochenmarkzellen erfolgte nach Lutz *et al* (Lutz *et al.*, 1999). Die Maus wurde durch Genickbruch getötet und mit 70-prozentigem Ethanol desinfiziert. Tibia und Femur der Maus wurden vollständig heraus präpariert, 2 min in 70-prozentigem Ethanol eingelegt und anschließend mit PBS gewaschen.

Unter sterilen Bedingungen wurden die Knochen an beiden Enden aufgeschnitten, so dass der Knochenmarkskanal frei lag. Mit eisgekühltem PBS wurde das Mark herausgewaschen, bis der Knochen durchsichtig erschien.

Die Zellsuspension wurde anschließend bei 4 °C und 300 x g für 10 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit 20 ml Medium (RPMI mit 10% FCS, 50 µM β-Mercaptoethanol, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin) resuspendiert. Nach einem Waschschritt unter gleichen Bedingungen wurden die Zellen je nach gewünschter weiterer Differenzierung in 5 ml passendem Medium aufgenommen und weiterverarbeitet.

II.2.1.4.2 Parenchymzellen der Milz

Die Maus wurde durch Genickbruch getötet und mit 70-prozentigem Ethanol desinfiziert. Die Milz wurde herauspräpariert und in eisgekühltes Medium (RPMI mit 10% FCS) gelegt. Die weiteren Schritte erfolgten unter einer Sterilbank mit steriles Präparationsbesteck. Überschüssiges Bindegewebe wurde vorsichtig entfernt und die Milz in eine neue Schale mit Medium (10 ml) gelegt. Durch einen kleinen Schnitt an einem Milzpol wurde die Organkapsel eröffnet und die Zellen konnten mit dem stumpfen Ende einer Pinzette herausgestrichen werden. Die bindegewebige Kapsel wurde verworfen und die Zellen durch auf- und abpipettieren mit einer Glaspipette in dem Medium homogenisiert. Die Suspension wurde über ein Siebchen (Maschengröße 40 µm) in ein Falconrörchen überführt und auf ein Gesamtvolumen von 50 ml gebracht. Nach 10-minütiger Zentrifugation (300 x g, 4 °C) wurde der Überstand abgeschüttet. Um die Erythrozyten zu lysieren, wurde das Pellet in 5 ml Erythrozytenlysepuffer (0,17M NH₄Cl, 20 mM HEPES) bei 37 °C resuspendiert und 10 min bei 37 °C inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion mit 20 ml Medium und Zentrifugation (10 min, 300 x g, 4 °C), erfolgte ein erneuter Waschschritt, nach dem die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen wurden.

II.2.1.5 Produktion von Überständen

Zur Herstellung verschiedener Wachstumsfaktoren wurden Zelllinien verwendet, die diese Faktoren an das Nährmedium abgeben. Dazu wurden die Zellen in Kultur gehalten bis der Zellrasen zu ca. 80% konfluent war, der Überstand abgesaugt und mit sterilen Filtern der Porengröße 0,2 µm filtriert. Anschließend wurde der Überstand aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

Folgende Zelllinien und Überstände wurden verwendet:

Zelllinie	Überstand/ Wachstumsfaktor	Quelle
L 929	M-CSF	Waheed <i>et al.</i> , 1979
X 6310	GM-CSF	Ritter <i>et al.</i> , 2003
CHO	SCF	Langley <i>et al.</i> , 1992

II.2.1.6 Produktion der Zellen

II.2.1.6.1 Produktion von Makrophagen aus Knochenmarkzellen (BMM)

Die aus Knochenmark abgeleiteten Makrophagen wurden nach dem Protokoll von Dr. Michael Rehli hergestellt (Rheli *et al.*, 2005). Die Knochenmarkzellen wurden (nach II.2.1.4.1) gewonnen und in BMM-Nährmedium aufgenommen. 10^6 Zellen wurden in 2ml Medium aufgenommen und in einer 6-well-Kulturplatte ausgesät. Nach einem Mediumwechsel am Tag 5, waren die Makrophagen am Tag 6 ausdifferenziert.

II.2.1.6.2 Produktion von dendritischen Zellen aus Knochenmarkzellen (BMDC)

Die aus Knochenmark abgeleiteten dendritischen Zellen wurden nach dem Protokoll von Dr. Manfred Lutz hergestellt (Lutz *et al.*, 1999). Die Knochenmarkzellen wurden (nach II.2.1.4.1) gewonnen und in BMDC-Nährmedium aufgenommen. 10^6 Zellen wurden in 2 ml Medium aufgenommen und in 6-well-Kulturplatten ausgesät. Während am Tag 3 ein Volumen Medium zugegeben wurde, wurde an Tag 6 und 8 jeweils die Hälfte des Mediums abgenommen, der Überstand bei 300 x g für 10 min zentrifugiert und das Pellet im gleichen Volumen frischen Mediums wieder aufgenommen. Für FACS-Analysen wurden 2×10^6

Knochenmarkzellen in 10 ml Medium aufgenommen und in 10 cm-Kulturschalen wie oben beschrieben zur Differenzierung gebracht.

II.2.1.6.3 Produktion der ER Hoxb8-Neutrophilen

Die ER Hoxb8-Neutrophilen wurden nach dem Protokoll von Wang *et al.* produziert (Wang *et al.*, 2006) und mit freundlicher Genehmigung von Dr. Hans Häcker (St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee) hergestellt.

Da es bisher ein großes Problem darstellte ausreichende Mengen an neutrophile Zellen aus Mäusen zu gewinnen, wurde in dieser Arbeit auf das System der Östrogen-abhängigen Hoxb8-Neutrophilen zurückgegriffen, die als Vorläuferzellen in östrogenhaltigem Medium in Kultur gehalten werden können, und in Abwesenheit von Östrogen zu Neutrophilen ausdifferenzieren. Diese Technik wurde durch die Forschungsgruppe um Wang und Calvo etabliert, die in Lineage negativen - Knochenmarkzellen von weiblichen C57BL/6 Mäusen ein Retrovirus einschleusten. Dieser Vektor enthielt neben der Östrogen-bindenden Domäne des Östrogenrezeptors (ERBD) den N-terminalen Transkriptionsfaktor Hoxb8 und ein Flag-Epitop, das über Antikörper nachgewiesen werden konnte und so eine Erkennung der positiven Klone erleichterte (siehe Abbildung II.1).



Abbildung II.1: Aufbau des Flag-ER-Hoxb8 Vektors

Die Östrogenrezeptorbindungsdomäne wurde mit dem N-terminalen Ende von Hoxb8 fusioniert. Zusätzlich wurde N-terminal eine Flag-Erkennungsmarke angehängt.

Enthält das Kulturmedium Estradiol, ist der Hoxb8 Faktor aktiv, der zu den Klasse 1 *Hox home domain* Transkriptionsfaktoren gehört und die Proliferation, nicht aber die Ausreifung von hämatopoetischen Vorläuferzellen anregt. Wird den Zellen hingegen Estradiol entzogen, ist der Transkriptionsfaktor inaktiv und die Zellen differenzieren innerhalb weniger Tage zu Neutrophilen aus (Wang *et al.*, 2006).

Die Zellen wurden, wenn nicht anders beschrieben jeweils 6 min bei 300 x g zentrifugiert.

II.2.1.6.3.1 Auftauen und Einfrieren der Progenitorzellen

Die gefrorenen ER Hoxb8-Vorläuferzellen (4×10^6 Zellen) wurden 5 min im Wasserbad aufgetaut und langsam in 9 ml vorgewärmten Hoxb8-Medium mit Estradiol aufgenommen. Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet in 3 ml Medium resuspendiert und in eine Vertiefung einer 6-well-Platte gegeben. Am nächsten Tag wurde 1ml Medium zugegeben, am dritten Tag wurden die Zellen abzentrifugiert, in 6 ml Medium aufgenommen und je 3 ml in eine Vertiefung einer 6-well-Platte gegeben.

Um Progenitorzellen einzufrieren, wurden die Zellen am Vortag gesplittet. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in estradiolhaltigem Medium aufgenommen und auf Eis gestellt. Nach Zugabe des gleichen Volumens kalten FCS-DMSO (FCS + 20% DMSO + SCF 1:25 und 1 μ M Estradiol) wurden die Zellen aliquotiert, in Kryoröhrchen gefüllt, bei -80 °C tiefgefroren und nach einigen Tagen in flüssigen Stickstoff überführt.

II.2.1.6.3.2 Kultur der Progenitorzellen

Die Vorläuferzellen wurden in 6-well-Platten kultiviert, wobei spätestens alle 48h ein vollständiger Medium- und Plattenwechsel erfolgte. Waren die Zellen schon vorher zu dicht, wurden sie gepoolt, mit 0,5- bis 1-fachen Volumen Medium verdünnt und auf neue Platten ausgesät.

II.2.1.6.3.3 Herstellung von ER Hoxb8-Neutrophilen aus Vorläuferzellen

Dazu wurden die in Kultur befindlichen Vorläuferzellen abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in vorgewärmten PBS-FCS (20 ml PBS + 10% FCS + SCF 1:50) aufgenommen. Nach einem weiteren Waschschritt mit 10 ml PBS-FCS wurde das Pellet in 3ml nunmehr estradiolfreiem Hoxb8-Medium aufgenommen und je 10^6 Zellen in 3 ml Medium auf 6-well-Platten verteilt. Ohne weiteren Mediumwechsel waren die Zellen am Tag 6 zu Neutrophilen ausdifferenziert.

II.2.1.7 Stimulierung der Zellen

II.2.1.7.1 Stimulierung der BMM und BMDC

Zur Stimulierung der Zellen wurde das halbe Volumen Medium abgenommen, der Überstand 10 min bei 300 x g zentrifugiert und das Pellet in gleichem Volumen Medium unter Zugabe von LPS resuspendiert. Dabei wurden die Zellen mit einer Endkonzentration von 100 ng/ml LPS stimuliert (siehe Tab II.1). Um Aggregatbildung zu vermeiden, wurde LPS zuvor für 10 min im Ultraschallbad behandelt (sonofiziert).

II.2.1.7.2 Stimulierung der ER Hoxb8-Neutrophilen

Zur Stimulierung der Zellen wurden die Zellen geerntet und zweimal mit PBS-FCS (PBS + 10% FCS + SCF 1:25) gewaschen (Zentrifugation bei 300 x g, 8 min, 4 °C). Anschließend wurden die Zellen in 5 ml Medium unter Zugabe des Stimulators in der angegebenen Konzentration (siehe Tab. II.1) resuspendiert. Dabei wurde LPS 10 min sonifiziert. Um die aggregierten Antikörper herzustellen, wurde das benötigte Volumen 12 min bei 63 °C erhitzt, anschließend bei 10.000 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und sofort verwendet.

II.2.1.7.3 Stimulierung der PU5-1.8

Zur Stimulierung wurde das Medium zuerst vorsichtig abgesaugt, ohne den adhärenten Zellrasen zu zerstören. Anschließend wurde das gleiche Volumen Medium mit dem jeweiligen Zusatz wieder zugegeben. LPS wurde wie unter II.2.1.7.1 beschrieben vorbehandelt. CpG und GpG lagen als Lyophylisat vor und wurden in nukleasefreiem Wasser gelöst. Die Stimulierung erfolgte für 24 h.

Zellen	Tag der Stimulierung	Stimulierung mit	Konzentration
Makrophagen	Tag 6	LPS <i>S. abortus equi</i>	100 ng/ml
Dendritische Zellen	Tag 7	LPS <i>S. abortus equi</i>	100 ng/ml
ER Hoxb8-Neutrophile	Tag 5	LPS <i>E. coli</i> PMA Ionomycin aggregiertes IgG fMLP (N-Formyl-Met-Leu-Phe)	100 ng/ml 15 ng/ml 1 µM 20 µg/ml 0,1 µM
PU5 1.8		LPS <i>S. abortus equi</i> CpG GpG	100 ng/ml 2 µM 2 µM

Tabelle II.2 : Tag der Stimulierung und Konzentrationen des jeweiligen Stimulators**II.2.1.8 Cytospin und Diff-Quick Färbung**

Um die Morphologie verschiedener Zellen genau beurteilen zu können, wurde mit Hilfe der Shandon Cytospin® 4 Zentrifuge eine einlagige Zellschicht auf einen Objektträger aufgebracht. Dazu wurden ca. 5×10^4 Zellen in 100 µl Medium mit 50-prozentigen FCS-Anteil in den Trichter gegeben und bei 600 U/min 6 min auf den mit weißem Filterpapier belegten Objektträger zentrifugiert. Die Fixation und Färbung der Zellen erfolgte anschließend nach der Diff-Quick Methode. Dazu wurde der Objektträger erst luftgetrocknet und anschließend 10 sec in Diff-Quik Fixationsreagenz, und je 20 sec in Diff-Quik Färbelösung 1 und 2 gehalten. Die Färbung wurde im Anschluss mit Wasser gespült und getrocknet (Zusammensetzungen siehe Anhang A).

II.2.1.9 Mikroskopie

Die Zellen wurden anschließend mit dem Leitz Diaplan Fotomikroskop und der ColorView I Digitalkamera von Olympus mikroskopiert und photographiert. Dabei wurde das Cell^F Imaging Programm von Olympus verwendet.

II.2.3.10 Luciferase - Assay

Zur Messung der Luciferase Aktivität wurde das Messsystem *Dual-Glo™ Luciferase Assay System* von Promega verwendet. Die Messung der Lumineszenzeinheiten erfolgte mit dem Messgerät Fusion von Packard Bioscience. Dabei wurden folgende Einstellungen gewählt:

Detection Mode	Lumineszenz
Messzeit	10 sec
Expected Activity	niedrig
Filter Settings:	
Excitation	leer
Emission	leer

Das Prinzip des Tests besteht darin, zwei unterschiedliche Luciferase Aktivitäten unabhängig von einander zu messen. Dies ist möglich, weil die Firefly- und Renilla-Luciferase verschiedene Substrate besitzen.

Im ersten Schritt werden die Zellen lysiert und das Substrat der Firefly-Luciferase hinzugefügt. Dies geschieht mit dem Dual-Glo™ Luciferase-Reagenz. Nach anschließender Messung der Biolumineszenz wird die Aktivität mit Hilfe des Dual-Glo™ Stop&Glo Reagenz unterdrückt und das Substrat für die Renilla-Luciferase bereit gestellt.

Die Messung zweier verschiedener Aktivitäten ermöglicht es Schwankungen, die durch unterschiedliche Transfektionseffizienzen entstehen, herauszurechnen.

Nach Entnahme des Überstands für ELISA-Messungen, wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend mit 500 µl Trypsin versetzt, um die adhärenten Makrophagen vom Boden zu lösen. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit 1 ml RPMI-Medium gestoppt und die Zellsuspension in Eppendorf-Cups überführt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 300 x g wurde der Überstand abgesaugt, das

Zellpellet in 75 μ l RPMI aufgenommen und die Suspension in Vertiefungen einer 96-Well-Platte überführt.

Nach Zugabe des gleichen Volumens Dual-Glo™ Luciferase-Reagenz wurden die Zellen 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Lumineszenz gemessen. Nach einer weiteren 15-minütigen Inkubation mit 75 μ l Dual-Glo™ Stop&Glo Reagenz erfolgte die zweite Messung.

II.2.2 DNA- und RNA-Techniken

II.2.2.1 Arbeiten mit RNA

Da RNA sehr empfindlich ist und ubiquitär vorkommende Ribonukleasen sehr stabil sind und auch ohne Cofaktoren aktiv sein können, wurden alle Arbeitsschritte mit Handschuhen durchgeführt. Zusätzlich wurde der Arbeitsplatz mit RNaseZAP® vorbereitet und nur sterile Polypropylen-Tubs und Pipettenspitzen mit Filter verwendet. Außerdem wurde nur Wasser verwendet, welches zuvor mit DEPC vorbehandelt wurde. Dazu wurde 1 Liter bidestilliertem Wasser 1ml Diethylpyrocarbonat (0,1% DEPC v/v) zugegeben, kräftig geschüttelt und über Nacht inkubiert. Durch anschließendes Autoklavieren wurde DEPC wieder inaktiviert.

II.2.2.1.1 RNA-Extraktion

Die Reinigung der RNA wurde nach Anleitung des Herstellers mit dem *RNeasy Mini Kit*® von Qiagen durchgeführt.

Die Zellen wurden nach einem einmaligen Waschschritt mit RLT-Puffer unter Zusatz von β -Mercaptoethanol (10 μ l/ml) lysiert, wobei bis zu einer Zellzahl von 5×10^6 Zellen 350 μ l verwendet wurde und bis 10^7 Zellen mit 600 μ l eingesetzt wurde. Das Lysat wurde daraufhin bei -20 °C zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

Später wurde das Lysat erst über eine QIAGEN Shredder Säule homogenisiert, um im Anschluss durch Zugabe von 70-prozentigen Ethanol eine Bindung der RNA an das Kieselerdegel zu ermöglichen. Mit Hilfe verschiedener Waschschritte wurden unerwünschte Verunreinigungen beseitigt, die RNA schließlich mit nukleasefreiem Wasser eluiert und bei -80 °C gelagert.

II.2.2.1.2 Messung der RNA-Konzentration

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde das Eluat 1:100 in nukleasefreiem Wasser verdünnt und mit dem Eppendorf BioPhotometer bei 260 nm die Extinktion bestimmt. Bei dieser Wellenlänge haben die Basen der Nukleinsäure ihr Absorptionsmaximum. Um auf mögliche Verunreinigungen, zum Beispiel mit Proteinen, schließen zu können, wurde gleichzeitig die Absorption bei 280 und 230 nm ermittelt. Optimalerweise ist das Verhältnis der Extinktionen bei 260 und 280 nm größer 2. Gleichermaßen gilt für die Ratio 260/230 nm.

Die Qualität wurde zusätzlich mit Hilfe einer denaturierenden RNA Gelelektrophorese nachgewiesen (siehe II.2.2.1.4).

II.2.2.1.3 Reverse Transkription

Im weiteren Verlauf wurde die RNA in komplementäre DNA, sogenannte cDNA, überführt, da RNA nicht als Grundlage für eine PCR dienen kann. Das geschah mit Hilfe der reversen Transkriptase des *Moloney murinen Leukämievirus* (M-MLV) und mit Oligo(dT)-Primern, die am 3' Endes, dem sogenannten PolyA-Schwanz von Säugetier-RNA binden können.

Dazu wurde 1 µg RNA mit 1 µg Oligo(dT)-Primern gemischt, mit nukleasefreiem Wasser auf ein Volumen von 14 µl gebracht und 5 min bei 70 °C inkubiert. Bei dieser hohen Temperatur trennen sich RNA Doppelstrände auf und die Primer können sich anlagern. Da die Proben anschließend sofort für 5 min auf Eis gestellt wurden, blieben die Strände auch weiterhin getrennt. Mit Zugabe der Nukleotide und der reversen Transkriptase in passender Pufferlösung wurde die Reaktion gestartet.

	Volumen	Endkonzentration
RNA/Primer-Mischung in H ₂ O	14 µl	
M-MLV 5x Puffer	5 µl	
dNTPs (10mM)	1,25 µl	0,5 mM
H ₂ O (Nuklease-frei)	3,75 µl	
M-MLV RT	1 µl = 200 Units	
Gesamtvolumen	25 µl	

Die Inkubation bei 40 °C für 60 min sorgte für optimale Bedingungen. Die Reaktion wurde durch die Inaktivierung der Transkriptase bei 70 °C für 15 min abgestoppt und die Proben bei -20 °C gelagert.

II.2.2.1.4 RNA-Gelelektrophorese

Um sicher zu stellen, dass die verwendetet RNA auch intakt ist, wurde eine denaturierende RNA-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Denaturierung ist nötig, da einzelsträngige RNA

Wasserstoffbrückenbindungen ausbildet und eine Auftrennung nur nach Molekurlargewicht somit unmöglich wäre.

Zum Schutz vor Formaldehydämpfen, wurden die Arbeiten unter dem Abzug durchgeführt. Zur Gelherstellung wurde 1% (w/v) Agarose in 1x MESA zusammen mit 3,9% Formaldehyd aufgelöst. Als Laufpuffer wurde 1x MESA verwendet. 5 µg RNA wurde auf ein Volumen von 5 µl gebracht und mit 15 µl RNA-Denaturierungspuffer vermischt. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 65 °C wurden die Proben kurz auf Eis gestellt, anschließend 4 µl 6x Mass Ruler Loading Dye Ladepuffer dazu gegeben und umgehend auf das Gel aufgetragen. Unter einer Spannung von 50 Volt wurden die Proben getrennt und bei einer Wellenlänge von 366 nm durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht. (Pufferzusammensetzungen siehe Anlage A)

II.2.2.2 Arbeiten mit DNA

II.2.2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ermöglicht eine Auftrennung doppelsträngiger, linearer DNA-Fragmente anhand ihres Molekulargewichts. Um die DNA-Banden sichtbar zu machen, wird dem Gel Ethidiumbromid zugefügt. Dabei handelt es sich um einen interkalierenden Farbstoff, der sich zwischen den Basen des DNA-Stranges einlagert und dort durch UV-Licht angeregt wird.

Soweit nicht anderweitig vermerkt, wurde für die Herstellung eines 1-prozentigen Agarosegels 1% (w/v) Agarose in 0,5 x TAE-Puffer (siehe Anhang A) in der Mikrowelle gelöst, und nach dem Abkühlen mit 100 ng Ethidiumbromid pro ml Gel versetzt. Die Probe wurde mit 1/6 Volumen 6x DNA Ladepuffer gemischt und zusammen mit einem Größen-Standard der ein Abschätzen der Fragmentgröße möglich macht, auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte unter einer konstanten Spannung von 120 Volt. Die Detektion wurde bei einer Wellenlänge von 366 nm durchgeführt.

II.2.2.2.2 Die Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine einzigartige Methode um *in vitro* eine spezifische DNA Sequenz zu vervielfältigen (Mullis, 1990). In dieser Arbeit wurden das iQ5 Real Time Detection System™ und der MyCycler™ von Biorad verwendet. Um Kontaminationen mit genomischer DNA zu vermeiden wurden diese Arbeiten mit Handschuhen, gefilterten Pipettenspitzen und nukleasefreiem Wasser durchgeführt.

II.2.2.2.1 Standard-PCR

Für die Standard-PCR-Reaktionen wurde, soweit nicht anders angegeben, die Taq DNA Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* verwendet. Das Aktivitätsoptimum dieses Enzyms liegt bei 80 °C, es toleriert jedoch auch kurzzeitige Temperaturerhöhungen auf ca. 95 °C (Mullis, 1990). Soweit möglich, wurden die Primer so gewählt, dass sie 24 - 36 Basenpaare lang waren, einen CG-Gehalt von 40-60% hatten und ähnliche Schmelzpunkte (T_m) besaßen. Die Annealingtemperaturen wurden wie folgt berechnet:

$$T_a = (G+C) \times 4 + (A+T) \times 2$$

Damit lag die Temperatur mit den oben genannten Vorgaben bei 55 - 65 °C, womit eine hohe Bindungsspezifität gewährleistet war.

Als Elongationszeit wurde 1 min pro 1000 bp Fragmentlänge angenommen und als Matrize wurde genomische Maus DNA (500 ng) oder cDNA, die aus 1 µg RNA (nach II.2.2.1.3) hergestellt wurde, verwendet.

Zur Bestimmung der Ausbeute und des Molekulargewichtes der amplifizierten DNA-Fragmente wurden 5-10 µl der PCR-Reaktionen auf ein Agarosegel aufgetragen und analysiert.

Die Standard PCR Reaktionen wurden mit einem Endvolumen von 50 µl unter den folgenden Bedingungen durchgeführt.

Komponenten	Endkonzentration
DNA Matrize	x ng/µl
3'-Primer	1 µM
5'-Primer	1 µM
GoTaq® Green Master Mix	20 µl

Schritt	Temperatur in °C	Dauer in min	Zyklenzahl
initiale Denaturierung	94	5	1 x
Denaturierung	94	1	35 x
Annealing	T _a	1	
Elongation	72	ca. 1/1000bp	
finale Elongation	72	10	1 x
Abkühlung	4	∞	

II.2.2.2.2 Realtime-PCR

Mit der gewonnenen cDNA (siehe II.2.2.1.3) wurde im Folgenden eine RT-PCR mit dem *iQ5 Real-Time PCR Detection System™* von Biorad und *SensiMix Plus SYBR Kit* von Peqlab durchgeführt. Um verfolgen zu können, wie sich die RNA-Expression eines speziellen Gens ändert, muss sichergestellt werden, dass sich nicht nur allgemein das Niveau der Genexpression verändert hat. Daher wurde nicht nur die cDNA des Zielgens amplifiziert, sondern auch ein Vergleichsgen, ein sogenanntes *housekeeping gene*, in diesem Fall für 18S-RNA. Die Bildung von 18S-RNA ist auch unter Stimulierung meist konstant und kann somit gut als Maß für die allgemeine Genaktivität dienen.

Die RT-PCR wurde mit Ficlin-B, PP4- und 18S-Primern (siehe II.1.6) durchgeführt. Jeder Ansatz wurde in Duplikaten durchgeführt. Als Kontrollen diente jeweils eine Wassertrolle ohne cDNA. Die Bestimmung des *threshold cycle* (C_t), d.h. die Bestimmung des ersten messbaren PCR-Produktes über Hintergrund und die weitere Analyse der Daten erfolgte mittels iCycler Analysis Software (Biorad). Normalisiert auf den internen Standard 18S RNA wurden dann relative Unterschiede in der Genexpression in verschiedenen Zellpopulationen anhand der ΔΔC_t Methode ermittelt. Der ΔC_t Wert wurde über die Differenz zwischen dem C_t-Wert der Probe des Zielgenes und dem C_t des *Housekeeping gene* berechnet. Der ΔΔC_t Wert wurde dann über die Differenz der ΔC_t Werte der zu vergleichenden Proben berechnet. Der relative Expressionsunterschied (R) zwischen zwei Proben kann dann über die Formel R = 2^{-ΔΔCt} bestimmt werden.

Die RT-PCR wurde mit einem Endvolumen von 25 µl unter den folgenden Bedingungen durchgeführt.

	Endkonzentration	Volumen
Primer Rev	200 nM	1 µl
Primer Fw	200 nM	1 µl
SensiMix		12,5 µl
cDNA (hergestellt aus 1µg RNA; 1:5 verdünnt)		5 µl
H ₂ O		6,5 µl
Endvolumen		25 µl

Schritt	Temperatur in °C	Dauer	Zyklenzahl
Aktivierung Taqpolymerase	95	9 min	1 x
Denaturierung	95	15 sec	45 x
Annealing und Elongation	60	30 sec	
finale Elongation	55	1	1 x

Schmelzkurve: Steigerung von 0,5 °C pro Zyklus (30 sec, 81 x) ausgehend von 55 °C.

II.2.2.2.3 Plasmidaufreinigung - Maxiprep

Um für Transfektionsexperimente große Mengen an reiner Plasmid-DNA zu gewinnen, wurden Plasmide mit Hilfe des *EndoFree Plamid Maxi Kit* von Qiagen aus positiv getesteten Bakterienklonen isoliert.

Ein wichtiger Vorteil des verwendeten Kits besteht darin, dass damit auch LPS entfernt wird. Zusammenfassend wurde 200 ml LB-Medium, das 100 µg/ml Ampicillin enthielt, im Verhältnis 1:1000 mit einer Vorkultur beimpft und bei 37 °C für 16 Stunden bei ca. 300 rpm geschüttelt. Nachdem die Zellen bei 6000 x g für 15 min zentrifugiert wurden, wurden sie

nach Anleitung des Herstellers erst lysiert und das Lysat auf einer DEAE (Diethylaminoethanol) - Säule aufgetragen. Nach mehreren Waschschritten wurde die gereinigte Plasmid-DNA schließlich eluiert. Eine Konzentrierung und Entsalzung des Eluats erfolgt über eine Isopropanol-Präzipitation. Dazu wurde die DNA mit 10,5 ml Isopropanol präzipitiert, anschließend zentrifugiert (15000 x g, 30 min, 4 °C), nochmals mit 5 ml 70%igen Ethanol gewaschen und zentrifugiert (15000 x g, 10 min), schließlich getrocknet und in TE Puffer, resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Vektoren	Beginn des klonierten Fragments
2 kB/pGL4.11	- 1994 bp
1,5 kB/pGL4.11	- 1449 bp
pGL4.11 – CEBPB/ATF2	- 1194 bp
pGL4.11 – PU.1	- 975 bp
1 kB/pGL4.11	- 916 bp
pGL4.11 – <i>1st promotor</i>	- 916 bis - 438
pGL4.11 – AP1	- 812 bp
pGL4.11 – CCAAT box	- 569 bp
0.5 kB/pGL4.11	- 435 bp
pRL-TK Vektor, Promega	

II.2.2.4 transiente Transfektion

II.2.2.4.1 Tranfektion mit Fugene® HD Transfektion Reagent

Die Optimierung der Transfektion mit dem *Fugene HD Reagenz* der Firma Roche wurde wie in der Anleitung vorgeschlagen durchgeführt. Es wurden die Verhältnisse Fugene : DNA gleich 3:2, 4:2, 6:2, 7:2 und 8:2 jeweils mit unterschiedlich langen Inkubationszeiten getestet. Als bestes Vorgehen erschien folgendes:

Es wurden in einer 12-Well-Platte 2 bis 3×10^5 Zellen pro Well und ml ausgesät und über Nacht inkubiert, so dass der Zellrasen 80 bis 90 % konfluent war.

Der Transfektionsmix wurde im Verhältnis Fugene : DNA = 6 : 2 pipettiert und pro Well 50 µl vorsichtig aufgetropft.

Transfektionsmix:

pGL4.11/Promotorfragment	1 µg
pGL4.11/Renilla	0,1 µg
Fugene HD	3 µl
serumfreies Medium	auf 50 µl Gesamtvolumen

Die Inkubationszeit bis zur Stimulierung betrug 24 Stunden.

II.2.2.4.2 Transfektion mit DOTAP Liposomal Transfektion Reagent

Die Transfektion wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Dazu wurden in einer 24-Well-Platte $3,5 \times 10^5$ Zellen pro Well und ml ausgesät und mehrere Stunden inkubiert, bis der Zellrasen 60 bis 80% konfluent war.

Die folgenden Mengen wurden verwendet:

pGI4.11/Promotorfragment	2 µg
pGI4.11/Renilla	0,2 µg
DOTAP	10 µl oder 15 µl
HBS-Puffer	auf 50 µl Gesamtvolumen

Die Inkubationzeit bis Stimulierung betrug jeweils 24 und 48 Stunden.

II.2.3 Immunologische Methoden

II.2.3.1 Allgemeine Durchflusszytometrie

Alle durchflusszytometrischen Messungen wurden mit dem LSR II Flow Cytometer von BD Bioscience durchgeführt und mit dem Programm WinMDI ausgewertet. An Fluoreszenzfarbstoffen wurden FITC-, PE-, PerCP- und APC-Farbstoffe verwendet. Diese Messparameter wurden logarithmisch aufgetragen, während die Granularität und die Zellgröße linear aufgetragen wurden. Die Messung erfolgte bei konstanter Fließgeschwindigkeit.

Die verschiedenen Kanäle des Durchflusszytometers waren folgendermaßen belegt:

1. Forward Scatter (FSC)	Zellgröße
2. Sideward Scatter (SSC)	Granularität
3. Fluoreszenzkanal 1	FITC- Fluoreszenzintensität
4. Fluoreszenzkanal 2	PE- Fluoreszenzintensität
5. Fluoreszenzkanal 3	PerCP- und PI-Fluoreszenzintensität
6. Fluoreszenzkanal 4	APC- Fluoreszenzintensität

Für die durchflusszytometrische Untersuchung wurden 2×10^6 Zellen in ein FACS-Röhrchen gegeben. Die Zellen wurden zweimal mit 2-prozentigem FCS in BPS (2%FCS/PBS) gewaschen und dabei jeweils 10 min bei 300 x g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgeschüttet. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde α -Fc-Rezeptor-Antikörper in 50 μ l 2 % FCS/PBS zugefügt und 30 min auf Eis inkubiert. Die spezifischen Antikörper wurden anschließend in passender Konzentration in 50 μ l 2 % FCS/PBS zugefügt und weitere 30 min im Dunkeln auf Eis inkubiert (siehe Tab. II.2). Nach zwei weiteren Waschschritten wurden die Zellen in 250 μ l 2 % FCS/PBS aufgenommen. Für den Fall, dass die Messung erst später erfolgen sollte, wurde 2 % PFA zugefügt, um die Färbung zu konservieren. Bei Verwendung eines biotinylierter Antikörpers, wurde nach der primären Inkubationszeit eine zweite 20-minütige Inkubation mit einem Streptavidin-Sekundärantikörper und anschließenden Waschschritten durchgeführt.

Antikörper	gekoppelt an	Verdünnung	Zellen
Anti-Maus-Fcγ-Rezeptor _{II/III}	-	1 μ l/10 ⁶ Zellen	alle
Anti-Maus-MHC-II	FITC	1:100	BMDC
Anti-Maus-CD11c	PE	1:100	Milz, BMDC
Anti-Maus-CD11b	FITC	1:200	Milz
Anti-Maus CD11b	PE		Hoxb8
Anti-Maus-F4/80	PerCP	1:100	Milz, Hoxb8
Anti-Maus-Gr1	FITC	1:500	Hoxb8
Anti-Maus-CD80	biotiniert	1:200	BMDC
Anti-Maus CD86	biotiniert	1:200	BMDC
Streptavidin-Alexa 350		1:500	BMDC

Tabelle II.3: Übersicht über die in der Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper.

Die Lösung bestand jeweils aus Antikörpern in der angegebenen Verdünnung in FACS-Puffer (2% FCS/PBS)

II.2.3.2 Zellsortierung

Die Zellen wurden wie unter Punkt II.2.3.1 beschrieben vorbereitet und mit dem FACS Aria Zellsortierungssystem von BD Biosciences sortiert. Dabei wurden die Zellen nach ihren Oberflächenmarker in maximal 4 verschiedene Populationen eingeteilt und in Laufpufferflüssigkeitströpfchen verpackt, die daraufhin wegen ihrer unterschiedlichen elektrischen Ladung in einem elektrischen Feld ausgelenkt werden konnten und in 500 µl FCS aufgenommen wurden.

II.2.3.3 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Der Nachweis von murinem IL-6 im Überstand erfolgte mit dem *DuoSet Elisa Development Kit* von R&B Systems.

Bei dem verwendeten System handelt es sich um einen sogenannten „Sandwich-ELISA“. Der Name beschreibt bildlich, wie am Ende des ELISAs das nachzuweisende Protein, das hier als Antigen fungiert, zwischen zwei Antikörpern, dem Capture-Antikörper, der fest mit der Mikrotiterplatte verbunden ist und dem Detektionsantikörper mit konjugiertem Enzym, gebunden ist. Je mehr Protein vorliegt, desto häufiger kommt es zur Antikörperbindung und damit fällt auch der durch das Enzym ausgelöste Farbumschlag stärker aus.

Der ELISA wurde exakt nach Anleitung des Herstellers mit je 100 µl Zellüberstand auf einer 96-well-Platte durchgeführt. Die Messung der Absorbanz erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm mit dem ELISA Reader von Perkin Elmer.

III Ergebnisse

III.1 Expression von Ficolin-B

In Vorversuchen waren Makrophagen, dendritische Zellen und ER Hoxb8-Neutrophile positiv auf eine Ficolin-B mRNA-Expression hin getestet worden (siehe Abbildung I.9). Die Expression der Ficolin-B mRNA während Differenzierung, Reifung und Stimulierung dieser Zellen sollte in diesen Versuchen genauer charakterisiert werden. Es wurde Knochenmark aus C57BL/6 Wildtyp Mäusen entnommen, um daraus Makrophagen (BMM) und dendritische Zellen (BMDC) zu generieren, zudem Milzen, aus denen direkt Milzmakrophagen gewonnen werden konnten. Neutrophile Zellen wurden aus einer östrogenabhängigen Vorläuferzelllinie gewonnen, die in Abwesenheit von Östrogen zu neutrophilen Zellen ausreiften.

III.1.1 Expression von Ficolin-B in aus Knochenmarkzellen kultivierten dendritischen Zellen (BMDC)

III.1.1.1 Morphologie der dendritischen Zellen

Zum Nachweis, dass sich mit Hilfe der Kulturmethode auch intakte dendritische Zellen entwickeln, wurden Knochenmarkzellen (siehe II.2.1.4.1) aus Mäusen präpariert, zur Differenzierung angeregt (siehe II.2.1.6.2) und am Tag 8 ein Cytospin mit Diff-Quik Färbung durchgeführt und die Zellen im Anschluss mikroskopiert (siehe II.2.1.8 – 9).

Dabei erkannte man ca. 20 µm große Zellen mit dunklem Zytoplasma, großem Kern und den für dendritische Zellen typischen Zellfortsätze (siehe Abbildung III.1).

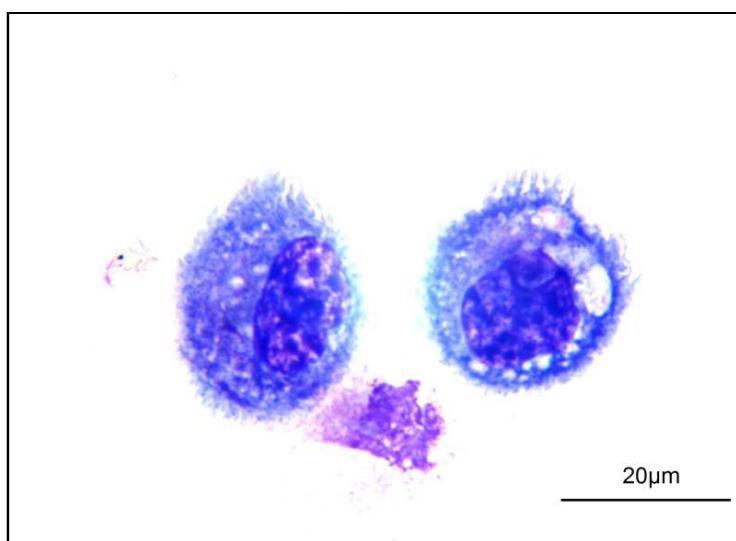


Abbildung III.1: Morphologie der BMDC am Tag 8

Knochenmarkzellen wurden in GM-CSF-haltigem Medium zur Differenzierung zu dendritischen Zellen angeregt. Am Tag 8 wurde ein Cytospin mit Diff-Quik-Färbung durchgeführt, die Zellen mikroskopiert und fotografiert (Vergrößerung 1000x).

III.1.1.2 Kinetik der Ficolin-B Expression während der Differenzierung zu BMDC

Um die Expression von Ficolin-B während der Entwicklung von nativen Knochenmarkzellen zu dendritischen Zellen verfolgen zu können, wurden Knochenmarkzellen, wie oben beschrieben, aus Mäusen präpariert, zur Differenzierung angeregt, an verschiedenen Tagen mRNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben (siehe II.2.2.1.1 – 3) und der Real-Time-PCR zugeführt (siehe II.2.2.2.2.2) (siehe Abbildung III.2).

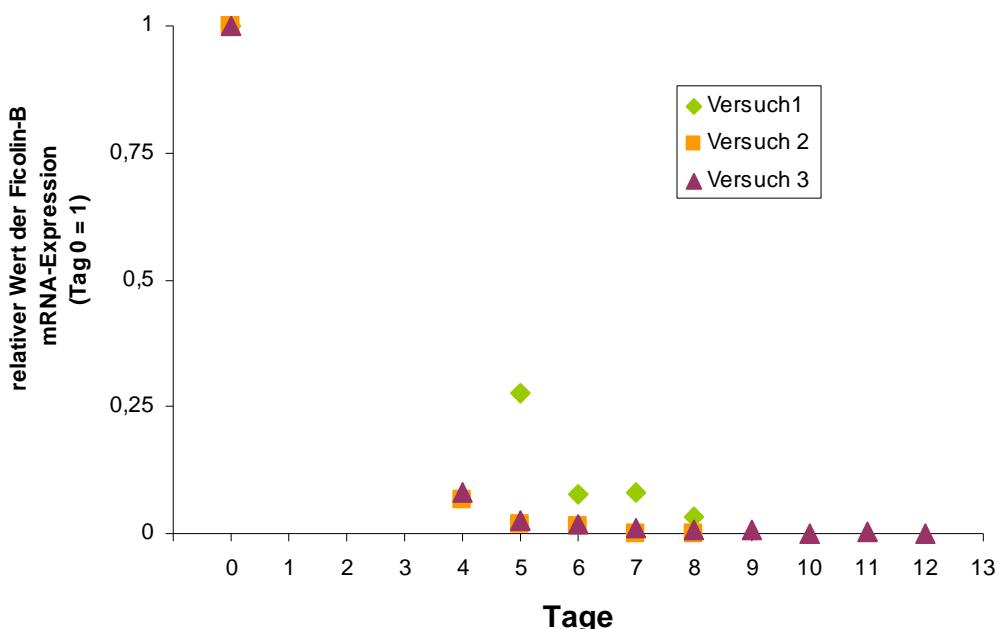


Abbildung III.2: Die Expression von Ficolin-B sinkt während der Differenzierung von Knochenmarkzellen zu BMDC

In 3 unabhängigen Versuchen wurde mRNA von verschiedenen Differenzierungsstadien der Knochenmarkzellen zu dendritischen Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine Real-Time-PCR mit PP4-Primern durchgeführt. Die relative Expression von Ficolin-B wurde über die $\Delta\Delta Ct$ - Methode ermittelt. Die relative Expression am Tag 0 wurde gleich 1 gesetzt.

Während Knochenmarkzellen noch ausgeprägt Ficolin-B exprimieren, sinkt die Expression während der Differenzierung zu dendritischen Zellen stark ab, um am Tag 8 durchschnittlich nur noch ein Prozent des Ausgangswertes zu erreichen. Dabei bleibt die Expression bei weiterer Kultur bis zu Tag 12 auf diesem niedrigen Niveau konstant.

III.1.1.3 Expression von Ficolin-B in BMDC unterschiedlicher Reifungsstadien

Dendritische Zellen liegen, wie die Makrophagen, am Tag 9 sowohl als reife, als auch unreife BMDC vor (Lutz *et al.*, 1999). Daher wurde nun untersucht, ob sich unreife, reife und Zellen mit mittlerem Reifegrad in ihrer Ficolin-B-Expression unterscheiden.

Dazu wurden Knochenmarkzellen zur Differenzierung angeregt (siehe II.2.1.4.1, II.2.1.6.2) und am Tag 9 mit einem FACS-Zellsortierungssystem in drei verschiedene Populationen aufgeteilt (siehe II.2.3.1-2). Im Anschluss wurde die Ficolin-B mRNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und mit einer Standard-PCR nachgewiesen (siehe II.2.2.1.1 – 3, II.2.2.2.1) (siehe Abbildungen III.3 A) und B)) Weil sich hier andeutete, dass ein Unterschied in der Expression von Ficolin-B in unreifen und reifen BMDC besteht, wurde im Anschluss eine Real-Time-PCR mit den gleichen Proben durchgeführt (siehe II.2.2.2.2) (siehe Abbildung III.3 C)). Dabei konnte bestätigt werden, dass die Ficolin-B-Expression als Ergebnis der Zellreifung herunter reguliert wird.

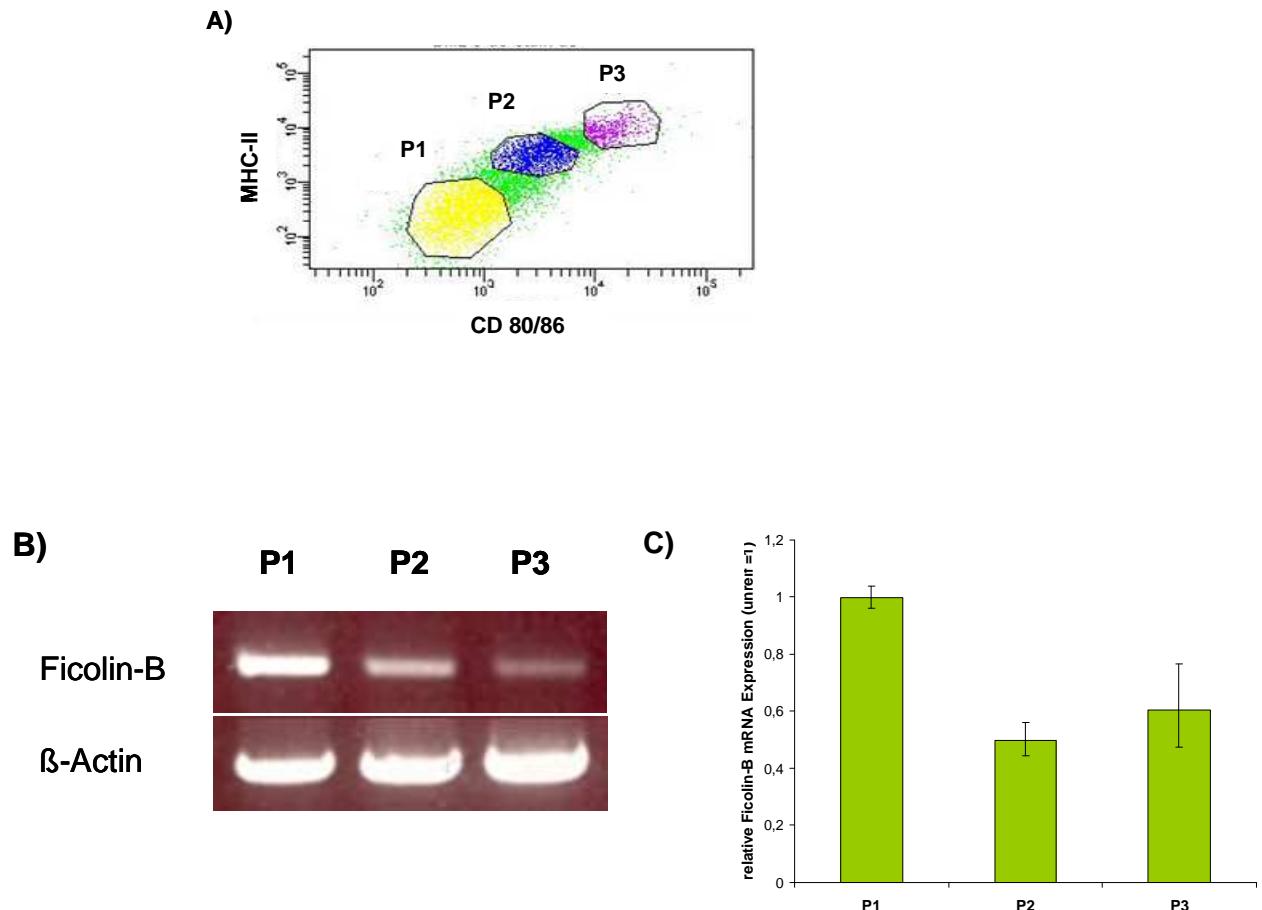


Abbildung III.3: Expression der von Ficolin-B in BMDC verschiedener Reifungsstadien

A) Dendritische Zellen wurden in GM-CSF-haltigem Medium aus Knochenmarkzellen kultiviert, am Tag 9 mit dem FACS-Zellsortierungssystem in die Populationen unreife BMDC ($P1 = CD11c^+, MHC\text{-II}^{\text{niedrig}}, CD80/86^{\text{niedrig}}$), BMDC mit mittleren Reifegrad ($P2 = CD11c^+, MHC\text{-II}^{\text{mittel}}, CD80/86^{\text{mittel}}$), und reife BMDC ($P3 = CD11c^+, MHC\text{-II}^{\text{hoch}}, CD80/86^{\text{hoch}}$) eingeteilt. mRNA der verschiedenen BMDC-Populationen P1 bis P3 wurde in cDNA umgeschrieben und **B)** eine Standard-PCR mit Ficolin-B ATG/STOP-Primern durchgeführt. Amplifizierungsprodukte wurden auf ein 1-prozentiges Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetragen. Zur Kontrolle wurden β -Actin Primer verwendet. Daneben wurde **C)** eine Real-Time-PCR mit PP4-Primern durchgeführt. Die Expression der unreifen BMDC wurde gleich 1 gesetzt.

III.1.1.4 Stimulierung der BMDC

Um zu sehen, ob die Ficolin-B-Expression in dendritischen Zellen erneut induziert werden kann, wurden dendritische Zellen bis zum Tag 7 kultiviert (siehe II.2.1.6.2) und danach für 24 Stunden mit LPS stimuliert (siehe II.2.1.7.1). Anschließend wurden die Zellen lysiert, mRNA in cDNA umgeschrieben und der Real-Time-PCR zugeführt (siehe II.2.2.1.1 – 3, II.2.2.2.2). Wie in Abbildung III.4 gezeigt, sinkt die Expression von Ficolin-B um durchschnittlich 60 % bei Stimulierung mit LPS.

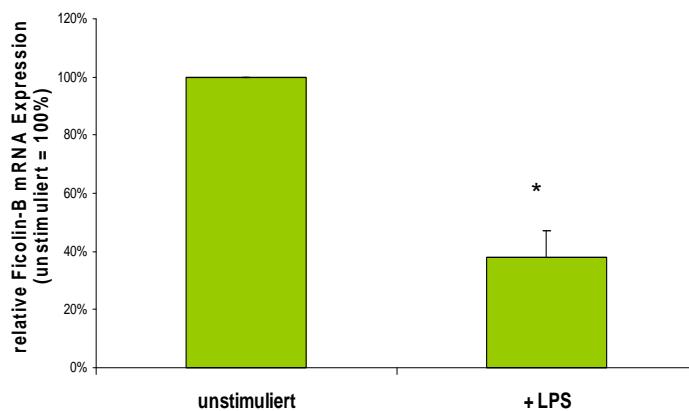


Abbildung III.4: Die Expression von Ficolin-B sinkt in BMDC nach Stimulierung mit LPS

In vier unabhängigen Experimenten wurden BMDC am Tag 7 für 24h in An- und Abwesenheit von 100 ng/ml LPS kultiviert, die Zellen lysiert, RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine Real-Time-PCR mit PP4-Primern durchgeführt. Die relative Expression der Ficolin-B mRNA wurde über die $\Delta\Delta Ct$ - Methode ermittelt. Die relative Expression ohne LPS am Tag 8 wurde gleich 100% gesetzt. Durchschnitt und Standardabweichung von 4 Mäusen. * p<0,01

III.1.2 Expression von Ficolin-B in Makrophagen

III.1.2.1 Expression von Ficolin-B in aus Knochenmarkzellen kultivierten Makrophagen (BMM)

III.1.2.1.1 Morphologie der Makrophagen

Zum Nachweis, dass sich mit Hilfe der Kulturmethode auch intakte Makrophagen entwickeln, wurden Knochenmarkzellen (siehe II.2.1.4.1) aus Mäusen präpariert, zur Differenzierung angeregt (siehe II.2.1.6.1) und am Tag 7 ein Cytospin mit Diff-Quik Färbung durchgeführt und die Zellen im Anschluss mikroskopiert (siehe II.2.1.8 – 9) (siehe Abbildung III.5). Dabei ließen sich ca. 22 μ m große Zellen mit rundem, eosinophilen Kern, großen und zahlreichen Granula und den typischen Zellausläufern erkennen.

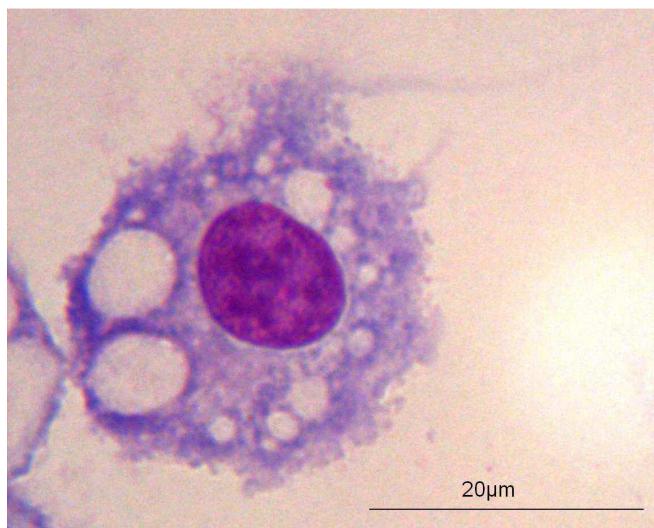


Abbildung III.5: Morphologie der BMM am Tag 6

Knochenmarkzellen wurden in M-CSF-haltigem Medium zur Differenzierung zu Makrophagen angeregt. Am Tag 6 wurde ein Cytospin mit Diff-Quik-Färbung durchgeführt, die Zellen mikroskopiert und fotografiert (Vergrößerung 1000x).

III.1.2.1.2 Kinetik der Ficolin-B-Expression während der Differenzierung zu BMM

Um die Expression der Ficolin-B mRNA während der Entwicklung von nativen Knochenmarkzellen zu Makrophagen verfolgen zu können, wurden Knochenmarkzellen aus Mäusen präpariert (siehe II.2.1.4.1), zur Differenzierung angeregt (siehe II.2.1.6.1), an verschiedenen Tagen lysiert, RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und der Real-Time-PCR zugeführt (siehe II.2.2.1.1 – 3, II.2.2.2.2).

Während Knochenmarkzellen noch stark Ficolin-B exprimieren, sinkt die Expression während der Differenzierung zu Makrophagen kontinuierlich ab, bis sie am Tag 6 durchschnittlich noch ca. 3 % des Ausgangswertes erreicht (siehe Abbildung III.6).

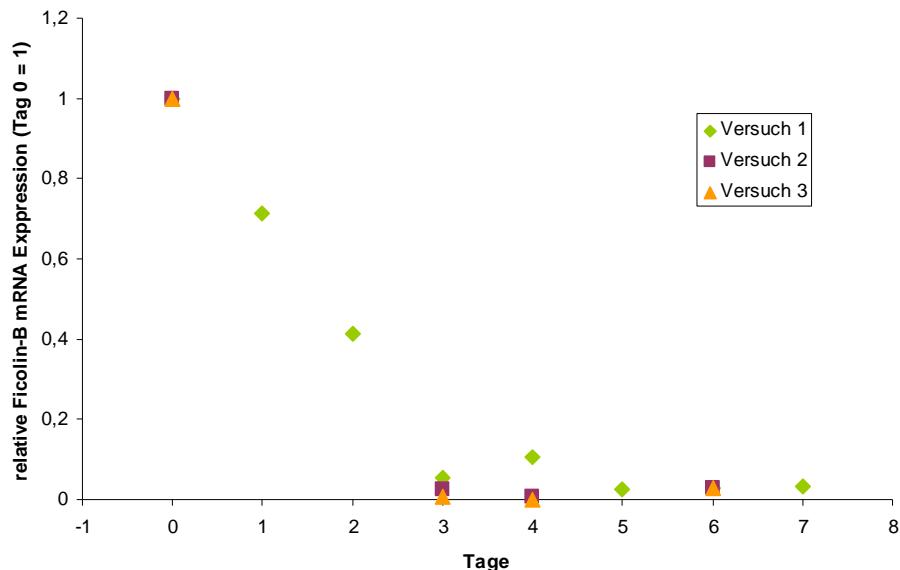


Abbildung III.6: Die Expression von Ficolin-B sinkt während der Differenzierung von Knochenmarkzellen zu BMM

In drei unabhängigen Versuchen wurde RNA von verschiedenen Differenzierungsstadien der Knochenmarkzellen zu Makrophagen isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine Real-Time-PCR mit PP4-Primern durchgeführt. Die relative Expression der Ficolin-B mRNA wurde über die $\Delta\Delta Ct$ -Methode ermittelt. Die relative Expression am Tag 0 wurde gleich 1 gesetzt.

III.1.1.3 Stimulierung der BMM

Um zu sehen, ob die Ficolin-B-Expression in Makrophagen wieder gesteigert werden kann wurden Makrophagen bis zum Tag 6 kultiviert (siehe II.2.1.6.1) und anschließend mit LPS stimuliert (siehe II.2.1.7.1). Nach 24h wurden die Zellen lysiert, mRNA in cDNA umgeschrieben und der Real-Time-PCR zugeführt (siehe II.2.2.1.1 – 3, II.2.2.2.2).

Wie in Abbildung III.7 gezeigt, konnte eine Suppression der Expression von Ficolin-B um durchschnittlich 40 % bei Stimulierung mit LPS festgestellt werden.

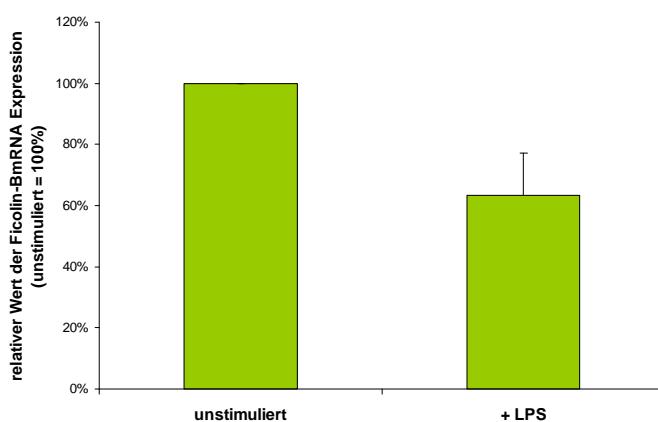


Abbildung III.7: Die Expression der Ficolin-B mRNA sinkt in BMM nach Stimulierung mit LPS

In drei unabhängigen Experimenten wurden BMM am Tag 6 für 24 h in An- und Abwesenheit von 100 ng/ml LPS kultiviert, die Zellen lysiert, RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine Real-Time-PCR mit PP4-Primern durchgeführt. Die relative Expression der Ficolin-B mRNA wurde über die $\Delta\Delta Ct$ -Methode ermittelt. Die relative Expression ohne LPS am Tag 7 wurde gleich 100 % gesetzt. Durchschnitt und Standardabweichung von 4 Mäusen.

II.1.2.2 Expression von Ficolin-B in Milzmakrophagen unterschiedlicher Reifungsstadien

Schon lange ist bekannt, dass unreife und reife Makrophagen sich in ihrer Rezeptorexpression und Proteinsynthese unterscheiden (Janeway, 2008). Damit lag es nahe zu untersuchen, ob dies auch für die Expression von Ficolin-B gilt. Da *in vivo* in der Milz verschiedene Differenzierungsstadien vorliegen, wurden für dieses Experiment Milzmarkophagen ausgewählt.

Dazu wurden Parenchymzellen der Milz isoliert (siehe II.2.1.4.2) und mit dem FACS-Zellsortierungssystem zwei verschiedene Populationen von Makrophagen heraussortiert (siehe II.2.3). Im Anschluss wurden die Zellen lysiert, mRNA in cDNA umgeschrieben und eine Real-Time-PCR durchgeführt (siehe II.2.2.1.1 – 3, II.2.2.2.2).

Hierbei ließ sich erkennen, dass die Expression der Ficolin-B während ihrer Entwicklung zu reifen Makrophagen abnimmt (siehe Abbildung III.8).

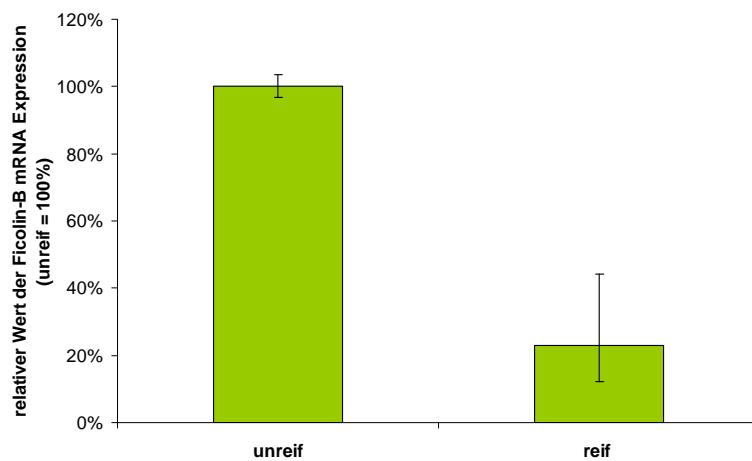


Abbildung III.8: Die Expression von Ficolin-B in reifen Milzmakrophagen ist geringer als in unreifen Makrophagen

Milzparenchymzellen wurden aus Mäusen präpariert und mit Hilfe des FACS-Zellsortierungssystems eine Population unreifer (CD11c+, CD11b+, F4/80^{niedrig}) und reifer Makrophagen (CD11c+, CD11b+, F4/80^{hoch}) separiert. mRNA der verschiedenen Makrophagenpopulationen wurden in cDNA umgeschrieben und der Real-Time-PCR zugeführt. Die relative Expression der Ficolin-B mRNA wurde über die $\Delta\Delta Ct$ - Methode ermittelt. Die Expression der unreifen Makrophagen wurde gleich 100 % gesetzt.

III.1.3 Expression von Ficolin-B in ER Hoxb8 neutrophilen Zellen

III.1.3.1 Morphologie und FACS-Analyse der Hoxb8-Zellen während der Differenzierung

Um die Differenzierung zu Neutrophilen verfolgen zu können und zu ermitteln an welchem Tag die ER Hoxb8 Zellen vollständig ausdifferenziert sind, wurden Cytospins und FACS-Analysen der Zellen an verschiedenen Tagen der Differenzierung gemacht.

Dazu wurden die in Kultur befindlichen Zellen (nach II.2.1.6.3) zur Differenzierung gebracht. Von Tag 0 bis 6 wurde zum einen ein Cytospin mit Diff-Quik-Färbung durchgeführt und die Zellen im Anschluss mikroskopiert (nach II.2.1.8 - 9) (siehe Abbildung III.9). Zudem wurden die Zellen (nach II.2.3.1) mit Neutrophilen-Antikörpern gefärbt und ein FACS-Analyse durchgeführt (siehe Abbildung III.9).

Mikroskopisch ließen sich am Tag 0 ca. 20µm große Progenitorzellen mit großem, schwach eosinophilem Zellkern erkennen. Die Kern-Plasma-Relation war hoch, nahm jedoch im Verlauf der Entwicklung zu Neutrophilen ständig ab. Am Tag 3 sah man bereits vereinzelt die für murine Neutrophile typischen ringförmigen Zellkerne. Segmente in der Ringstruktur entwickelten sich jedoch erst zum Tag 5, so dass ab diesem Zeitpunkt ausdifferenzierte neutrophile Zellen vorlagen. Die Neutrophilen waren nun ca. 15 µm groß, im schwach gefärbten Zytoplasma ließen sich Granula erkennen, während der ringförmige Zellkern stark segmentiert war. Als Zeichen für die hohe Proliferationsrate war eine große Zahl an Mitosen festzustellen.

Bei der Analyse der Oberflächenmarker zeigte sich neben der Zunahme der CD11b-Expression die erwartete Zunahme der Expression des Neutrophilenmarkers Gr-1, sowie eine Abnahme der F4/80-Oberflächenexpression.

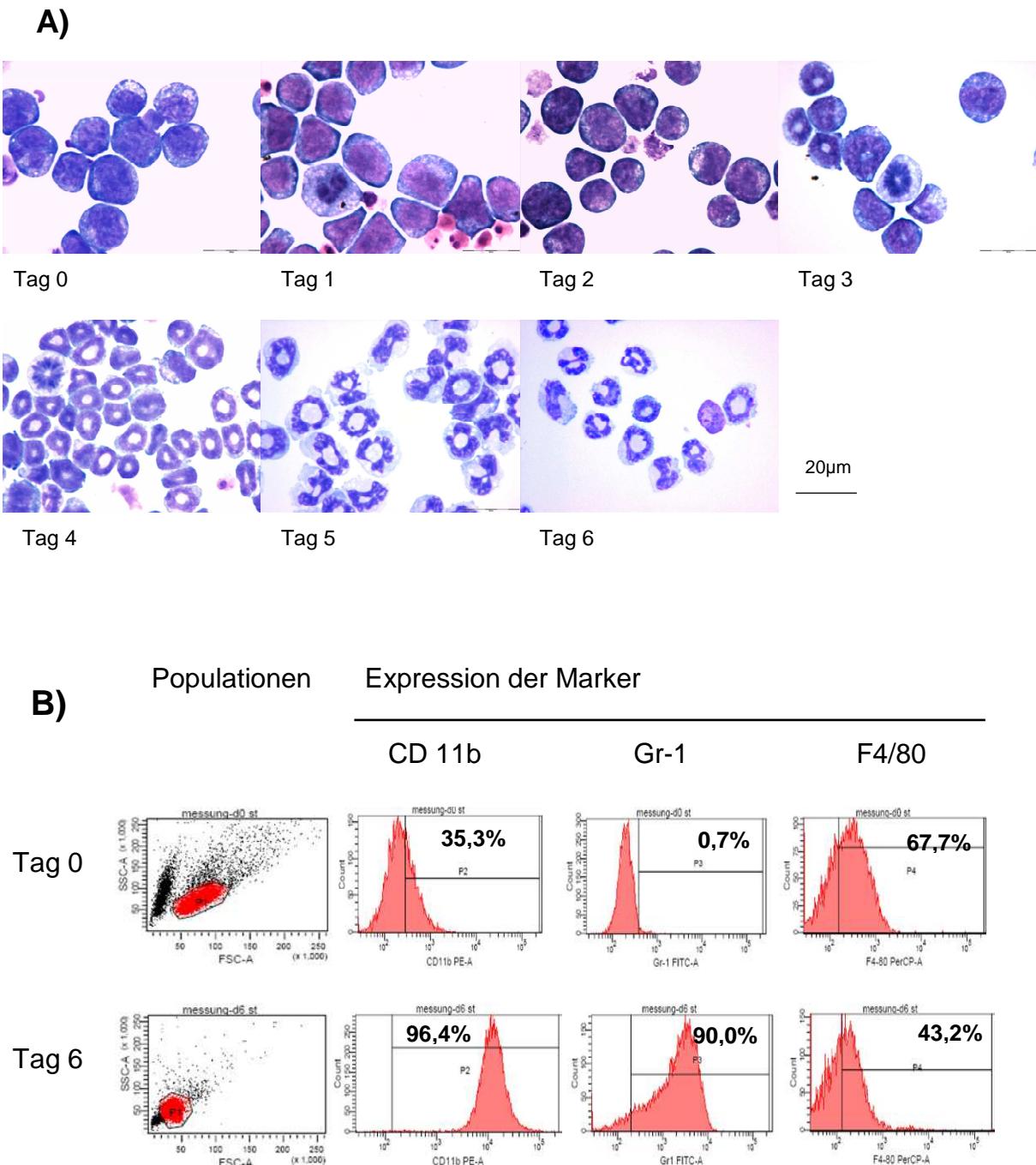


Abbildung III.9: Morphologie und FACS-Analyse der Oberflächenmarker während der Differenzierung von Progenitorzellen zu ER Hoxb8-Neutrophilen

Hoxb8-Vorläuferzellen wurden in östrogenfreiem Medium zur Differenzierung angeregt. Von Tag 0 bis 6 wurde A) ein Cytospin mit Diff-Quik-Färbung durchgeführt, die Zellen mikroskopiert und fotografiert (Vergrößerung 1000x), außerdem wurde B) eine FACS-Analyse mit CD11b-, Gr-1- und F4/80-Antikörpern durchgeführt. Gezeigt werden davon Tag 0 und Tag 6.

III.1.3.2 Nachweis der Ficolin-B mRNA-Expression und ihre Kinetik während der Differenzierung zu Hoxb8-Neutrophilen

Ziel war es nun die Expression von Ficolin-B mRNA im Verlauf der Differenzierung der Vorläuferzellen zu ER Hoxb8-Zellen zu bestimmen. Dazu wurden Progenitorzellen zur Differenzierung angeregt (siehe II.2.1.6.3). An den Tagen 0 bis 6 wurden Zellen lysiert, RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben (siehe II.2.2.1.1 – 3). Nach dem Standard-PCR-Lauf (siehe II.2.2.2.1) wurden die PCR Produkte in einer DNA-Gelelektrophorese nachgewiesen (siehe II.2.2.2.1). Dabei ließ sich erkennen, dass Hoxb8-Zellen in jedem Stadium ihrer Entwicklung zu neutrophilen Zellen Ficolin-B mRNA exprimieren, wobei die Bildung an Tag 0 noch gering ist, dann ansteigt, um ab Tag 5 wieder abzusinken.

Um diese angedeutet Kinetik noch genauer quantifizieren zu können, sollte nun die mRNA-Expression quantitativ mit Hilfe der Real-Time-PCR ermittelt werden. Daher wurde cDNA von Tag 0 bis 6 der Differenzierung hergestellt und der RT-PCR zugeführt (siehe II.2.2.2.2). Die Expression stieg von Tag 0 bis 2 auf das ca. 2 000-fache des Wertes von Tag 0 an, um am Tag 3 einen deutlichen Gipfel mit dem durchschnittlich 13 000-fachen des Tag 0-Wertes zu erreichen. Bis zum Tag 6 sank die Expression wieder auf das 170-fache des Ausgangswertes ab und blieb damit im Vergleich zu den Progenitorzellen erhöht.

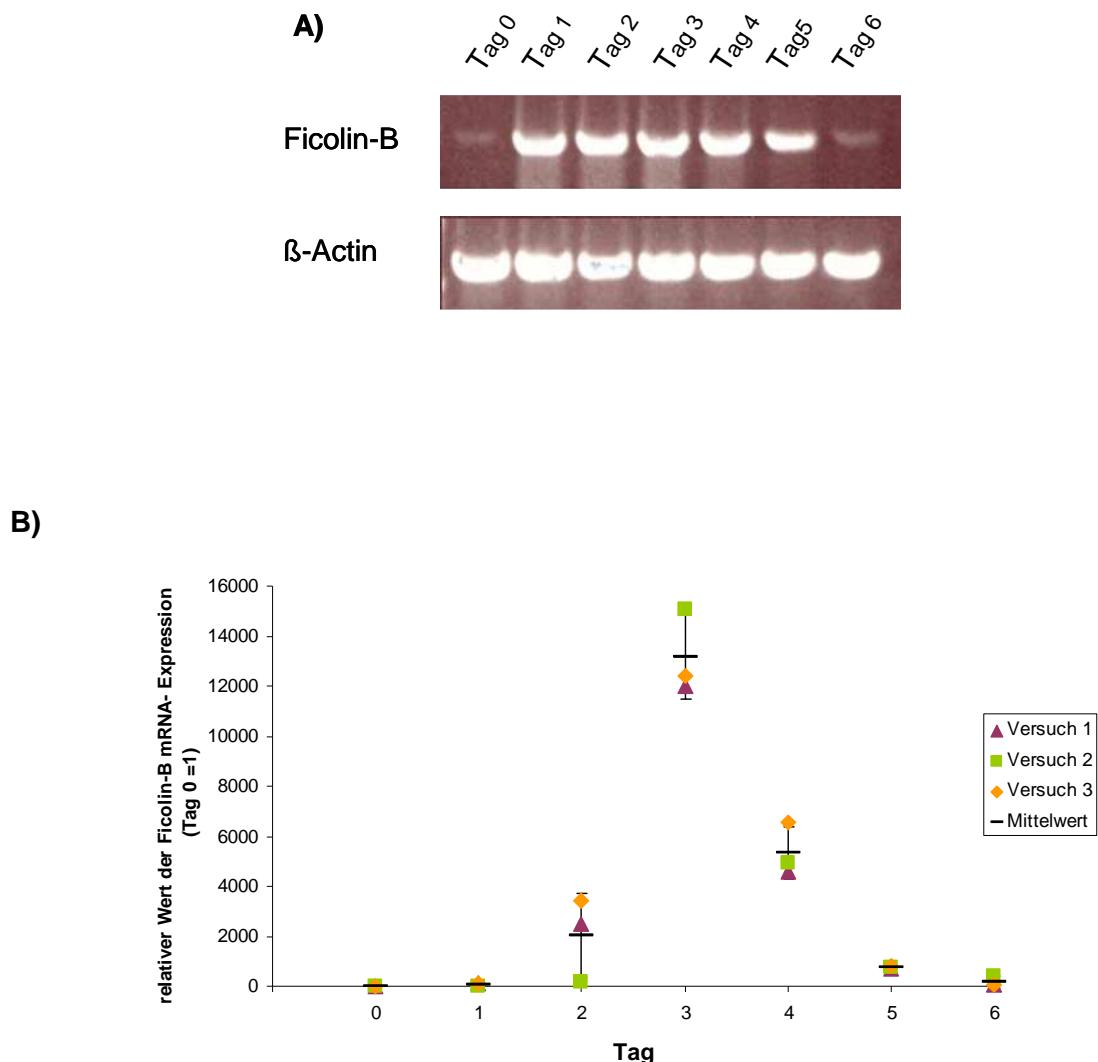


Abbildung III.10: Ficolin-B Expression während der Differenzierung zu Hoxb8-Neutrophilen

RNA von verschiedenen Differenzierungsstadien der Hoxb8 Zellen wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine **A)** Standard-PCR mit Ficolin-B ATG/STOP-Primern durchgeführt. Amplifizierungsprodukte wurden auf ein 1-prozentiges Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetragen. Zur Kontrolle wurden β-Actin Primer verwendet. **B)** In 3 unabhängigen Versuchen wurde zudem eine Real-Time-PCR mit PP4-Primern durchgeführt. Die relative Expression der Ficolin-B mRNA wurde über die $\Delta\Delta Ct$ - Methode ermittelt. Die relative Expression am Tag 0 wurde gleich 1 gesetzt.

III.1.3.4 Stimulierung der ausdifferenzierten Hoxb8 Neutrophilen

Nachdem eine Veränderung in der Ficolin-B-Expression während der Entwicklung zu Neutrophilen nachgewiesen war, schien es nun interessant zu sehen, wie sich die Ficolin-B-Expression in Hoxb8-Neutrophilen nach direkter Stimulierung mit verschiedenen Stimulatoren von neutrophilen Zellen verändert.

Die Hoxb8 Zellen wurden am Tag 5 (nach II.2.1.7.2) stimuliert, die Zellen lysiert, RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und der Real-Time-PCR zugeführt (nach II.2.2.1.1 – 3, II.2.2.2.2).

Wie in Abbildung III.11 ersichtlich steigt die mRNA-Expression bei Neutrophilen teilweise schon nach 30 min an. Dabei konnte bei Zugabe von LPS bzw. PMA/Ionomycin eine Steigerung der mRNA-Expression um das bis zu 5- respektive 7-fache beobachtet werden, wobei die größte Steigerung bei PMA/Ionomycin mit dem ca. 9-fachen nach 30 min gemessen wurde. Diese war jedoch aufgrund der Variabilität der Einzelwerte nicht signifikant.

Bei Stimulierung mit fMLP und aggregiertem IgG zeigte sich keine Veränderung der Expression.

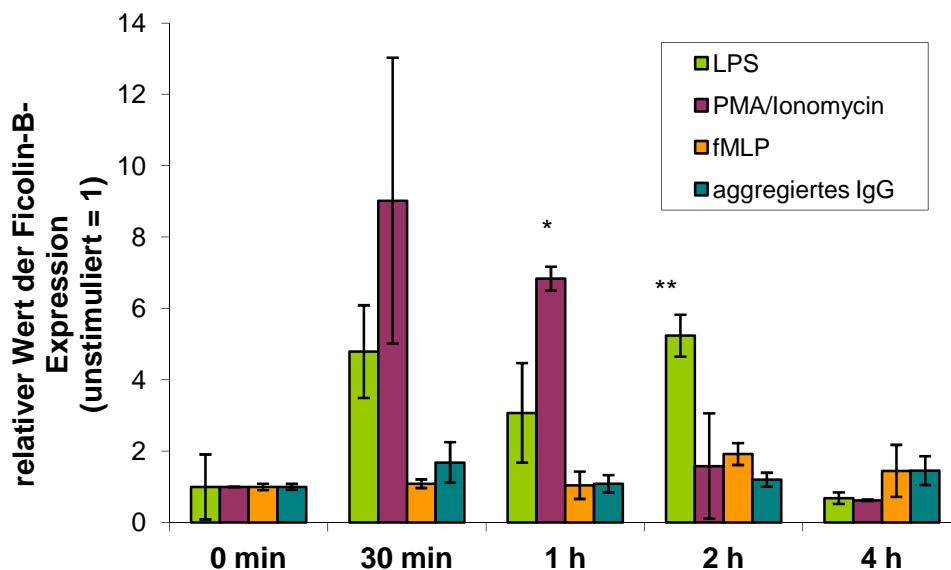


Abbildung III.11: Die Ficolin-B mRNA-Expression steigt nach Stimulierung mit LPS und PMA/Ionomycin, nicht jedoch nach Stimulierung mit fMLP und aggregiertem IgG

Hoxb8-Neutrophile wurden am Tag 5 für 30 min, 1 h, 2 h und 4 h mit 100 ng/ml LPS, 15 ng/ml PMA + 1 µM Ionomycin, 0,1 µM fMLP und 20 µg/ml aggregiertem IgG kultiviert, die Zellen lysiert, RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine Real-Time-PCR mit PP4-Primern durchgeführt. Die relative Expression der Ficolin-B mRNA wurde über die $\Delta\Delta Ct$ - Methode ermittelt. Die relative Expression nach 0 min wurde gleich 1 gesetzt. Durchschnittswerte und Standardabweichungen von 3 (fMLP und aggregiertes IgG) bzw. 2 (LPS und PMA/Ionomycin) unabhängigen Ansätzen; * p < 0.05; ** p < 0.01.

III.3 Untersuchung des Ficolin-B-Promotors

Die Untersuchung regulatorischer Bereiche spezifischer Gene erfolgt über Reportergene. Zu diesem Zweck wurden die zu untersuchenden Promotor-Abschnitte vor ein Reportergen kloniert, dessen Expression nun unter Kontrolle dieser ausgewählten Sequenzen steht. Als Reportergen geeignet sind Gene, deren Aktivität leicht meßbar ist und die in den verwendeten Zelllinien selbst nicht exprimiert werden. In diesem Fall wurde als Reportergen *Luc2* verwendet, das für ein künstliches Luciferaseprotein codiert.

In dieser Arbeit sollte die 2 Kilobasenpaare lange Region des Promotors, die dem Ficolin-B Gen vorgeschaltet ist, charakterisiert werden.

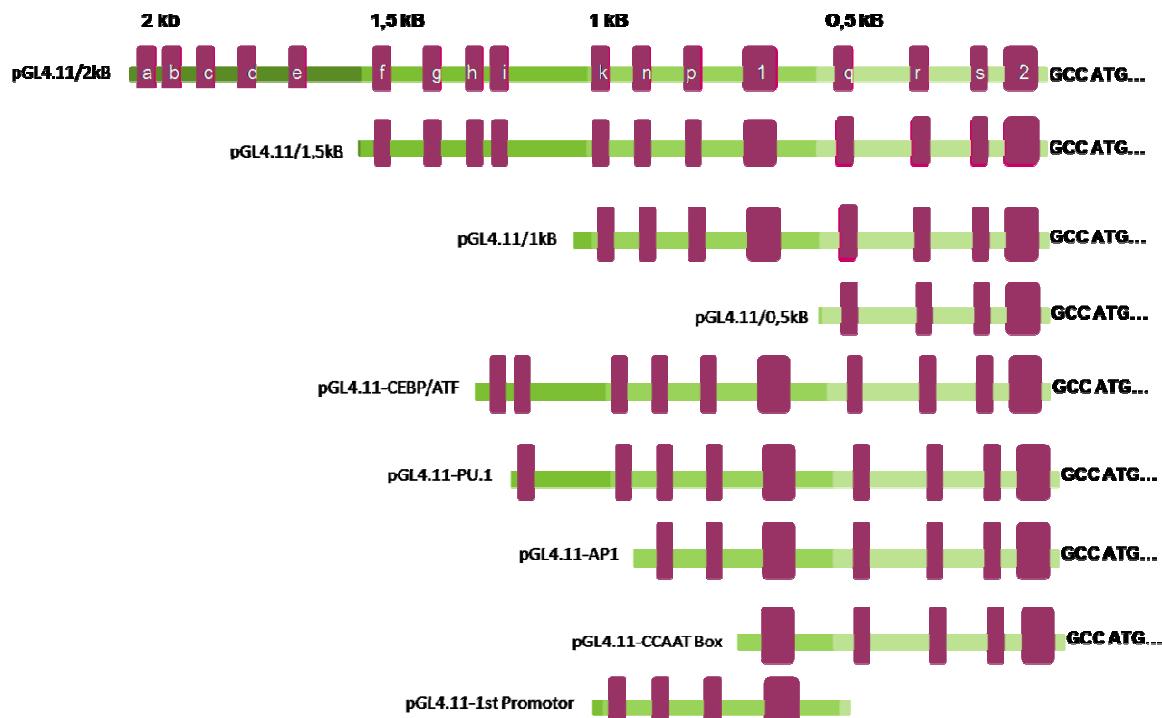


Abbildung III.12: Schematische Darstellung de Ficolin-B-Promotorregion und der klonierten Fragmente

a = Sp1; b = AP-1 /GATA-1; c = IL-6 RE-BP; d = GATA-1; e = Sp1; f = CEBPB; g = ATF-2; h = PU.1; i = STAT6; k = AP-1 /GATA-1; n = Sp1; p = CCAAT; q = Sp1; r = IL-6 RE-BP; s = c-Ets; 1 = erwarteter Promotor 1; erwarteter Promotor 2

In Vorarbeiten waren Primer entwickelt worden, mit denen Promotorfragmente unterschiedlicher Länge (2 kB, 1,5 kB, 1 kB, 0,5 kB) in einer Gradienten-PCR amplifiziert werden konnten. Diese Produkte wurden nach durchgeföhrter Gelelektrophorese und Gelelution in den pGEM-T-Easy-Vektor kloniert und in *E. coli* - Zellen (Stamm XL-1 blue) transformiert. Mit Hilfe des blau/weiß-Screenings konnten die transformierten und den klonierten Vektor enthaltenen Bakterien selektiert werden. Die Plasmid - DNA wurde kultiviert

und nach dem Miniprepverfahren extrahiert und wie der endgültige Vektor pGL4.11 mit den Restriktionsenzymen Xho/Xpn verdaut. Nach anschließender Ligation des Promotorfragments in den Vektor wurde dieser in *E. coli* transformiert. Ebenso wurde mit dem pRL-TK Vektor verfahren. Durch Analyse der Sequenz des 2 kB - Promoters wurden verschiedene für Transkriptionsfaktorbindungsstellen typische Sequenzen entdeckt. Somit konnten weitere Fragmente unterschiedlicher Länge kloniert werden, denen jeweils mögliche Bindungsstellen fehlten. Zur Ergebniskontrolle erfolgte eine Sequenzierung der Vektoren.

Nach diesen Vorarbeiten wurden die transformierten Bakterienzellen kultiviert und eine Plasmid-DNA-Isolierung nach dem Maxiprepverfahren mit den verschiedenen Fragmentlängen und dem Renillavektor durchgeführt (siehe II.2.2.2.3). Die gereinigten Plasmide wurden in PU5 1.8-Zellen transfiziert (siehe II.2.2.2.4.1) und anschließend stimuliert (siehe II.2.1.7.3). Eine Kontrolle der Stimulierung erfolgte über die Messung von Maus-IL-6 im Überstand (siehe II.2.3.3) (siehe Abbildung III.13). Die Aktivität des *Luc2*-Reportergenes und der Transfektionskontrolle *Renilla* wurde in einem Luciferase-Assay ermittelt (siehe II.2.3.10).

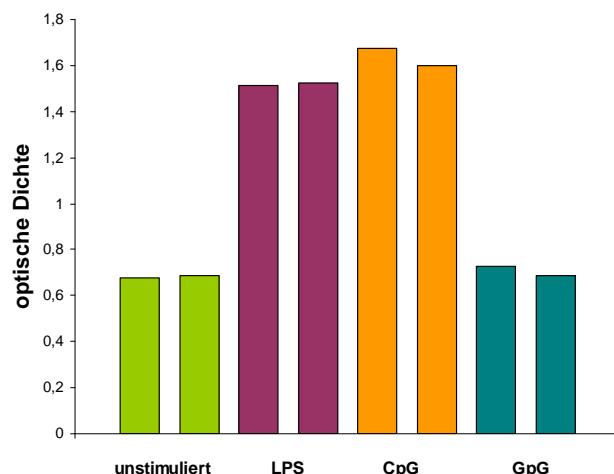


Abbildung III.13: Die Produktion von IL-6 in PU 5 1.8 steigt nach Stimulierung mit LPS und CpG

PU5 1.8 wurden in 12-well-Platten über Nacht kultiviert und anschließend mit dem pGL4.11/2kB- und pRL-TK-Vektor mittels Fugene® HD Reagenz transfiziert. Nach 24 h erfolgte die 24-stündige Stimulierung mit 100 ng/ml LPS bzw. 2µM CpG oder GpG. Mit je 100 µl Zellüberstand wurde ein ELISA auf IL-6 durchgeführt ($n = 2$, Mittelwerte aus Triplets).

Jedoch konnten in den Versuchen nicht konstant signifikant hohe Lumineszenzwerte, als RLU (*relative light units*), im Luciferase-Assay gemessen werden, so dass es nicht gelang statistisch aussagekräftige Werte zu ermitteln. Zwar war dies in den Vorversuchen, bei denen die Transfektion mit Fugene® Transfection Reagent und die Stimulierung optimiert

worden war, gelungen, in der eigentlichen Versuchsreihe hingegen nicht mehr. Auch nach erneuten Versuchen die Transkription mit Fugene® Transfection Reagent durch Änderung des DNA-Verhältnisses, der Zellzahl und der Inkubationszeit zu verbessern, bzw. unter Verwendung von DOTAP Liposomal Transfection Reagent als Transfektionsreagenz, blieben die Lumineszenzwerte sowohl von *Luc2*, als auch der *Renilla* zu niedrig. Auch ein Wechsel auf Transzfektion von RAW 264.7-Zellen brachte keine quantifizierbaren Messwerte.

IV Diskussion

IV.1 Bisherige Erkenntnisse über die Funktion von Ficolin-B

Die genaue Rolle von Ficolin-B, das erstmals 1998 von Ohashi und Erickson nachgewiesen wurde (Ohashi *et al.*, 1998), ist noch immer unklar. Nach genetischen Stammbaumanalysen wird es als das Ortholog zum humanem M-Ficolin angesehen (Endo *et al.*, 2004). Beiden Proteinen gemeinsam ist, dass sie an die für Pathogene spezifischen Kohlenhydratstrukturen GlcNAc und GalNAc binden, aber auch an SiaLacNAc (Endo *et al.*, 2005) (Liu *et al.*, 2005b). Sialinsäuren sind Derivate der Neuraminsäure, die auf der Oberfläche von Säugetierzellen und -proteinen vorkommen und diese als körpereigen markieren bzw. auch bei der Zelldifferenzierung und Zelladhäsion eine wichtige Rolle spielen (Schauer, 2000). Die Rolle dieser Bindung ist sowohl bei Ficolin-B, als auch bei M-Ficolin noch unbekannt. Kürzlich konnte auch gezeigt werden, dass Ficolin-B an pathogene Keime, namentlich an verschiedene *Staphylococcus aureus*- und *Streptococcus pneumoniae*-Stämme bindet (Daten noch unveröffentlicht).

Allerdings konnte bisher für Ficolin-B keine Aktivierung des Komplementsystems nachgewiesen werden. Vielmehr zeigt rekombinantes Ficolin-B keine Bindung an rekombinantes humanes MASP-2 und damit auch keine Spaltung des Komplementfaktors C4 (Endo *et al.*, 2005). Für natives Ficolin-B liegen derzeit keine Untersuchungen vor.

Während der Embryogenese findet sich ein interessantes Verteilungsmuster der Ficolin-B Expression. So wurde vor der Geburt Expression in der Leber dargestellt, die jedoch allmählich absank und nur bis Tag 11 nach Geburt nachweisbar war. Dagegen erreichte die Expression in der Milz zum Zeitpunkt der Geburt ihren Höhepunkt, während in erwachsenen Mäusen Ficolin-B mRNA stark im Knochenmark, aber nur noch in geringerem Maß in der Milz, gebildet wird. Dies entspricht genau den Orten der Blutbildung in den verschiedenen Entwicklungsstadien (Liu *et al.*, 2005a).

Eine genauere Untersuchung, welche Zelllinien im Knochenmark Ficolin-B exprimieren, ließ erkennen, dass die mRNA stark in Zellen der myeloischen Zellreihe (Gr-1^+ und Mac-1^+), nicht aber in T-Zell- (CD3e^+), B-Zell-Linien (B220^+), bzw. in erythropoetischen Zellen (Ter119^+) exprimiert wird (Liu *et al.*, 2005a).

Somit könnte es sich bei Ficolin-B, wie bei anderen Ficolinen auch, um ein Mustererkennungsmolekül handeln. Dafür spricht zum Einen die Bindung von Ficolin-B an Bakterien und an pathogentypische Oberflächenstrukturen, zum Anderen die Expression in Zellen der myeloischen Reihe, die allesamt an der Erkennung von Pathogenen beteiligt sind.

Da Ficolin-B aber das Komplementsystem nicht aktiviert, dürfte sein Effektormechanismus möglicherweise ein anderer sein, wie zum Beispiel die Opsonierung von Pathogenen.

Andererseits könnte Ficolin-B auch eine Funktion bei der Differenzierung von Zellen besitzen. So folgt die Expression den Orten der Blutbildung und ist vor allem im Knochenmark hoch und somit an Stellen, an denen sich viele Zellen aus Vorläuferzellen entwickeln, stark exprimiert. Wobei auch zu bedenken ist, dass Ficolin-B mRNA vielleicht nur sekundär im Zuge der Differenzierungsvorgänge hochreguliert wird, auf diese primär jedoch keinen Einfluss hat. Ein weiterer Hinweis, auf eine über die Rolle als PRM hinausgehende Funktion, ist die Bindung an körpereigenes SiaLacNAc (Endo *et al.*, 2005). Allerdings konnte bisher nicht gezeigt werden konnte, dass diese Bindung auch *in vivo* stattfindet.

Da momentan noch wenig bekannt ist, welche Zellpopulationen genau Ficolin-B exprimieren, wurden verschiedene Zellreihen dahingehend untersucht, die Expression während ihrer Differenzierung bzw. Reifung beobachtet und die Ficolin-B Expression nach Stimulierung erforscht.

IV. 2 Expression von Ficolin-B

IV.2.1 Expression von Ficolin-B in verschiedenen Zellreihen

Im Rahmen der Versuche wurden BMM, BMDC und ER Hoxb8-Neutrophile generiert (siehe Abbildungen III.1, 5 und 9) und positiv auf eine Ficolin-B mRNA-Expression hin getestet (siehe I.9). Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit Liu und Mitarbeiter, die im Knochenmark von Mäusen Zellen der myeloischen Reihe, als diejenigen identifiziert hatten, die Ficolin-B mRNA exprimieren (Liu *et al.*, 2005a).

Diese Resultate decken sich auch mit den Versuchsergebnissen am humanen Ortholog von Ficolin-B, dem M-Ficolin. Auch M-Ficolin mRNA wird in Makrophagen und unreifen dendritischen Zellen, die in diesen Versuchen aus Blutmonozyten generiert worden waren, nachgewiesen, wobei auch hier die Expression der DCs im Vergleich zu den Makrophagen geringer war (Frankenberger *et al.*, 2008) (Honoré *et al.*, 2008). Im Fall des M-Ficolins gelang es auch das Protein mittels Westernblot bzw. ELISA selbst nachzuweisen. Für Makrophagen konnte gezeigt werden, dass das Zelllysat während der gesamten Kultur, ausgehend von Monozyten, M-Ficolin enthält und dieses auch sezerniert wird. Unreife DCs hingegen enthalten am Endpunkt der Kultur kein M-Ficolin-Protein mehr, obwohl noch schwach Ficolin-B mRNA nachweisbar war. Im Überstand konnte ebenfalls kein Protein mehr nachgewiesen werden (Honoré *et al.*, 2008). Dieser Versuch zeigte auch, dass zwar einerseits eine positive Korrelation zwischen mRNA- und Proteinmenge besteht, bei

geringen mRNA-Mengen aber keine genaue Aussage über die Proteinmenge mehr möglich ist. Möglicherweise findet ab einer bestimmten m-RNA-Untergrenze keine Proteinsynthese mehr statt, wahrscheinlich ist jedoch, dass die unterschiedliche Sensitivität von RT-PCR bzw. Westernblot diesen Unterschied im Nachweis bedingt.

Bisher liegen keine Untersuchungen über die M-Ficolin mRNA-Expression von Neutrophilen vor. Mit immunhistochemischen Methoden gelang jedoch der Proteinnachweis im Zytoplasma von neutrophilen Zellen (Liu et al., 2005b). Bei Versuchen an neutrophilen Zellen von Schweinen konnte sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene der Nachweis von β -Ficolin, welches mit 75,8% die größte Übereinstimmung auf Aminosäureniveau gegenüber Ficolin-B besitzt, erbracht werden. (Brooks et al., 2003b) (Ohashi und Erickson et al., 1998)

IV.2.2 Expression von Ficolin-B während der Zelldifferenzierung

Für das Ficolin-B-orthologe M-Ficolin hatten serielle Genanalysen eine Abnahme der Transkriptionsrate des Gens bei der Entwicklung von Blutmonozyten zu dendritischen Zellen, bzw. zu Makrophagen festgestellt (Hashimoto et al., 1999a) (Hashimoto et al., 1999b). Die vorliegende Untersuchung der Ficolin-B mRNA-Expression bei der Differenzierung von BMM bzw. BMDC aus Knochenmarkzellen deckt sich vollständig mit diesen Ergebnissen (siehe Abbildung III.2 und 6). Eine Schwierigkeit stellte hier die zu geringe Gesamt-RNA-Ausbeute an den ersten Tagen dar, die zum einen durch eine Abnahme an relevanten Zellen (adärent / nicht adhärent) bedingt sein könnte, wobei die Zellzahl auch an den folgenden Tagen relativ niedrig war und nie mehr den Anfangswert erreichte. Zum Anderen wäre möglich, dass die Zellen als Reaktion auf die veränderten Bedingungen in der Zellkultur generell weniger RNA produzierten.

Die Abnahme der mRNA-Expression während der Differenzierungsvorgänge zeigt sich auch bei weiteren Studien am humanen M-Ficolin. Honoré und Mitarbeiter konnten zeigen, dass sowohl bei der Kultur von Monozyten aus humanem Blut zu Makrophagen, als auch zu unreifen dendritischen Zellen, die Expression kontinuierlich abnahm, wobei die Expression bei der Entwicklung zu dendritischen Zellen stärker sank (Honoré et al., 2008). Zu einem ähnlichen Ergebnis bei Makrophagen kam auch Frankenberger et al.. (Frankenberger et al., 2008).

Es ist bekannt, dass aus Gr-1 $^{+}$ -Knochenmarkzellen, Zellen der myeloischen Reihe, also Makrophagen, dendritische Zellen, Granulozyten und Mastzellen, entstehen und auch nur diese Gr-1 $^{+}$ -Zellen Ficolin-B exprimieren (Liu et al., 2005a). Allein die aus Knochenmark differenzierten Mastzellen erwiesen sich als negativ für Ficolin-B-Expression (siehe

Abbildung I.9). Jedoch handelt es sich bei diesem Gr-1⁺-Zellpool um ein heterogenes Gemisch verschiedener Zelltypen in verschiedenen Entwicklungsstadien, darunter auch differenzierte Zellen. In murinem Knochenmark dominieren vor allem neutrophile Zellen (Boxio *et al.*, 2004). Daher kann keine definitive Aussage darüber gemacht werden, ob die direkten Vorläufer der BMM und BMDC oder ausdifferenzierte Zellen, wie Neutrophile, maßgeblich an der hohen Ficolin-B Expression zu Beginn beteiligt sind. Da allerdings zunehmend ein Abfall in der Expression während der letzten Kulturtage zu verzeichnen ist und zu diesen späten Zeitpunkten fast ausschließlich ausdifferenzierte Zellen vorliegen (Lutz *et al.*, 1999), kann es als sehr wahrscheinlich angesehen werden, dass eine Abnahme der Ficolin-B-Expression während der Differenzierung erfolgt.

Sinkt die Expression während der Differenzierung zum Makrophagen, so könnte dies entweder ein Hinweis darauf sein, dass Ficolin-B vor allem im Knochenmark eine regulierende Rolle spielt und damit Einfluss auf Zelldifferenzierungsvorgänge besitzt, oder Ficolin-B könnte auch in frühen Entwicklungsstadien als PRM fungieren. Auch ist zu berücksichtigen, dass bereits in frühen Entwicklungsstadien ausreichend Protein gespeichert wird, das erst in späteren Stadien seine Funktion erfüllen könnte. Die Zellzahl im Versuch blieb nach Aussaat relativ konstant bzw. sank eher, so dass keine hohe Zellteilungsrate vorzuliegen scheint, die eine steigende Produktion hätte bedingen können.

Da am Tag 8 der Kultur ein Gemisch aus reifen und unreifen DCs vorliegt (Lutz *et al.*, 1999), wurde die Ficolin-B-Expression in diesen verschiedenen Zellpopulationen noch differentiell untersucht (siehe Abbildung III.3).

Die Kinetik während der Differenzierung von Hoxb8-Neutrophilen aus vorsortierten Knochenmarkvorläuferzellen zeigt demgegenüber ein völlig anderes Bild (siehe Abbildung III.10). Daher kann man schließen, dass die Regulation der Ficolin-B Expression in verschiedenen Zellreihen unterschiedlich erfolgt. Doch ist ein Vergleich zwischen der Kinetik bei BMM/BMDC bzw. Hoxb8-Neutrophilen nur eingeschränkt möglich, da unterschiedliche Systeme zu Generierung verwendet wurden.

Die Kinetik bei den Hoxb8-Neutrophilen - mit einem starken Anstieg der Expression bis zum Tag 3 und einem anschließenden Abfall - lässt sich mit einer Funktion von Ficolin-B als PRM in Einklang bringen. Neutrophile Zellen sind meist die ersten Immunzellen am Ort der Entzündung, erkennen dort Pathogene und sind einerseits in der Lage diese zu phagozytieren, andererseits können sie diese durch ihren „*respiratory burst*“ zerstören (Janeway, 2008) (Nathan, 2006). Sie überleben nur wenige Stunden im Blut, sind auch im Gewebe nur kurz lebensfähig (Handin *et al.*, 2003) (Kawamoto *et al.*, 2004) und können im reifen Zustand auch keine Granulaproteine mehr synthetisieren (Dale *et al.*, 2008). Somit scheint es wahrscheinlich, dass PRM bereits während der Entwicklung produziert und

gespeichert werden. Das Absinken der Ficolin-B mRNA-Konzentration muss nicht gleichzeitig ein Absinken der Ficolin-B Konzentration bedeuten. Wenn man davon ausgeht, dass Ficolin-B intrazellulär gespeichert und nicht, oder erst später sezerniert wird, würde die mRNA-Konzentration natürlicherweise im Sinne eines negativen Rückkopplungsmechanismus absinken. Andererseits lässt sich die starke Ficolin-B Expression am Tag 3 aber auch mit einer Funktion bei der Differenzierung von Vorläuferzellen zu Neutrophilen vereinbaren.

IV.2.3 Expression von Ficolin-B in BMDC während spontaner Reifung und Aktivierung

Während der Reifung von Immunzellen finden meist weitreichende Veränderungen in der Genexpression statt. Oft erfüllen reife und unreife Immunzellen unterschiedlich Funktionen. So sind unreife DCs auf die Aufnahme von Antigenen spezialisiert und exprimieren dazu eine Vielzahl unspezifischer Antigenrezeptoren. Nach Antigen- oder Zytokinkontakt transformieren sie zu reifen DCs, die weniger phagozytosefähig sind, dafür aber vermehrt Peptide auf MHC-II präsentieren und kostimulatorische Moleküle, wie CD80/86 exprimieren (Keller, 2001). In diesem Sinne ließe sich auch erklären, dass die Ficolin-B Expression während der Reifung von BMDC sinkt (siehe Abbildung III.3). Folgt man der Hypothese, dass es sich bei Ficolin-B um ein intrazelluläres oder extrazelluläres PRM handelt, so wäre die Bildung von Ficolin-B vor allem im unreifen Stadium wichtig. Beispielsweise exprimieren unreife DCs noch stark CD 68, einen Klasse D Scavenger-Rezeptor, wohingegen die Expression in reifen DCs nur noch gering ist (Keller, 2001). Allerdings ist zu beachten, dass in dieser Arbeit DCs untersucht wurden, die spontan und ohne Antigenkontakt reiften. Zwar sind allein durch ihren Phänotyp unreife von durch Antigenkontakt gereifte Zellen nicht zu unterscheiden, obwohl ihr Expressionsmuster unterschiedlich ist. Nur letztere produzieren IL-12 und sind damit in der Lage eine IFN- γ -Produktion in CD4 $^{+}$ -Zellen zu induzieren und die Th1-Zellantwort zu steuern (Tam *et al.*, 2008).

Allerdings konnte ein ähnlicher Rückgang der Ficolin-B Expression auch nach Stimulierung mit LPS beobachtet werden (siehe Abbildung III.4). LPS ist ein Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien, der unter anderem über den TLR4-MD-2-Rezeptor-Komplex den NF-kB-Weg aktiviert. Damit kommt es zur Expression von NF-kB-aktivierten Genen, die sowohl für inflammatorisch wirkende Zytokine, wie IL-1, IL-6 und IL-8 codieren, als auch für sogenannte kostimulatorische Moleküle, wie CD80/86, was für die Aktivierung von T-Zellen essentiell ist (Medzhitov *et al.*, 1997). In Vorversuchen wurde die Expression auch in geringeren Zeitabständen gemessen, so dass ausgeschlossen werden konnte, dass vor dem

Rückgang der Expression nach 24 Stunden eine vorherige Expressionssteigerung induziert worden war.

Es konnte somit gezeigt werden, dass reife, aktivierte BMDC weniger Ficolin-B exprimieren als unreife DC oder DC-Vorläuferzellen.

IV.2.4 Expression von Ficolin-B in BMM während Reifung und Stimulierung

Es wurde bereits dargestellt, dass die Ficolin-B-Expression in BMM geringer ist als in Zellen des Knochenmarks, bei denen es sich vor allem um Vorläuferzellen handelt. (siehe Abbildung III.6). Ein weiterer Abfall während der Reifung war in Milzmakrophagen zu beobachten (siehe Abbildung III.8), die entsprechend ihrer F4/80-Expression in unreife und reife Makrophagen eingeteilt wurden. F4/80 ist ein makrophagenspezifischer Oberflächenmarker (Austyen *et al.*, 1981), der in der Milz nur von Makrophagen der roten Pulpa exprimiert wird (Hume *et al.*, 1983). Dort werden gealterte Blutzellen, die unter anderem keine endständige Sialinsäure mehr aufweisen, von Makrophagen phagozytiert. Die Makrophagen der roten Pulpa spielen zudem eine Rolle bei der Immunantwort und produzieren verschiedene Zytokine (Janeway, 2008) (Naito *et al.*, 1996).

Durch immunhistochemischen Färbungen auf Ficolin-B-Protein konnte weiter gezeigt werden, das Ficolin-B nur in der roten Pulpa vorliegt (Daten nicht gezeigt).

Zwar wurde für die humanen Serumficoline Ficolin-2 und -3 schon eine Bindung an apoptotische Zellen nachgewiesen und somit eine Funktion bei der Beseitigung von alten Zellen und Zelldebris (Honoré *et al.*, 2007) (Kuraya *et al.*, 2005), nicht jedoch für die Orthologe M-Ficolin und Ficolin-B, die auch an SiaLacNac-BSA binden (Liu *et al.*, 2005b) (Endo *et al.*, 2005). Für Ficolin-B wurde außerdem gezeigt, dass es an Fetuin bindet, nicht jedoch an Asialofetuin (Endo *et al.*, 2005). Die endständige Sialinsäure auf der Zelloberfläche markiert die Zellen als körpereigen und intakt (Schauer, 2000). Das macht es unwahrscheinlich, dass Ficolin-B bei Makrophagen der roten Pulpa für die Erkennung von gealterten Zellen verantwortlich ist. Da in Mäusen, im Gegensatz zum Menschen, auch im erwachsenen Alter in der Milz Hämatopoiese stattfindet (Gordon *et al.*, 2005), könnte die Ficolin-B-Expression bei der Erkennung gealterter Zellen eine Rolle spielen, wobei unklar bleibt, warum die Expression bei reifen Makrophagen geringer ist. Nachdem aber auch in der roten Pulpa der Milz eine Immunantwort gegen Viren und Bakterien stattfindet, ist auch die Rolle von Ficolin-B als PRM nicht auszuschließen. Dabei wäre möglich, dass Ficolin-B vor allem in der frühen Phase der Immunantwort von Bedeutung ist und die Abnahme der mRNA-Expression in diesem Sinne zu erklären ist.

Inaktive Makrophagen exprimieren nur geringe Mengen MHC-II, dafür aber unter anderem Chemokin-, Komplement-, Scavenger- und Mannoserezeptoren, die sie sowohl an den Ort der Inflammation locken, als auch die Erkennung und Phagozytose von Pathogenen ermöglichen (Linehan *et al.*, 2002) (Kawamoto *et al.*, 2004). Nach ihrer Aktivierung steigt ihre Phagozytosefähigkeit und die Expression von Oberflächenmolekülen, wie MHC-II, CD40 und CD80/86. Gleichzeitig sezernieren sie eine Vielzahl an Zytokinen, so zum Beispiel TNF, IL-6, IL-12, CXCL-8 und exprimieren verstärkt die induzierbare NO-Synthetase (Janeway, 2008). Frankenberger und Mitarbeiter zeigten kürzlich für M-Ficolin eine Steigerung der Expression (4- bis 8-fach) in einer Monozytenzelllinie nach 24 Stunden Kultur in Gegenwart von 10 bis 1000 ng LPS, die nach 3-tägiger Kulturzeit ihr Maximum erreichte. Auch bei Stimulierung von Alveolarmakrophagen über 3 Tage war ein Anstieg erkennbar (Frankenberger *et al.*, 2008). Ein entsprechender Anstieg konnte in dieser Arbeit für Ficolin-B nicht dargestellt werden (siehe Abbildung III.7). Vielmehr deutete sich ein moderater Abfall der Expression an, der jedoch nicht signifikant war.

In anderen Versuchen mit Mauszellen wurde 16 Stunden nach intraperitonealer LPS-Injektion im Vergleich zu reiner PBS-Behandlung eine erhöhte Ficolin-B-Expression bei Peritonealexsudatmakrophagen induziert (Runza *et al.*, 2006). Dabei wurde jedoch nicht geklärt, ob die residenten Makrophagen für diesen Anstieg verantwortlich waren oder Monozyten, durch die Injektion eingewandert waren und eine gesteigerte Expressionsrate besitzen.

Worin der Unterschied in der Expression zwischen Ficolin-B und seinem humanem Ortholog M-Ficolin begründet liegt, ist unklar. Möglicherweise könnte der Unterschied in den unterschiedlichen verwendeten Zellsystemen begründet sein. Allerdings war auch bei Stimulierung der Maus-Monozyten-ähnlichen Zelllinie PU5-1.8 mit LPS in der PCR keine Steigerung erkennbar (Daten nicht gezeigt). Weiterhin vorstellbar ist eine unterschiedliche Funktion von M-Ficolin und Ficolin-B in Makrophagen, die eine unterschiedliche Regulation erforderlich macht. So ist bereits bekannt, dass M-Ficolin das Komplementsystem aktiviert, Ficolin-B aber nicht (Frederiksen *et al.*, 2005) (Endo *et al.*, 2005.) Da für M-Ficolin eine Steigerung der Phagozytoserate für *E. coli* gezeigt wurde (Teh *et al.*, 2000) und M-Ficolin deshalb als Phagozytoserezeptor fungieren könnte, wäre eine gesteigerte Expression bei Antigenkontakt und Aktivierung in diesem Sinne erklärbar. Für Ficolin-B konnte hingegen noch keine Steigerung der Phagozytoserate gezeigt werden.

IV.2.5 Veränderungen der Ficolin-B Expression in ER Hoxb8-Neutrophilen nach Stimulierung

Im Gegensatz zu BMM und BMDC konnte bei Hoxb8-Neutrophilen eine Steigerung der Ficolin-B mRNA-Expression nach Stimulierung dargestellt werden. So stieg die Expression bei Stimulierung mit LPS und PMA/Ionomycin an, während sie bei Stimulierung mit fMLP und aggregiertem IgG konstant blieb (siehe Abbildung III.11). Bei PMA handelt es sich um Phorbol-12-Myristat-Acetat, einen Phorbolester, der zur Aktivierung der Proteinkinase C führt (Goel *et al.*, 2007). Ionomycin ist ein aus Bakterien gewonnenes Ionophor, dass die Membranpermeabilität für Ca^{2+} -Ionen erhöht, wobei Ca^{2+} unter anderem auch die Proteinkinase C aktiviert (Liu,C *et al.*, 1987). fMLP (N-Formyl-Met-Leu-Phe) ist eines der stärksten chemischen Lockmittel für Neutrophile, das an den N-Formyl-Peptidrezeptor bindet und über die Aktivierung von Phospholipasen und Proteinkinasen, wie der Proteinkinase C zur Migration, Degranulation und Phagozytosesteigerung von Neutrophilen führt, aber auch wie LPS den NF-κB Signalweg aktiviert (Prossnitz *et al.*, 1997) (Selvatici *et al.*, 2006). Neutrophile exprimieren zudem an ihrer Zelloberfläche Fc-Rezeptoren an die aggregiertes IgG bindet (Dale *et al.*, 2008).

Ein Anstieg nach Stimulierung mit dem endotoxisch wirksamen Bakterienbestandteil LPS, das den TLR4 aktiviert, legt nahe, dass Ficolin-B in neutrophilen Zellen bei der Immunantwort eine Rolle spielt. Allerdings führt das chemotaktische Molekül fMLP, ein synthetisch hergestellter Bakterienbestandteil, zu keiner Steigerung der Expression, obwohl fMLP über die Aktivierung der Phospholipase C sowohl einen intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg, als auch eine Aktivierung der Proteinkinase C bewirkt. Gleichermaßen wird durch Stimulierung mit der Kombination aus PMA und Ionomycin ausgelöst, was allerdings Hochregulation der Ficolin-B Expression bewirkt. Wahrscheinlich wirkt PMA/Ionomycin noch über andere unbekannte Mechanismen. Ein Erklärungsmodell, warum aggregiertes IgG zu keiner Veränderung der Expression geführt hat, wäre die unterschiedliche Zugehörigkeit von Ficolin-B und IgG zum angeborenen, bzw. erworbenen Immunsystem. Da Immunglobuline viel später in der Entwicklungsgeschichte auftauchen, haben sich vielleicht keine Wechselwirkungen entwickelt.

IV.3 Promotorstudien

Im Verlauf der Promotorstudien gelang es trotz erfolgreicher Vorversuche in den Hauptversuchen nicht konstant hohe Transfektionsraten zu erreichen.

Grundsätzlich stehen verschiedene Transfektionsmethoden zur Verfügung. Unter den ersten Entwicklungen waren die Calcium-Phosphat-Preipitation (Wigler et al., 1978), die DEAE-Dextran-Transfektion (Rupprecht et al., 1991) und die Elektroporation (Däumler et al., 1989), wobei diese eine geringe Transfektionsrate bei hoher Zelltoxizität aufweisen. Daher wurde in dieser Arbeit nicht auf diese Methoden zurückgegriffen. Das hier verwendete DOTAP Liposomal Transfection Reagent gehört zur neueren Gruppe und bildet Liposomen, die die positiv geladene DNA in sich tragen, während FuGENE® HD Transfection Reagent zwar auch aus Nicht-Lipidbestandteilen besteht aber ebenfalls einen Komplex mit DNA bildet.

Es ist allgemein bekannt, dass es sich bei Makrophagen um einen schwer zu transfizierenden Zelltentyp handelt. Die genauere Ursache ist unbekannt. Allerdings lässt sich vermuten, dass der hohe Enzymgehalt dieser phagozytierenden Zellen für eine schnelle Inaktivierung der DNA sorgt. Jedoch wurden für diese Experimente bewusst Makrophagen gewählt, da diese Ficolin-B exprimieren und somit auch die Transkriptionsfaktoren, die für die Regulation des Ficolin-B-Promotors wichtig sind, besitzen. Auch war es anfangs gelungen, gute Transfektionsraten zu erzielen. Dass es trotz Beibehaltung des Protokolls im folgendem nicht reproduzierbar gelang, ähnlich gute Werte zu erzielen, lässt auf ein sehr störanfälliges System schließen.

Auch Versuche, die Transfektion mit anderen Zellen (RAW 264.7) und unter Verwendung eines anderen Transfektionsreagens (DOTAP Liposomal Transfection Reagent) zu etablieren, scheiterten.

Eine Möglichkeit wird es sein, in Zukunft auf Maus-Makrophagen-ähnliche Zelllinien zu verzichten und die Transfektion mit leichter zu transfizierenden Zellen, wie HeLa- und CHO-Zellen, durchzuführen.

Anhang

Molekularbiologie:

10x Mesa	0,4 M MOPS 0,1 M NaAcetat 10 mM EDTA
RNA-Denaturierungspuffer	10 x MESA 21 % (v/v) 37% Formaldehyd 64 % (v/v) Formamid 0,4 mM Ethidiumbromid
TAE-Puffer	40 mM Tris-Aacetat 1 mM EDTA

Diff-Quik Färbung:

Diff-Quik Fixationsreagenz	Methanol + 0,002 g/l Fast Green
Diff-Quick Färbelösung 1	Phosphatpuffer pH 6,6 + 1,22 g/l Eosin Y + 0,1% w/v Natriumazid
Diff-Quick Färbelösung 2	Phosphatpuffer pH 6,6 + 1,1 g/l Thiazinfarbstoff

Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei Prof. Dr. Daniela Männel für die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit am Institut für Immunologie durchzuführen und für ihre ständige Bereitschaft Hilfestellungen und wertvolle Anregungen zu geben. Auch für das Gegenlesen meiner Arbeit bin ich Ihnen sehr verbunden.

Mein besonderer Dank gebührt Dr. Valeria Runza für die Anleitung und Betreuung dieser Arbeit. Dankeschön, dass Du stets ein offenes Ohr für meine Fragen hattest!

Speziell danken möchte ich auch Dorothea Weber-Steffens, die mir nicht nur mit Ihrem fachlichen Wissen und Ihrer Tatkraft zu Seite stand.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Institutes für die freundschaftliche Aufnahme und die gute Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt auch PD Dr. Michael Rehli (Institut für Hämatologie und Onkologie, Universität Regensburg) für die Bereitstellung der Differenzierungsprotokolle.

Ich danke Dr. Hans Häcker (St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee) und Prof. Dr. Georg Häcker (Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, TU München) für die Bereitstellung der ER Hoxb8-Zellen.

Ein ganz besonderer Dank gilt jedoch meiner Familie, meinen Eltern, Geschwistern und Großeltern, die mir mein Studium ermöglicht und mich immer unterstützt haben.

Vielen Dank für alles!

Literaturverzeichnis

- Akaiwa, M., Yae, Y., Sugimoto, R., Suzuki, S.O., Iwaki, T., Izuhara, K. and Hamasaki, N. (1999). Hakata antigen, a new member of the ficolin/opsonin p35 family, is a novel human lectin secreted into bronchus/alveolus and bile. *J. Histochem. Cytochem.* 47, 777–786.
- Albert, M.L., Pearce, S.F., Francisco, L.M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R.L. and Bhardwaj, N. (1998). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 188, 1359–1368.
- Aoyagi, Y., Adderson, E.E., Rubens, C.E., Bohnsack, J.F., Min, J.G., Matsushita, M., Fujita, T., Okuwaki, Y. and Takahashi, S. (2008). L-Ficolin/mannose-binding lectin-associated serine protease complexes bind to group B streptococci primarily through N-acetylneuraminic acid of capsular polysaccharide and activate the complement pathway. *Infect. Immun.* 76, 179–188.
- Atkinson, A.P., Cedzynski, M., Szemraj, J., St Swierzko, A., Bak-Romaniszyn, L., Banasik, M., Zeman, K., Matsushita, M., Turner, M.L. and Kilpatrick, D.C. (2004). L-ficolin in children with recurrent respiratory infections. *Clin Exp Immunol* 138, 517–520.
- Austyn, J.M. and Gordon, S. (1981). F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur. J. Immunol.* 11, 805–815.
- Boxio, R., Bossenmeyer-Pourié, C., Steinckwich, N., Dournon, C. and Nüsse, O. (2004). Mouse bone marrow contains large numbers of functionally competent neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 75, 604–611.
- Bordet, J., Streng, O. (1909). Les phénomènes d'absorption de la conglutinine du serum de boeuf. *Zbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. I. Orig.* 49. 260–276.
- Brooks, A.S., DeLay, J.P. and Hayes, M.A. (2003). Characterization of porcine plasma ficolins that bind *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5B. *Immunobiology* 207, 327–337.
- Brooks, A.S., Hammermueller, J., DeLay, J.P. and Hayes, M.A. (2003). Expression and secretion of ficolin beta by porcine neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta* 1624, 36–45.

- Cella, M., Facchetti, F., Lanzavecchia, A. and Colonna, M. (2000). Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat. Immunol.* 1, 305–310.
- Chapman, S.J., Vannberg, F.O., Khor, C.C., Segal, S., Moore, C.E., Knox, K., Day, N.P., Davies, R.J.O., Crook, D.W. and Hill, A.V.S. (2007). Functional polymorphisms in the FCN2 gene are not associated with invasive pneumococcal disease. *Mol. Immunol.* 44, 3267–3270.
- Dale, D.C., Boxer, L. and Liles, W.C. (2008). The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* 112, 935–945.
- Däumler, R. and Zimmermann, U. (1989). High yields of stable transformants by hypo-osmolar plasmid electroinjection. *J. Immunol. Methods* 122, 203–210.
- Endo, Y., Nakazawa, N., Liu, Y., Iwaki, D., Takahashi, M., Fujita, T., Nakata, M. and Matsushita, M. (2005). Carbohydrate-binding specificities of mouse ficolin A, a splicing variant of ficolin A and ficolin B and their complex formation with MASP-2 and sMAP. *Immunogenetics* 57, 837–844.
- Endo, Y., Liu, Y., Kanno, K., Takahashi, M., Matsushita, M. and Fujita, T. (2004). Identification of the mouse H-ficolin gene as a pseudogene and orthology between mouse ficolins A/B and human L-/M-ficolins. *Genomics* 84, 737–744.
- Fang, F.C. (2004). Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 820–832.
- Frankenberger, M., Schwaeble, W. and Ziegler-Heitbrock, L. (2008). Expression of M-Ficolin in human monocytes and macrophages. *Mol. Immunol.* 45, 1424–1430.
- Frederiksen, P.D., Thiel, S., Larsen, C.B. and Jensenius, J.C. (2005). M-ficolin, an innate immune defence molecule, binds patterns of acetyl groups and activates complement. *Scand. J. Immunol.* 62, 462–473.
- Fujimori, Y., Harumiya, S., Fukumoto, Y., Miura, Y., Yagasaki, K., Tachikawa, H. and Fujimoto, D. (1998). Molecular cloning and characterization of mouse ficolin-A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244, 796–800.
- Girija, U.V., Dodds, A.W., Roscher, S., Reid, K.B. and Wallis, R. (2007). Localization and characterization of the mannose-binding lectin (MBL)-associated-serine protease-2 binding

- site in rat ficolin-A: equivalent binding sites within the collagenous domains of MBLs and ficolins. *J Immunol* 179, 455–462.
- Goel, G., Makkar, H.P.S., Francis, G. and Becker, K. Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. *Int. J. Toxicol.* 26, 279–288.
- Gordon, S. and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 953–964.
- Handin, R.I., Lux, S. and Stossel, T.P. (2003). *Blood: Principles and Practice of Hematology* (Lippincott Williams and Wilkins).
- Hansen, S., Thiel, S., Willis, A., Holmskov, U. and Jensenius, J.C. (2000). Purification and characterization of two mannan-binding lectins from mouse serum. *J. Immunol.* 164, 2610–2618.
- Harumiya, S., Takeda, K., Sugiura, T., Fukumoto, Y., Tachikawa, H., Miyazono, K., Fujimoto, D. and Ichijo, H. (1996). Characterization of ficolins as novel elastin-binding proteins and molecular cloning of human ficolin-1. *J. Biochem.* 120, 745–751.
- Hashimoto, S., Suzuki, T., Dong, H.Y., Nagai, S., Yamazaki, N. and Matsushima, K. (1999). Serial analysis of gene expression in human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 94, 845–852.
- Hashimoto, S., Suzuki, T., Dong, H.Y., Yamazaki, N. and Matsushima, K. (1999). Serial analysis of gene expression in human monocytes and macrophages. *Blood* 94, 837–844.
- Hayashi, F., Means, T.K. and Luster, A.D. (2003). Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 102, 2660–2669.
- Herpers, B.L., Immink, M.-M., de Jong, B.A., van Velzen-Blad, H., de Jongh, B.M. and van Hannen, E.J. (2006). Coding and non-coding polymorphisms in the lectin pathway activator L-ficolin gene in 188 Dutch blood bank donors. *Mol Immunol* 43, 851–855.
- Holmskov, U., Thiel, S. and Jensenius, J.C. (2003). Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annu Rev Immunol* 21, 547–578.
- Honoré, C., Hummelshøj, T., Hansen, B.E., Madsen, H.O., Eggleton, P. and Garred, P. (2007). The innate immune component ficolin 3 (Hakata antigen) mediates the clearance of late apoptotic cells. *Arthritis Rheum* 56, 1598–1607.

- Honoré, C., Rørvig, S., Munthe-Fog, L., Hummelshøj, T., Madsen, H.O., Borregaard, N. and Garred, P. (2008). The innate pattern recognition molecule Ficolin-1 is secreted by monocytes/macrophages and is circulating in human plasma. *Mol. Immunol.* 45, 2782–2789.
- Hume, D.A., Robinson, A.P., MacPherson, G.G. and Gordon, S. (1983). The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. Relationship between macrophages, Langerhans cells, reticular cells, and dendritic cells in lymphoid and hematopoietic organs. *J. Exp. Med.* 158, 1522–1536.
- Hummelshøj, T., Munthe-Fog, L., Madsen, H.O., Fujita, T., Matsushita, M. and Garred, P. (2005). Polymorphisms in the FCN2 gene determine serum variation and function of Ficolin-2. *Hum Mol Genet* 14, 1651–1658.
- Ichijo, H., Hellman, U., Wernstedt, C., Gonez, L.J., Claesson-Welsh, L., Heldin, C.H. and Miyazono, K. (1993). Molecular cloning and characterization of ficolin, a multimeric protein with fibrinogen- and collagen-like domains. *J Biol Chem* 268, 14505–14513.
- Ichijo, H., Rönnstrand, L., Miyagawa, K., Ohashi, H., Heldin, C.H. and Miyazono, K. (1991). Purification of transforming growth factor-beta 1 binding proteins from porcine uterus membranes. *J Biol Chem* 266, 22459–22464.
- Inaba, S., Okochi, K., Yae, Y., Niklasson, F. and de Verder, C.H. (1990). Serological studies of an SLE-associated antigen-antibody system discovered as a precipitation reaction in agarose gel: the HAKATA antigen-antibody system. *Fukuoka Igaku Zasshi* 81, 284–291.
- Iwasaki, A. and Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 5, 987–995.
- Janeway, C.A., Murphy, K. and Travers, P. (2008). Janeways Immunobiology, w. CD-ROM (Taylor & Francis).
- Janeway, C.A., Jr and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197–216.
- Jones, D.A. (2005). The potential immunomodulatory effects of topical retinoids. *Dermatol. Online J.* 11, 3.
- Kakinuma, Y., Endo, Y., Takahashi, M., Nakata, M., Matsushita, M., Takenoshita, S. and Fujita, T. (2003). Molecular cloning and characterization of novel ficolins from *Xenopus laevis*. *Immunogenetics* 55, 29–37.

- Kawamoto, H. and Minato, N. (2004). Myeloid cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 1374–1379.
- Keirstead, N.D., Lee, C., Yoo, D., Brooks, A.S. and Hayes, M.A. (2008). Porcine plasma ficolin binds and reduces infectivity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in vitro. *Antiviral Res* 77, 28–38.
- Keller, R. (2001). Dendritic cells: their significance in health and disease. *Immunol. Lett.* 78, 113–122.
- Kenjo, A., Takahashi, M., Matsushita, M., Endo, Y., Nakata, M., Mizuochi, T. and Fujita, T. (2001). Cloning and characterization of novel ficolins from the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. *J. Biol. Chem.* 276, 19959–19965.
- Kilpatrick, D.C., McLintock, L.A., Allan, E.K., Copland, M., Fujita, T., Jordanides, N.E., Koch, C., Matsushita, M., Shiraki, H. and Stewart, K., et al. (2003). No strong relationship between mannan binding lectin or plasma ficolins and chemotherapy-related infections. *Clin Exp Immunol* 134, 279–284.
- Krarup, A., Mitchell, D.A. and Sim, R.B. (2008). Recognition of acetylated oligosaccharides by human L-ficolin. *Immunol Lett* 118, 152–156.
- Krarup, A., Sørensen, U.B.S., Matsushita, M., Jensenius, J.C. and Thiel, S. (2005). Effect of capsulation of opportunistic pathogenic bacteria on binding of the pattern recognition molecules mannan-binding lectin, L-ficolin, and H-ficolin. *Infect. Immun.* 73, 1052–1060.
- Krarup, A., Thiel, S., Hansen, A., Fujita, T. and Jensenius, J.C. (2004). L-ficolin is a pattern recognition molecule specific for acetyl groups. *J. Biol. Chem.* 279, 47513–47519.
- Kuraya, M., Ming, Z., Liu, X., Matsushita, M. and Fujita, T. (2005). Specific binding of L-ficolin and H-ficolin to apoptotic cells leads to complement activation. *Immunobiology* 209, 689–697.
- Kuroki, Y., Takahashi, M. and Nishitani, C. (2007). Pulmonary collectins in innate immunity of the lung. *Cell. Microbiol.* 9, 1871–1879.
- Langley, K.E., Wypych, J., Mendiaz, E.A., Clogston, C.L., Parker, V.P., Farrar, D.H., Brothers, M.O., Satygal, V.N., Leslie, I. and Birkett, N.C. (1992). Purification and characterization of soluble forms of human and rat stem cell factor recombinantly expressed by *Escherichia coli* and by Chinese hamster ovary cells. *Arch Biochem Biophys* 295, 21–28.

- Le, Y., Lee, S.H., Kon, O.L. and Lu, J. (1998). Human L-ficolin: plasma levels, sugar specificity, and assignment of its lectin activity to the fibrinogen-like (FBG) domain. FEBS Lett. 425, 367–370.
- Le, Y., Tan, S.M., Lee, S.H., Kon, O.L. and Lu, J. (1997). Purification and binding properties of a human ficolin-like protein. J. Immunol. Methods 204, 43–49.
- Lillie, B.N., Brooks, A.S., Keirstead, N.D. and Hayes, M.A. (2005). Comparative genetics and innate immune functions of collagenous lectins in animals. Vet. Immunol. Immunopathol. 108, 97–110.
- Linehan, S.A., Martínez-Pomares, L. and Gordon, S. (2000). Macrophage lectins in host defence. Microbes Infect 2, 279–288.
- Liu, C. and Hermann, T.E. (1978). Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. J. Biol. Chem. 253, 5892–5894.
- Liu, Y., Endo, Y., Homma, S., Kanno, K., Yaginuma, H. and Fujita, T. (2005). Ficolin A and ficolin B are expressed in distinct ontogenic patterns and cell types in the mouse. Mol. Immunol. 42, 1265–1273.
- Liu, Y., Endo, Y., Iwaki, D., Nakata, M., Matsushita, M., Wada, I., Inoue, K., Munakata, M. and Fujita, T. (2005). Human M-ficolin is a secretory protein that activates the lectin complement pathway. J. Immunol. 175, 3150–3156.
- Lu, J. and Le, Y. (1998). Ficolins and the fibrinogen-like domain. Immunobiology 199, 190–199.
- Lu, J., Tay, P.N., Kon, O.L. and Reid, K.B. (1996). Human ficolin: cDNA cloning, demonstration of peripheral blood leucocytes as the major site of synthesis and assignment of the gene to chromosome 9. Biochem. J. 313 (Pt 2), 473–478.
- Lu, J., Teh, C., Kishore, U. and Reid, K.B.M. (2002). Collectins and ficolins: sugar pattern recognition molecules of the mammalian innate immune system. Biochim. Biophys. Acta 1572, 387–400.
- Lutz, M.B., Kukutsch, N., Ogilvie, A.L., Rössner, S., Koch, F., Romani, N. and Schuler, G. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. J Immunol Methods 223, 77–92.

- Lynch, N.J., Roscher, S., Hartung, T., Morath, S., Matsushita, M., Maennel, D.N., Kuraya, M., Fujita, T. and Schwaeble, W.J. (2004). L-ficolin specifically binds to lipoteichoic acid, a cell wall constituent of Gram-positive bacteria, and activates the lectin pathway of complement. *J. Immunol.* 172, 1198–1202.
- Matsushita, M., Endo, Y. and Fujita, T. (2000). Cutting edge: complement-activating complex of ficolin and mannose-binding lectin-associated serine protease. *J. Immunol.* 164, 2281–2284.
- Matsushita, M., Endo, Y., Taira, S., Sato, Y., Fujita, T., Ichikawa, N., Nakata, M. and Mizuochi, T. (1996). A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen-like domains that functions as an opsonin. *J. Biol. Chem.* 271, 2448–2454.
- Matsushita, M., Kuraya, M., Hamasaki, N., Tsujimura, M., Shiraki, H. and Fujita, T. (2002). Activation of the lectin complement pathway by H-ficolin (Hakata antigen). *J. Immunol.* 168, 3502–3506.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. and Janeway, C.A., Jr (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394–397.
- Medzhitov, R. and Janeway, C.A., Jr (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296, 298–300.
- Mullis, K.B. (1990). Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 48, 579–582.
- Nahid, A.M. and Sugii, S. (2006). Binding of porcine ficolin-alpha to lipopolysaccharides from Gram-negative bacteria and lipoteichoic acids from Gram-positive bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* 30, 335–343.
- Naito, M., Umeda, S., Yamamoto, T., Moriyama, H., Umezawa, H., Hasegawa, G., Usuda, H., Shultz, L.D. and Takahashi, K. (1996). Development, differentiation, and phenotypic heterogeneity of murine tissue macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 59, 133–138.
- Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 173–182.
- Ohashi, T. and Erickson, H.P. (1997). Two oligomeric forms of plasma ficolin have differential lectin activity. *J. Biol. Chem.* 272, 14220–14226.

- Ohashi, T. and Erickson, H.P. (1998). Oligomeric structure and tissue distribution of ficolins from mouse, pig and human. *Arch. Biochem. Biophys.* 360, 223–232.
- Ohashi, T. and Erickson, H.P. (2004). The disulfide bonding pattern in ficolin multimers. *J. Biol. Chem.* 279, 6534–6539.
- Omori-Satoh, T., Yamakawa, Y. and Mebs, D. (2000). The antihemorrhagic factor, erinacin, from the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*), a metalloprotease inhibitor of large molecular size possessing ficolin/opsonin P35 lectin domains. *Toxicon* 38, 1561–1580.
- Prossnitz, E.R. and Ye, R.D. (1997). The N-formyl peptide receptor: a model for the study of chemoattractant receptor structure and function. *Pharmacol. Ther.* 74, 73–102.
- Randolph, G.J., Beaulieu, S., Lebecque, S., Steinman, R.M. and Muller, W.A. (1998). Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 282, 480–483.
- Rehli, M., Sulzbacher, S., Pape, S., Ravasi, T., Wells, C.A., Heinz, S., Söllner, L., El Chartouni, C., Krause, S.W. and Steingrimsson, E., et al. (2005). Transcription factor Tfec contributes to the IL-4-inducible expression of a small group of genes in mouse macrophages including the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *J. Immunol.* 174, 7111–7122.
- Rescigno, M., Granucci, F. and Ricciardi-Castagnoli, P. (2000). Molecular events of bacterial-induced maturation of dendritic cells. *J. Clin. Immunol.* 20, 161–166.
- Ritter, U., Meissner, A., Ott, J. and Körner, H. (2003). Analysis of the maturation process of dendritic cells deficient for TNF and lymphotoxin-alpha reveals an essential role for TNF. *J. Leukoc. Biol.* 74, 216–222.
- Robinson, J.M. (2008). Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. *Histochem. Cell Biol.* 130, 281–297.
- Runza, V.L., Hehlgans, T., Echtenacher, B., Zähringer, U., Schwaeble, W.J. and Männel, D.N. (2006). Localization of the mouse defense lectin ficolin B in lysosomes of activated macrophages. *J. Endotoxin Res.* 12, 120–126.
- Rupprecht, A.P. and Coleman, D.L. (1991). Transfection of adherent murine peritoneal macrophages with a reporter gene using DEAE-dextran. *J. Immunol. Methods* 144, 157–163.

- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. and Lanzavecchia, A. (1995). 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.* 182, 389–400.
- Schauer, R. (2000). Achievements and challenges of sialic acid research. *Glycoconj. J.* 17, 485–499.
- Selvatici, R., Falzarano, S., Mollica, A. and Spisani, S. (2006). Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. *Eur. J. Pharmacol.* 534, 1–11.
- Sugimoto, R., Yae, Y., Akaiwa, M., Kitajima, S., Shibata, Y., Sato, H., Hirata, J., Okochi, K., Izuhara, K. and Hamasaki, N. (1998). Cloning and characterization of the Hakata antigen, a member of the ficolin/opsonin p35 lectin family. *J. Biol. Chem.* 273, 20721–20727.
- Tam, M.A., Rydström, A., Sundquist, M. and Wick, M.J. (2008). Early cellular responses to *Salmonella* infection: dendritic cells, monocytes, and more. *Immunol. Rev.* 225, 140–162.
- Teh, C., Le, Y., Lee, S.H. and Lu, J. (2000). M-ficolin is expressed on monocytes and is a lectin binding to N-acetyl-D-glucosamine and mediates monocyte adhesion and phagocytosis of *Escherichia coli*. *Immunology* 101, 225–232.
- Turner, M.W. and Hamvas, R.M. (2000). Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associations. *Rev Immunogenet* 2, 305–322.
- Valladeau, J., Ravel, O., Dezutter-Dambuyant, C., Moore, K., Kleijmeer, M., Liu, Y., Duvert-Frances, V., Vincent, C., Schmitt, D. and Davoust, J., et al. (2000). Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 12, 71–81.
- Van Kooten, C. and Banchereau, J. (1996). CD40-CD40 ligand: a multifunctional receptor-ligand pair. *Adv. Immunol.* 61, 1–77.
- Waheed, A. and Shadduck, R.K. (1979). Purification and properties of L cell-derived colony-stimulating factor. *J Lab Clin Med* 94, 180–193.
- Walport, M.J. (2001). Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 344, 1058–1066.

Wang, G.G., Calvo, K.R., Pasillas, M.P., Sykes, D.B., Häcker, H. and Kamps, M.P. (2006). Quantitative production of macrophages or neutrophils ex vivo using conditional Hoxb8. *Nat Methods* 3, 287–293.

Wigler, M., Pellicer, A., Silverstein, S. and Axel, R. (1978). Biochemical transfer of single-copy eucaryotic genes using total cellular DNA as donor. *Cell* 14, 725–731.