

# **Der Transport des HLA-B assoziierten Transkript 3 und sein Einfluss auf die NK Zell-Funktion**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangen des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Daniela Topolar

aus Karlsruhe

Köln, 2010

Berichtersteller/in: PD. Dr. Roswitha Nischt  
Prof. Dr. Thorsten Hoppe  
Prof. Dr. Elke Pogge von Strandmann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.2010

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b> .....	<b>5</b>
<b>1 Abstract</b> .....	<b>9</b>
<b>2 Zusammenfassung</b> .....	<b>10</b>
<b>3 Einleitung</b> .....	<b>12</b>
3.1 Natürliche Killer Zellen und ihre Funktion .....	12
3.1.1 Die Regulation der NK Zell-Funktion .....	13
3.1.2 NK Zell-Rezeptoren: Ihre Funktion und Liganden .....	14
3.2 Das HLA-B assoziierte Transkript 3 (BAT3) .....	16
3.3 Exosomen: Ihre Bildung und Funktion .....	19
3.4 Die chronische lymphatische Leukämie (B-CLL) .....	23
3.5 Der Entzündungsmediator MIF .....	24
3.6 Herstellung transgener Mausmodelle .....	25
3.7 Zielsetzung .....	27
<b>4 Material und Methode</b> .....	<b>28</b>
4.1 Standard molekularbiologische Methoden .....	28
4.1.1 PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ) .....	28
4.1.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten über Agarosegele .....	28
4.1.3 DNA-Verdau mittels Restriktionsenzyme und Ligation .....	29
4.1.4 Sequenzierung der Klonierungen .....	29
4.1.5 Lyse von NKL Zellen zur Gewinnung genomischer DNA .....	29
4.1.6 Präparation von RNA und cDNA-Synthese .....	30
4.1.7 Verwendete Primer für BAT3-Konstrukte .....	30
4.1.8 Verwendete Primer für die transgene Mauslinie .....	31
4.1.9 Verwendete Vektoren zur Klonierung von DNA-Konstrukten .....	32
4.1.10 Klonierungsstrategie der BAT3-Deletionskonstrukte .....	32
4.2 Mikrobiologische Methoden .....	33
4.2.1 Bakterien und Medien .....	33

4.2.2	Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien .....	34
4.2.3	FLIP-vermittelte Rekombinase in <i>E.coli</i> .....	34
4.2.4	Präparation von Plasmid-DNA .....	34
4.3	Methoden zu Mausexperimenten .....	35
4.3.1	Mikroinjektion von pNKp46Cre und pNKp46Cre-EBD in fertilisierte C57BL/6 Mausoozyten.....	35
4.3.2	Schwanzbiopsie und Typisierungs-PCR .....	35
4.4	Zellbiologische Methoden .....	36
4.4.1	Zelllinien, Zellmedien und Wachstumsbedingungen .....	36
4.4.2	Transiente Transfektion der Zellen .....	37
4.4.3	Transfektion mit siRNA .....	37
4.4.4	Transfektion von primären humanen NK Zellen mit AMAXA®.....	37
4.4.5	Zytotoxizitätsassay.....	38
4.5	Immunologische Nachweismethoden .....	39
4.5.1	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	39
4.5.2	Durchflusszytometrie .....	40
4.5.3	NK Zellseparation per MACS ( <i>Magnetic Activated Cell Sorting</i> ) .....	40
4.5.4	Anfertigung von Zytospins.....	40
4.5.5	Immunhistochemie und Immunzytochemie .....	41
4.6	Proteinbiochemische Nachweismethoden.....	41
4.6.1	SDS-PAGE und Western Blot Analyse .....	41
4.6.2	Proteinaufreinigung und Einengen von Überständen.....	42
4.6.3	Co-Immunpräzipitation .....	43
4.6.4	Affinitätschromatographie und Gelfiltration .....	43
4.6.5	Exosomenaufreinigung .....	44
4.7	Auswertung/Software .....	44
4.8	Verwendete Puffer.....	45
4.9	Verwendete Antikörper .....	45

<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
5.1	Die Aktivität von nSMase2 beeinflusst den exosomalen Transport von BAT3.....	48
5.2	Die Bedeutung der Proteindomänen für die Lokalisation und den Transport von BAT3 .....	55
5.2.1	Alle BAT3-Deletionsmutanten werden nach Transfektion in 293T Zellen exprimiert.....	56
5.3	Die UBL-Domäne ist für ein Targeting von BAT3 auf Exosomen essentiell.....	58
5.3.1	Die UBL-Domäne ist für die exosomale Expression notwendig ..	58
5.3.2	Die HRS-Bindedomäne verbessert den Transport von BAT3 .....	60
5.3.3	Endogenes BAT3 interagiert mit HRS.....	62
5.3.4	BAT3 co-lokalisiert mit HRS im Zytoplasma.....	63
5.4	Die Rolle und Funktion von BAT3 bei einer B-CLL.....	65
5.4.1	B-CLL Patienten weisen im Serum hohe Konzentration an löslichen BAT3 und MIF auf .....	65
5.4.2	Lösliches BAT3 aus B-CLL Seren wirkt inhibitorisch auf die Zytotoxizität von NK Zellen .....	68
5.4.3	Der Aktivierungsrezeptor CD16 wird nach Inkubation mit B-CLL Seren herunter reguliert.....	72
5.4.4	In Seren von B-CLL Patienten sind unterschiedliche Splicevarianten von BAT3 nachweisbar.....	75
5.4.5	Depletionsansätze zur Entfernung von BAT3 und MIF aus B-CLL Seren .....	77
5.5	Ergebnisse zur Etablierung einer konditionalen und induzierbaren NK Zell-spezifischen Cre-Maus .....	80
5.5.1	Die Klonierung des zellspezifischen Cre-Expressionsvektors.....	81
5.5.2	Cre wird unter der Kontrolle des NKp46-Promotors in humanen NK Zellen exprimiert.....	82
5.5.3	Die Mikroinjektion der Cre-Vektoren in C57BL/6 Mausoozyten ..	84
5.5.4	Screening putativ transgener C57BL/6-Tiere .....	84

5.5.5	Selektion der NKp46Cre- und NKp46Cre-EBD-Linien nach funktionaler Cre-Expression.....	85
5.5.6	Überprüfung der Cre-Expression mittels RNA-Analyse .....	86
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>88</b>
6.1	BAT3: Ein <i>leaderless danger</i> Molekül, das über Exosomen transportiert wird.....	88
6.2	Der Einfluss von BAT3 auf die NK Zell-Funktion: Eine Rolle für die Pathogenese bei der B-CLL? .....	91
6.3	Die NK Zell-spezifische Cre-Linie .....	95
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>98</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>107</b>
	<b>Erklärung.....</b>	<b>109</b>

## Abkürzungen

aa	Aminosäure ( <i>amino acid</i> )
AAA-ATPase	<i>ATPases Associated with diverse cellular Activities</i>
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
ADCC	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität ( <i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i> )
BAC	artifizielles Bakterien-Chromosom ( <i>bacterial artificial chromosome</i> )
BAG	Bcl-2-assoziiertes Athanogen
BAT3	HLA-B assoziiertes Transkript 3
bzw.	beziehungsweise
CD	Unterscheidungsgruppen ( <i>Cluster of Differentiation</i> )
cDNA	Komplementäre DNA
co-IP	Co-Immunpräzipitation
Cre	Cyclische Rekombinase ( <i>causes recombination</i> )
DC	Dendritische Zellen
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dsRNA	Doppelsträngige RNA ( <i>double-stranded RNA</i> )
EBD	Östrogenbindedomäne ( <i>Estrogen Binding Domain</i> )
eGFP	verstärkt grün fluoreszierendes Protein ( <i>enhanced green fluorescent protein</i> )
ER	Endoplasmatische Retikulum
ESCRT	<i>endosomal sorting complex required for transport</i>
eYFP	verstärkt gelb fluoreszierendes Protein ( <i>enhanced yellow fluorescent protein</i> )

## Abkürzungen

---

FLP	Rekombinase ( <i>benannt nach Flippase-Aktivität</i> )
FRT	FLP-Rekombinase-Zielprotein ( <i>FLP recombinase target</i> )
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung ( <i>fluorescence activated cell sorting</i> )
GA	Golgi Apparat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor ( <i>Granulocyte monocytes colony-stimulating factor</i> )
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HMGB1	<i>high-mobility group box 1</i>
HLA	humanes Leukozytenantigen
HRS	<i>hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate</i>
Hsp	Hitzeschockprotein ( <i>heat shock protein</i> )
ICAM	Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül ( <i>inter-cellular adhesion molecule</i> )
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKDC	Interferon-produzierende dendritische Killerzellen ( <i>interferon-producing killer dendritic cell</i> )
ITAM	Immunrezeptor Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv ( <i>immunoreceptor tyrosine-based activating motif</i> )
ITIM	Immunrezeptor Tyrosin-basiertes Inhibitionsmotiv ( <i>immunoreceptor tyrosin-based inhibition motif</i> )
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KIR	Killer Immunglobulin-ähnlicher Rezeptor ( <i>killer immunoglobulin-like receptor</i> )
LIR	Leukozyten Ig-ähnlicher Rezeptor ( <i>leukocyte Ig-like receptor</i> )

## Abkürzungen

---

loxP	<i>locus of crossing (x)-over in P1</i>
MACS®	Magnet-aktivierte Zellsortierung ( <i>magnetic activated cell sorting</i> )
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
MICA/MICB	<i>MHC class I-chain related A / B</i>
MIF	Makrophagen Migrationsinhibitorischer Faktor ( <i>macrophage migration inhibitory factor</i> )
MVB	Multivesikuläres Körperchen ( <i>Multivesicular Body</i> )
NCR	Natürlicher Zytotoxizitätsrezeptor ( <i>Natural Cytotoxicity Receptor</i> )
NHR	Nukleärer Hormonrezeptor
NKG2D	Natürliche Killer Gruppe 2, Mitglied D ( <i>natural killer group2 member D</i> )
NKp46	<i>natural killer cell protein 46</i>
NKT	Natürliche Killer-ähnliche T-Zellen ( <i>natural killer-like T cell</i> )
NK Zellen	Natürliche Killer Zellen
NLS	Nukleäre Lokalisationssequenz ( <i>nuclear localization Sequence</i> )
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes ( <i>peripheral blood mononuclear cell</i> )
PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PI-3Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PRD	Prolin-reiche Domäne
pZ/EG	Bezeichnung für Plasmid mit lacZ und eGFP Sequenz
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>Ribonucleic acid</i> )
rpm	Runden pro Minuten ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
SA	Scavenger Rezeptor A
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SHP	<i>Src homology 2 domain-containing protein tyrosine-phosphatase</i>
nSMase	neutrale Sphingomyelinase

## Abkürzungen

---

SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
ssRNA	Einzelstrang-RNA ( <i>single-stranded RNA</i> )
STAM 1	Signaltransduktion-Adaptermolekül ( <i>signal transducing adaptor molecule 1</i> )
Syc	Milz-Tyrosin-Kinase ( <i>spleen tyrosine kinase</i> )
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor ( <i>toll like receptor</i> )
TNF	Tumor Nekrose Faktor
tpA	Gewebespezifischer Plasminogenaktivator ( <i>Tissue plasminogen activator</i> )
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TSAP6	<i>tumor suppressor-activated pathway 6</i>
Tsg101	<i>tumor susceptibility gene 101</i>
u.a.	unter anderem
ULBP1-4	UL 16-Bindeprotein 1-4 ( <i>UL16-binding protein 1-4</i> )
UBL	Ubiquitin ähnlich ( <i>ubiquitin like</i> )
UIM	Ubiquitin-Interaktionsmotiv ( <i>ubiquitin-interacting motif</i> )
Vps	<i>vacuolar protein sorting</i>
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein ( <i>yellow fluorescent protein</i> )
Zap70	Zeta-Kette-assoziierte Proteinkinase 70 ( <i>zeta-chain-associated protein kinase 70</i> )
z.B.	zum Beispiel

## 1 Abstract

Natural Killer (NK) cells are lymphocytes of the innate immune system and play a fundamental role in the defense against tumor cells and their surveillance. The nuclear protein HLA-B associated transcript 3 (BAT3) is a ligand for NKp30, which is a member of NCRs (Natural Cytotoxicity Receptor) and belongs to the activating NK cell-receptors. Expression of BAT3 is stress-induced and results in the secretion into the extra-cellular environment. There, it interacts with NKp30 on NK cells and has an influence on NK cell-function.

In this work it was proven, that BAT3 is transported out of the cells via an exosomal pathway. Exosomes are extra-cellular vesicles with a size of 50 to 100 nm and play an important role in cell-cell communication. BAT3 was detected on the exosomal surface. Furthermore the secretion of BAT3 correlated with the activity of nSMase2, an enzyme which is essential for the biogenesis of exosomes. In addition, deletion mutants showed that the N-terminus of BAT3 is most important for the exosomal transport. This part of the sequence served as an “exosomal targeting” sequence for a reporter protein (GFP). The sequence range comprises an UBL domain and a HRS binding motif. It is known that the HRS protein from the ESCRT-0 complex interacts with ubiquitinated proteins and controls their packing in/on exosomes. Co-immunoprecipitation showed an interaction between BAT3 and HRS.

NK cell-activity is inhibited in many hematopoietic tumors. In this work the function of BAT3 regarding B-CLL was investigated. In 2/3 of the analyzed B-CLL sera a higher BAT3 expression level compared to healthy donors was shown. But compared to healthy donors, BAT3 was not exosomal bound – it was almost exclusively a soluble protein. NK cytotoxicity was drastically inhibited, when NK cells of healthy donors were incubated with B-CLL sera or recombinant, soluble BAT3. In contrast to healthy probands (10/10), B-CLL patients (8/10) expressed a BAT3 splice variant with a deleted HRS binding domain. This could be the reason for the decreased expression of exosomal BAT3, which results in a reduced NK cell-activity.

Beginning this work, no genetic model for the research of NK cells existed. For this reason a NK cell-specific Cre mouse line was developed. The expression of Cre was controlled by the human minimal promoter NKp46. This construct was functional in cell lines and is useful for the creation of transgenic lines. These animal models could be used for the analysis of the *in vivo* role of the BAT3/NK activity in the pathogenesis of B-CLL.

## 2 Zusammenfassung

Natürliche Killer (NK) Zellen sind Lymphozyten des angeborenen Immunsystems und spielen eine wichtige Rolle bei der Erkennung von Tumorzellen und *Tumor surveillance*. Das intrazelluläre Protein HLA-B assoziierte Transkript 3 (BAT3) ist ein Ligand für den NK Zellrezeptor NKp30. Dieser ist ein Mitglied der *natural cytotoxicity receptors* (NCRs) und gehört zu den aktivierenden Rezeptoren der NK Zellen. Untypisch für NK Zell-Liganden ist, dass BAT3 konstitutiv intrazellulär exprimiert und erst in Antwort auf zellulären Stress in das extrazelluläre Milieu abgegeben wird. Der extrazelluläre Faktor interagiert mit NKp30 auf NK Zellen und kann die NK Zell-Funktion beeinflussen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass BAT3 über einen exosomal Transportweg aus der Zelle transportiert wird. Exosomen sind extrazelluläre Membranvesikel von 50-100 nm, die eine wichtige Rolle bei der Zell-Zell-Kommunikation spielen. BAT3 konnte auf der Oberfläche von Exosomen nachgewiesen werden. Darüber hinaus korrelierte die Sekretion von BAT3 mit der nSMase2-Aktivität, einem Enzym, das für die Biogenese von Exosomen essentiell ist. Weiterhin zeigten Deletionsmutanten, dass der N-Terminus von BAT3 für den exosomal Transport absolut notwendig ist. Dieser Sequenzabschnitt diente als "Exosomen Targeting" Sequenz für ein Reporterprotein (GFP). Der Sequenzbereich umfasst eine UBL-Domäne und eine HRS-Bindestelle. Es ist bekannt, dass das HRS-Protein aus dem ESCRT-0-Komplex mit ubiquitinierten Proteinen interagiert und die Verpackung von Proteinen in/auf Exosomen steuert. Co-Immunpräzipitationen zeigten eine Interaktion von BAT3 und HRS.

Die Aktivität von NK Zellen ist bei vielen hämatopoetischen Tumoren gehemmt. In dieser Arbeit wurde die Funktion von BAT3 bei der B-CLL untersucht. Das Expressionslevel von BAT3 war bei 2/3 der analysierten B-CLL Seren (70) im Vergleich zu gesunden Probanden erhöht. BAT3 lag hier, anders als bei gesunden Spendern, aber nicht exosomal-gebunden vor, sondern fast ausschließlich als lösliches Protein. Die Inkubation von NK Zellen gesunder Spender mit Seren von CLL Patienten oder mit rekombinantem, löslichem BAT3 inhibierte die NK-Zytotoxizität drastisch. Im Gegensatz zu gesunden Spendern (10/10) exprimieren Patienten mit B-CLL (8/10) eine BAT3 Splicevariante, bei der die HRS-Bindesequenz deletiert ist. Dies könnte ein Grund für die defiziente, exosomale BAT3 Expression sein, die letztlich zur verminderten NK Zell-Aktivität führt.

Zu Beginn dieser Arbeit gab es noch keine genetischen Modelle zum Studium von NK Zellen. Aus diesem Grund wurde mit der Etablierung einer NK Zell-spezifischen Cre-Mauslinie begonnen. Die Expression von Cre stand dabei unter dem Einfluss des humanen Minimalpromotors von NKp46. Das Konstrukt war in Zelllinien funktionell und ist somit zur Herstellung transgener Linien geeignet. Dieses Tiermodell könnte zur Untersuchung der *in vivo* Rolle von BAT3/NK-Aktivität für die Pathogenese der B-CLL eingesetzt werden.

## 3 Einleitung

### 3.1 Natürliche Killer Zellen und ihre Funktion

Natürliche Killer (NK) Zellen gehören zu den Lymphozyten und werden im Knochenmark gebildet. Reife Zellen befinden sich größtenteils in der Milz, aber auch in anderen lymphatischen und nicht-lymphatischen Organen [Hanna, Gonen-Gross et al. 2004; Grundy and Sentman 2006]. Im peripheren Blut machen sie 10% der Zellen aus. Ihre wichtigsten Funktionen sind (I) die Erkennung virusinfizierter Zellen und Tumorzellen, (II) eine gerichtete Zytotoxizität, (III) die Ausschüttung von Zytokinen und (IV) die antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC). Obwohl sie Eigenschaften besitzen, die ebenfalls den klassischen T-Zellen zugeschrieben werden, bilden sie eine eigenständige Population. Im Unterschied zu T- und B-Zellen besitzen NK Zellen keine antigenspezifischen Rezeptoren, weshalb sie dem angeborenem Immunsystem zugeordnet werden [Biron, Nguyen et al. 1999; Vivier, Tomasello et al. 2008; Moretta, Bottino et al. 2002]. Gleichzeitig bilden sie aber auch eine Brücke zwischen dem unspezifischen und dem adaptiven Immunsystem. NK Zellen können durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs) wie Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen (DC) aktiviert werden. APCs sekretieren dabei Chemokine und Zytokine (IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 und  $\text{IFN}\gamma$ ), welche für die Rekrutierung und Aktivierung der NK Zellen eine wichtige Rolle spielen. Weiterhin bedeutend für die Aktivierung von NK Zellen ist die Abgabe von IgG's durch Lymphozyten, die zur ADCC führt [Lucas, Schachterle et al. 2007; Walzer, Dalod et al. 2005; Pandey, DeStephan et al. 2007; Girart, Fuertes et al. 2007; Kalinski, Mailliard et al. 2005; Markel, Seidman et al. 2009]. Besonders bedeutend ist der „*cross-talk*“ zwischen DCs und NK Zellen, der über den *Natural Cytotoxicity Receptor* NCR3 (NKp30) vermittelt wird [Vitale, Della Chiesa et al. 2005; Ferlazzo, Tsang et al. 2002].

Die Lyse von Zielzellen ist ein komplexer Prozess, der über zahlreiche Oberflächenrezeptoren der NK Zellen vermittelt wird. Dazu gehört zum einen die Induktion des extrinsischen Apoptosewegs, der über die Bindung von Liganden an Todesrezeptoren vermittelt wird. Diese umfasst die Mitglieder der TNF und TNF-Rezeptor Familie Fas (CD95) / Fas-Ligand (CD95-Ligand) und TRAIL-Rezeptor / TRAIL [Falschlehner, Schaefer et al. 2009]. Ein weiterer Mechanismus, der zur Lyse von Zellen führt, ist die Freisetzung von Perforin und Granzymen über immunologische Synapsen [Moretta, Marcenaro et al. 2008].

NK Zellen tragen entscheidend zur Eliminierung von Tumorzellen bei, was in verschiedenen Mausexperimenten gezeigt werden konnte. Beispielsweise wurde in der Arbeit von Hayakawa et al. [Hayakawa und Smyth 2006] im Mausmodell Tumorzellen transplantiert und gleichzeitig NK Zellen depletiert. Dies führte zu verstärktem Tumorzellwachstum und Metastasierung. Die Injektion von reifen NK Zellen in dieses Mausmodell führte hingegen zu einer vollständigen Regression der Tumore. Auch beim Menschen konnte eine Korrelation zwischen NK Zell-Funktion und Tumorzellwachstum gezeigt werden [Ruggeri, Mancusi et al. 2006].

### 3.1.1 Die Regulation der NK Zell-Funktion

Die Funktion von NK Zellen wird durch ein komplexes Zusammenspiel aktivierender und inhibierender Rezeptoren reguliert und ist ebenfalls abhängig von Zytokinen des umgebenden Milieus.

Die Regulation der NK Zellen durch „*missing self*“ beruht auf der Interaktion von körpereigenen MHC I-Molekülen mit den inhibitorischen Rezeptoren auf der NK Zelloberfläche. Diese Rezeptoren werden als *killer immunoglobulin (Ig)-like receptors* (KIRs) bezeichnet und erkennen verschiedene Allele der HLA-A, HLA-B oder HLA-C Moleküle. Weitere Rezeptoren, die bei der Erkennung von HLA-Molekülen eine Rolle spielen, sind CD94-NKG2A und *leukocyte immunoglobulin-like receptors* (LIRs). Reife NK Zellen exprimieren immer nur einen Teil, aber mindestens einen der inhibitorischen Rezeptoren. Dies ermöglicht die Erkennung der kompletten Bandbreite an HLA-Allelen durch NK Zellen. Mitglieder aus der Familie der inhibitorischen Rezeptoren besitzen intrazellulär inhibitorische Signaldomänen, die sogenannten *immunoreceptor tyrosin-based inhibition motif* (ITIM) [Vivier und Romagne 2007; Moretta, Bottino et al. 2002; Raulet 2006; Raulet 2004].

Weiterhin wird die NK Zell-Funktion durch „*induced self*“-Erkennung reguliert. Hierbei spielen aktivierende Rezeptoren wie NKG2D, CD16 und die *natural cytotoxicity receptors* (NCRs) NKp30, NKp44 und NKp46 eine wichtige Rolle. Nach Bindung des Liganden an die Rezeptoren wird die NK Zell-Funktion aktiviert. NCRs besitzen intrazellulär *immune tyrosine-based activating motifs* (ITAMs), die nach der Bindung der Liganden durch die Tyrosinkinasen Zap70 und Syk phosphoryliert werden. Über eine anschließende Signalkaskade kommt es zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NFAT und NF $\kappa$ B, die gezielt die Transkription von Zytokinen bewirken oder aber die Freisetzung von zytotoxischen Granula bedingen [Vivier und Romagne 2007; Kalinski, Mailliard et al. 2005; Moretta, Bottino et al. 2002; Moretta, Bottino et al. 2001; Raulet 2006; Raulet 2004].

### 3.1.2 NK Zell-Rezeptoren: Ihre Funktion und Liganden

Zu den aktivierenden Rezeptoren der NK Zellen gehören CD16/CD56, NKG2D, DNAM-1, 2B4, NKp80 und die Gruppe der NCRs.

Der Rezeptor CD16 (Fc $\gamma$ RIIIA) bindet mit geringer Affinität an das Fc-Fragment von IgG. Diese Eigenschaft ermöglicht neben der direkten Lyse von Zielzellen auch eine antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC), bei der opsonierte Zielzellen durch Zytolyse eliminiert werden. CD16 ist charakterisiert durch eine  $\alpha$ -Kette, die an IgG bindet und anschließend mit signalübertragenden Adapterproteinen assoziiert. Das CD16/CD56 Expressionsverhältnis dient zur Unterscheidung von NK Zell-Subpopulationen mit unterschiedlicher Funktion und Lokalisation. NK Zellen mit hohem Anteil an CD16 (CD16<sup>bright</sup>) und wenig CD56 (CD56<sup>dim</sup>) bilden viel zytotoxische Granula und sind auch hauptsächlich an der Zytolyse beteiligt. CD56<sup>bright</sup> NK Zellen zeigen dagegen vermehrte Zytokinexpression (z.B. IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-10, IL-13 und GM-CSF) [Moretta, Marcenaro et al. 2008; Konjevic, Mirjagic Martinovic et al. 2009; Trotta, Col et al. 2008].

Die Aktivierung der Zytotoxizität und Zytokinausschüttung erfordert die simultane Stimulierung verschiedener Rezeptoren wie z.B. die Kombination von NKG2D und CD16 [Bryceson, Ljunggren et al. 2009].

Der Rezeptor NKG2D ist ein Homodimer C-Typ 2 Lectin-ähnlicher Rezeptor und ist Mitglied der NKG2-Familie. Anders als NKp46 und NKp30 hat NKG2D intrazellulär keine ITAM-Motive und benötigt zytoplasmatische Adaptermoleküle wie DAP10 oder KAP10. DAP10 ist charakterisiert durch ein YxxM-Motiv, das durch die PI-3Kinase am Tyrosinrest phosphoryliert wird [Moretta, Bottino et al. 2001; von Strandmann, Hansen et al. 2006]. NKG2D wird nicht ausschließlich auf NK Zellen exprimiert, sondern auch auf  $\gamma\delta$ -TcR<sup>+</sup> T-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen [Cerwenka, Baron et al. 2001; Moretta, Bottino et al. 2001; Raulet 2004]. Die humanen Liganden von NKG2D sind die Mitglieder der ULBP-Familie (ULBP1-4) und die MHC I-Kette ähnliche Molekül A und B (MIC A/B) [Santoro, Cannella et al.] (siehe Abb. 3.1). MICA ist ein stressreguliertes polymorphes Molekül, das von normalen Zellen nicht exprimiert wird, aber durch Zellaktivierung, während der DNA-Reparatur und Transformation hoch reguliert wird [Girart, Fuertes et al. 2007; Markel, Seidman et al. 2009; Raulet 2004; Moretta, Biassoni et al. 2002]. Die löslichen Liganden regulieren NKG2D herunter und bedingen eine tumorassoziierte Inhibition der NK Zell-Funktion [Ashiru, Boutet et al. 2010; Fernandez-Messina, Ashiru et al. 2010]. Es wurde kürzlich gezeigt, dass

lösliche NKG2D-Liganden (sNKG2DL) in B-CLL Seren vorkommen und NK und T-Zellen in ihrer Funktion inhibieren [Nuckel, Switala et al. 2010].

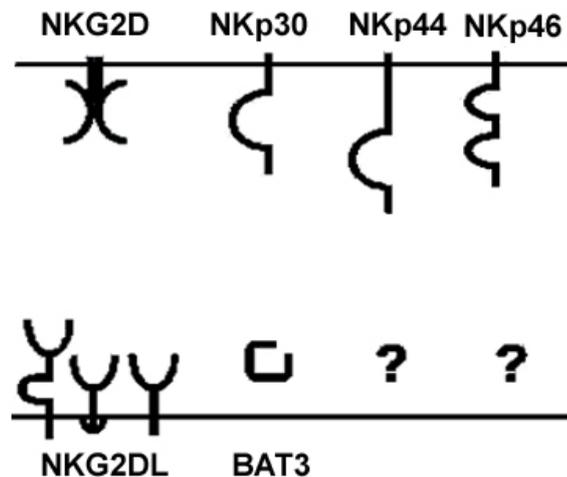


Abb. 3.1 Darstellung aktivierender NK Zellrezeptoren und ihrer Liganden [Waldhauer and Steinle 2008].

Die NCRs umfassen die Rezeptoren NKp46 (NCR1), NKp44 (NCR2) und NKp30 (NCR3) (siehe Abb. 3.1). Sie werden ausschließlich auf NK Zellen exprimiert und gehören zur Immunglobulin(Ig)-Superfamilie. NKp46 und NKp30 besitzen intrazellulär *immune tyrosine-based activating motifs* (ITAMs) und assoziieren mit CD3 $\zeta$ -Ketten. Nach der Bindung der Liganden werden die ITAMs durch die Tyrosinkinase Zap70 und Syk phosphoryliert. Über eine anschließende Signalkaskade kommt es zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NFAT und NF $\kappa$ B, die gezielt die Transkription von Zytokinen bewirken oder aber die Freisetzung von zytotoxischen Granular bedingen [Moretta, Bottino et al. 2001]. Außerdem kommt es durch die Aktivierung von Syk und ZAP70 zum Kalziumeinstrom und schließlich zur Abgabe von Perforin an die Zielzelle [Pandey, DeStephan et al. 2007].

NKp46 assoziiert neben den CD3 $\zeta$ -Ketten noch mit dem Adapterprotein Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ , wo über Disulfid-Brücken und somit Homodimere oder Heterodimer gebildet werden können. NKp44 besitzt im Gegensatz zu NKp46 und NKp30 intrazellulär keine ITAM-Domäne, assoziiert aber mit den Signalproteinen KARAP/DAP12, die ITAMs aufweisen. Die Transmembrandomänen der NCRs sind positiv geladen und können dadurch mit Proteinen der Signalkaskade assoziieren. Extrazellulär besitzt NKp46 zwei C2-Typ Ig-ähnliche Domänen, NKp44 und NKp30 haben eine einfache V-Typ-Domäne. Während NKp46 und NKp30 konstitutiv exprimiert werden, wird NKp44 nur

bei aktivierten NK Zellen hoch reguliert. Über NKp30 können NK Zellen mit DC's in Kontakt treten („*cross talk*“) und diese zur Reifung stimulieren oder unreife DC's lysieren [Vitale, Della Chiesa et al. 2005; Ferlazzo, Tsang et al. 2002].

Die Liganden der NCRs sind weitestgehend unbekannt. Für NKp46 ist bekannt, dass er virale Hämagglutinine und membran-assoziierte Heparansulfat-Proteoglykane auf Tumorzellen erkennt [Mandelboim und Porgador 2001; Porgador 2005]. Außerdem wurde gezeigt, dass auch Vimentin, ein Protein des Zytoskeletts mit Beteiligung an Signaltransduktionen, an NKp46 binden kann [Garg, Barnes et al. 2006]. NKp44 bindet ebenfalls an Hämagglutinine. Für NKp30 wurden bisher zwei funktionale Liganden beschrieben B7.H6 und das Protein HLA-B assoziierte Transkript 3 (BAT3) [Byrd, Hoffmann et al. 2007; Pogge von Strandmann, Simhadri et al. 2007; Simhadri, Reiners et al. 2008; Brandt, Baratin et al. 2009].

### 3.2 Das HLA-B assoziierte Transkript 3 (BAT3)

Das HLA-B assoziierte Transkript 3 (BAT3), auch bekannt unter Bag-6/BAG6 oder dem *Xenopus*-Homolog Scythe, wurde erst kürzlich als Ligand von NKp30 charakterisiert. Die Bindung von BAT3 an NKp30 induziert die Aktivierung der NK Zell-Funktion [Pogge von Strandmann, Simhadri et al. 2007; Simhadri, Reiners et al. 2008]. BAT3 ist einerseits nukleär exprimiert und es sind verschiedene intrazelluläre Funktionen beschrieben. Andererseits wird BAT3 von Zellen ins im extrazellulären Milieu sekretiert. Der Transport vom Nukleus ins extrazelluläre Milieu ist bisher noch unklar und wurde in dieser Arbeit näher untersucht.

BAT3 ist im humanen Genom auf Chromosom 6, genauer 6p21.3, lokalisiert. Ursprünglich wurde es als Gen innerhalb des MHC III-Cluster entdeckt, zusammen mit Genen, die Mitglieder der Komplementkaskade kodieren und den Sequenzen von Hsp70, TNF  $\alpha$  und  $\beta$ . In den MHC-Clustern befinden sich auch noch weitere kodierte Gene von Mitgliedern des Immunsystems, wie z.B. die Sequenzen der NCR's und MIC A/B [Banerji, Sands et al. 1990; Hsieh, Lin et al. 2010; Sasaki, Gan et al. 2007].

Das vollständige Transkript von BAT3 hat eine Länge von 3,4 kb und das Protein mit 1132 aa ein Molekulargewicht von ca. 130 kDa. Die Sequenz enthält 25 Exons, aus denen vier natürlich vorkommende Splicevarianten von BAT3 beschrieben sind. Die Sequenz von BAT3 kodiert mehrere Domänen, die funktional noch wenig charakterisiert sind (siehe Abb. 3.2).

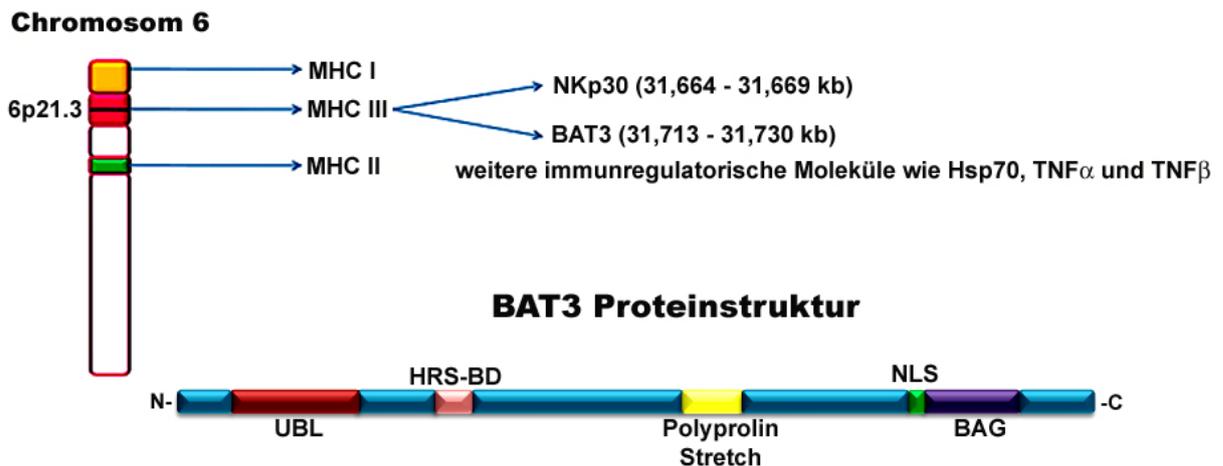
Bereits in der Promotorregion von BAT3 lassen sich erste wichtige Elemente nachweisen. So befindet sich an der Position -125 aa ein *heat shock element*, was darauf hinweist, dass BAT3 durch Stresseinwirkung reguliert wird [Banerji, Sands et al. 1990]. Es konnte gezeigt werden, dass BAT3 nach Hitzeschock induziert wird und seinerseits für die Anreicherung und Regulation von Hsp70 verantwortlich ist [Corduan, Lecomte et al. 2009].

Im N-Terminus des Proteins im Bereich 17-88 aa befindet sich eine *ubiquitin-like* Domäne (UBL) und im Anschluss bei 259-263 aa eine HRS-Bindedomäne mit dem Bindemotiv PTPAP. Es ist bekannt, dass Proteine, die eine UBL-Domäne besitzen, mit dem HRS-Protein eines intrazellulären Transportkomplexes interagieren können [Raiborg, Bache et al. 2002].

Die Abschnitte 195-273 aa sowie 394-681 aa weisen Prolin-reiche Domänen (PRD) auf. Diese sind oft maßgebend für Protein-Protein-Wechselwirkungen in der Zelle und begünstigen besonders bei Signalübertragungen die Bindung an Signalproteine, ohne dabei eine hohe Affinität zum Bindungspartner aufzuweisen. Des Weiteren sind Prolinreste häufig an der Struktur von Proteinen beteiligt, da sie als Strukturbrecher der  $\alpha$ -Helices in der Sekundärstruktur bekannt sind.

BAT3 besitzt zudem eine Schnittstelle für Caspase 3 (1001-1002 aa) mit dem Motiv DEQD<sup>1001</sup>, der eine regulatorische Rolle bei der Apoptose zugeschrieben wird [Manchen und Hubberstey 2001; Wu, Shih et al. 2004; Desmots, Russell et al. 2005].

Im Bereich 1030-1055 aa befinden sich mehrere *nuclear localization site* (NLS), welche dafür verantwortlich sind, dass BAT3 überwiegend im Zellkern lokalisiert ist [Manchen und Hubberstey 2001]. Im Anschluss an die NLS von 1055-1111 aa ist eine *Bcl-2-associated athanogene* (BAG) Domäne kodiert. Proteine der BAG-Familie können mit Mitgliedern der Hsp-Familie interagieren. So bindet die BAG-Domäne an die ATPase-Domäne von Hsp70 und reguliert somit die Aktivität des Chaperons [Desmots, Russell et al. 2005].



**Abb. 3.2 Proteinstruktur von BAT3.** Abkürzungen: BAT3: HLA-B assoziiertes Transkript 3; UBL: *ubiquitin like*; HRS-BD: HRS-Bindedomäne; NLS: *nuclear localization site*; BAG: Bcl-2-assoziiertes Athanogen.

Neben diesen beschriebenen Domänen gibt es für BAT3 keine Hinweise auf *leader*-Sequenzen, Glycosylphosphatidylinositol-(GPI) Anker oder Transmembrandomänen, die bei extrazellulären Proteinen häufig vorkommen.

Für BAT3 wurden bereits neben der Funktion als Ligand für NKp30 noch weitere Funktionen beschrieben. So wirkt BAT3 regulatorisch bei Apoptose. Eine durch DNA-Schäden induzierte Phosphorylierung des Tumorsuppressorgens p53 führt zu einer Anreicherung von p53. Dabei wird p53 durch Acetylasen wie p300 acetyliert, was die Bindung von p53 an die DNA ermöglicht. Es wurde gezeigt, dass in Abwesenheit von BAT3 p53 nicht durch p300 acetyliert wird und somit die Transkriptionsaktivität für bestimmte Gene von p53 unterbunden wird [Sasaki, Gan et al. 2007]. Außerdem konnte für das BAT3-Homolog Scythe aus dem Organismus *Xenopus* eine Interaktion mit den Apoptose induzierenden Proteinen Reaper, Hid und Grim nachgewiesen werden [Desmots, Russell et al. 2005; Thress, Evans et al. 1999]. Es konnte auch eine Ricin-induzierte Spaltung von BAT3 durch Caspase3 an der Caspase3-site gezeigt werden, wobei das C-terminale BAT3-Fragment die Apoptose induziert [Wu, Shih et al. 2004].

BAT3 wurde auch als co-Chaperon von Hsp70 identifiziert. Die BAG-Domäne bindet an die ATPase-Domäne von Hsp70 und kann damit die Funktion von Hsp70 beeinflussen [Desmots, Russell et al. 2005; Gehrman, Marienhagen et al. 2005; Corduan, Lecomte et al. 2009]. BAT3-defiziente Mäuse zeigten, dass Hsp70 polyubiquitinyliert

und verstärkt abgebaut wird, wodurch BAT3 auch eine regulatorische Funktion von Hsp70-2 in der Spermatogenese übernimmt [Sasaki, Marcon et al. 2008]. Je nach genetischen Hintergrund sind BAT3-*knockout* Mäuse pränatal letal, was für eine Rolle bei der Zellproliferation und Entwicklung spricht [Desmots, Russell et al. 2005].

Die Gruppe von Choi et al. belegte außerdem eine Interaktion von BAT3 mit dem TGF $\beta$ -Rezeptor und folgerte daraus eine mögliche positive Regulation des TGF $\beta$ -Signalwegs [Kwak, Kim et al. 2008].

Über die extrazelluläre Funktion von BAT3 ist bekannt, dass BAT3 den Aktivierungszustand von NK Zellen beeinflussen kann [Pogge von Strandmann, Simhadri et al. 2007]. Erste Daten in dieser Gruppe weisen darauf hin, dass extrazelluläres BAT3 auf der Oberfläche von Exosomen ist [Simhadri 2008; Simhadri, Reiners et al. 2008].

### 3.3 Exosomen: Ihre Bildung und Funktion

Exosomen wurden vor 30 Jahren zum ersten Mal als kleine intrazelluläre Vesikel beschrieben. Sie sind ca. 50-100 nm groß, besitzen eine Lipiddoppelmembran und werden von verschiedenen Zelltypen über den „nicht-klassischen Transportweg“ in den interzellulären Raum abgegeben. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Immunzellen wie dendritische Zellen, B-Zellen, T-Zellen, Mastzellen, aber auch Epithelzellen, Schwann'sche Zellen und einige Tumorzellen [van Niel, Porto-Carreiro et al. 2006]. Entsprechend ihrer Ursprungszellen gestaltet sich die Zusammensetzung der Oberflächenmoleküle auf den Exosomen und der Proteine im Lumen der Exosomen. So besitzen die Exosomen von immunologischen Zellen auf ihrer Oberfläche MHC-Komplexe, Tetraspanine (z.B. CD9 und CD63), Integrine, ICAM's, Hsp70, Proteine des Zytoskeletts und weitere zelltypische Oberflächenmoleküle. Im Lumen der Exosomen von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen sind u.a. zytotoxische Granula enthalten, die nach Andocken und Fusion mit der Zielzelle zum Zelltod führen [Blanchard, Lankar et al. 2002; Thery, Ostrowski et al. 2009; Herz, Pardo et al. 2009]. Die Exosomen von Tumorzellen enthalten ebenfalls Hsp70 und charakteristische Oberflächenmoleküle, die zur Erkennung durch Immunzellen beitragen [Gastpar, Gehrman et al. 2005]. Somit spielt die Beschaffenheit der Oberfläche von Exosomen eine besonders wichtige Rolle bei der Zell-Zell-Kommunikation. Von dendritischen Zellen abgesonderte Exosomen aktivieren NK Zellen, sowie B- und T-Zellen und verbinden dadurch das unspezifische mit dem adaptiven Immunsystem [Johnstone 2006; Thery, Ostrowski et al. 2009; Ahmed, Munegowda et al. 2008; Zitvogel, Regnault et al. 1998; Simhadri, Reiners et al. 2008]. NK Zellen werden durch die Exosomen von DCs rekrutiert und

in ihrer Zytotoxizität aktiviert. Ein Aspekt bei der Aktivierung der NK Zellen spielt die Herkunft der Exosomen. Durch Hsp70-positive Exosomen werden NK Zellen zur Abgabe von Granzym B stimuliert und lösen damit Apoptose in den Zielzellen aus. Hierbei spielt sowohl die Funktion von membran-ständigen Hsp70, das für die Aktivierung der Zytotoxizität verantwortlich ist, als auch die Konzentration von Hsp70 eine elementare Rolle [Gastpar, Gehrmann et al. 2005; They, Ostrowski et al. 2009]. Dabei werden Tumorzellen, die viel Hsp70 produzieren, signifikant stärker lysiert, als Tumorzellen mit einer geringen Hsp70-Konzentration. Auch BAT3, das mit Hsp70 über die BAG-Domäne interagiert, ist nach ersten Daten auf Exosomen von DC's nachweisbar und kann NK Zellen aktivieren [Simhadri, Reiners et al. 2008]. Im Gegensatz dazu wird das zytotoxische Verhalten von T- und NK Zellen durch Exosomen der Brustkrebszelllinie T47d negativ beeinflusst. Der Aktivierungsrezeptor NKG2D wird nach Inkubation mit diesen Exosomen herunter reguliert und die Zytotoxizität inhibiert [Clayton und Tabi 2005]. Somit wirken nicht alle von Tumoren abge sonderte Exosomen aktivierend - einige inhibieren sogar die NK Zell-Funktion. Es konnte gezeigt werden, dass über CD95-Ligand (CD95L) Apoptose in T-Zellen induziert wird, welche z.B. die Expression von CD3 $\zeta$  bei T-Zellen reduzieren [They, Zitvogel et al. 2002].

Die Sekretion der Exosomen wird u.a. durch p53 als Antwort auf Zellstress und DNA-Schäden vermittelt. Die Aktivierung von p53 induziert die Transkription zahlreicher Gene, wie die von TSAP6 (*tumor suppressor-activating pathway 6*). TSAP6 ist ein Transmembranprotein, das am Transport von Proteinen zu Exosomen oder an der Regulation der Exosomenbildung beteiligt ist. Die verstärkte Transkription von TSAP6 als Antwort auf Zellstress, führt zu einer vermehrten Exosomenfreisetzung [Yu, Harris et al. 2006; Lespagnol, Duflaut et al. 2008]. Auch ein Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels resultiert in einer erhöhten Sekretion von Exosomen bei Mastzellen [van Niel, Porto-Carreiro et al. 2006].

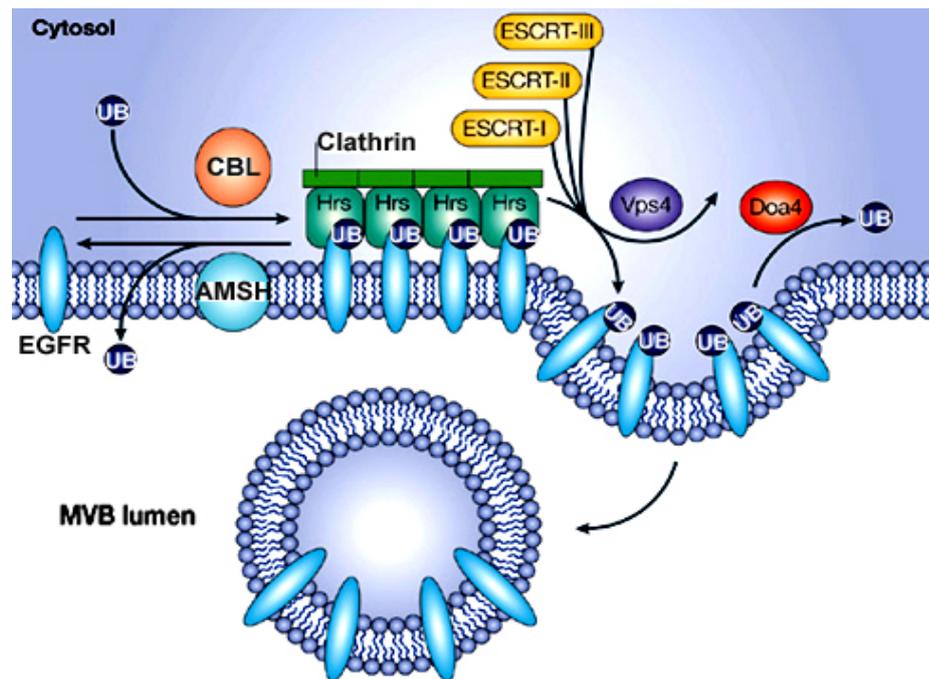
Die Bildung der Exosomen findet in sogenannten *multi vesikular bodies* (MVBs) statt. Diese entwickeln sich aus frühen Endosomen und übernehmen das Recyclen von Oberflächenproteinen oder den Abbau durch die Fusion mit Lysosomen, weshalb sie auch als späte Endosomen bezeichnet werden. MVBs können mit der Plasmamembran fusionieren und dabei die Exosomen ins extrazelluläre Milieu abgeben. Für das Andocken und die Fusion mit der Plasmamembran sind Proteine der Rab-Familie (Rab7, Rab11) und SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*) verantwortlich [van Niel, Porto-Carreiro et al. 2006].

Bei der Synthese von Exosomen spielt die neutrale Sphingomyelinase 2 (nSMase 2) eine wichtige Rolle. Diese hat N-terminal zwei hydrophobe Segmente, die eine Loka-

lisation an Membranen ermöglichen. Am C-Terminus befindet sich eine katalytische Domäne. Die Katalyseaktivität ist abhängig vom pH-Wert, wobei die nSMase 2 ihre höchste Aktivität im neutralen Milieu hat. Sie katalysiert die Spaltung von Sphingomyelin, eines Lipids vieler Membranen. Sphingomyelin ist auch ein Bestandteil der MVB-Membran. Nach der Spaltung der Phosphodiesterbindungen entstehen als Produkte Phosphocholin und Ceramid. Ceramide sind an vielen Prozessen in der Zelle beteiligt, vor allem an der Regulation von Zellwachstum, Differenzierung, Apoptose, Signaling und Entzündungsreaktionen. An MVBs unterstützen Ceramide das Einstülpen der Membran und es kommt zur Bildung von intraluminalen Vesikeln bzw. Exosomen. Die *acid* SMase (aSMase) aus der Familie der SMasen ist z.B. an der Bildung sekretorischer Vesikel von T- und NK Zellen beteiligt, die gefüllt mit Perforin und Granzymen freigesetzt werden, um ihre Zielzellen zu lysieren. Die Aktivität von nSMase 2 lässt sich spezifisch durch den Inhibitor GW4869 hemmen [Kim, Okimoto et al. 2008; They, Ostrowski et al. 2009; Wu, Clarke et al. 2010; Herz, Pardo et al. 2009; Marchesini, Osta et al. 2004].

Mutationen im nSMase2-Gen (*SMPD3*) können Auslöser für Krankheiten wie der Niemann Pick Krankheit sein und sind mit verschiedenen Leukämien assoziiert. Die Niemann Pick Krankheit wird durch einen Enzymdefekt hervorgerufen und führt zur Speicherung von Sphingomyelin in Lysosomen von Leber, Milz, Knochenmark und Gehirn. Genanalysen bei AML- (akute myeloide Leukämie) und ALL-Patienten (akute lymphatische Leukämie) zeigten in 5% bzw. 6% der untersuchten Fälle Mutationen in *SMPD3* [Kim, Okimoto et al. 2008; Wu, Clarke et al. 2010].

In MVBs werden nicht nur Oberflächenmoleküle recycelt oder abgebaut, es werden auch intrazelluläre Proteine zu den MVBs transportiert und schließlich exosomal sekretiert. Hierbei spricht man vom „nicht-klassischen Transport“, bei dem im Unterschied zum „klassischen Transport“ der Proteintransport nicht durch das endoplasmatische Retikulum und den Golgi Apparat vollzogen wird. Alternativ dazu wird die intrazelluläre Sortierung von Proteinen zu MVBs durch die sogenannte *endosomal sorting complex required for transport* (ESCRT)-Maschinerie vermittelt. Dieser Komplex wird aus vier Untereinheiten gebildet, ESCRT-0 und ESCRT-I-III (Abb. 3.3).



**Abb. 3.3 Schematische Darstellung der ESCRT-Maschinerie [nach Welchman, Gordon et al. 2005].** Erklärungen: AMSH: *associated molecule with the SH3 domain of STAM*; CBL: *casitas B lineage lymphoma proto-oncogene*; Doa4: *degradation of alpha 4*; EGFR: *endothelial growth factor receptor*; ESCRT: *endosomal sorting complex required for transport*; HRS: *hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*; UB: Ubiquitin; Vps4: *vacuolar protein sorting 4*.

Der humane ESCRT-0-Komplex setzt sich aus den Proteinen HRS (*hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*) und STAM1 (*signal transducing adaptor molecule 1*) zusammen. HRS besitzt mehrere funktionale Domänen wie z.B. ein Ubiquitin-Interaktionsmotiv (UIM), über das HRS mit Ubiquitin-modifizierten Proteinen interagieren kann [Raiborg, Bache et al. 2002]. Des Weiteren verfügt es über eine FYVE-Domäne, über die HRS zur Verankerung in Membranen an Phosphatidylinositol-3-Phosphat binden kann [Kobayashi, Tanaka et al. 2005]. Die Assoziation erfolgt über die coiled-coil-Struktur von STAM1 zum ESCRT-0-Komplex. Viele Proteine werden mit (mono-) Ubiquitinresten posttranslational modifiziert und sind somit für den intrazellulären Transport markiert. HRS bindet an diese Proteine und sortiert sie zu intrazellulären Vesikeln wie den MVBs. ESCRT-0 rekrutiert nach der Bindung von Proteinen und MVB-Membran den ESCRT-I-Proteinkomplex, wobei HRS mit Tsg101 (*tumor susceptibility gene 101*) im ESCRT-I interagiert. Im Anschluss rekrutiert ESCRT-I den ESCRT-II-Komplex, der für die De-Ubiquitylierung

der Proteine verantwortlich ist, bevor sie in den MVB gelangen. Zum Schluss rekrutiert ESCRT-II den ESCRT-III-Komplex, der polymere Filamente an der Oberfläche der Endosomen bildet, die eine stützende Funktion beim Einstülpen der Membran übernehmen. Die AAA-ATPase Vps4, die einen Teil des ESCRT-III-Komplexes ausmacht, initiiert das Ablösen des ESCRT-Komplexes, was gleichzeitig das Einstülpen der Membran in das Innere des MVB-Lumen bewirkt [van Niel, Porto-Carreiro et al. 2006; Mukhopadhyay and Riezman 2007; Luyet, Falguieres et al. 2008; Stuffers, Sem Wegner et al. 2009; They, Ostrowski et al. 2009; Michelet, Djeddi et al. 2010].

## **3.4 Die chronische lymphatische Leukämie (B-CLL)**

NK Zellen spielen auch bei Krebserkrankungen wie der chronischen lymphatischen Leukämie vom B-Zelltyp (B-CLL) eine Rolle. Es ist schon seit Jahrzehnten bekannt, dass es in einigen Fällen der B-CLL zu phänotypischen und funktionalen Veränderungen der NK Zellen kommt, die zu einer geringeren NK Zell-Aktivität führen [Ziegler, Kay et al. 1981]. Die Ursache hierfür ist nicht bekannt, es wird aber spekuliert, dass es aufgrund einer Akkumulation der leukämischen B-Zellen zu diesen Defekten kommen kann. Jedoch lassen sich diese NK Zellen häufig durch eine zusätzliche Behandlung mit IFN $\gamma$  und IL-2 reaktivieren [Guven, Gilljam et al. 2003]. Weitere Arbeiten wie die von Zhang et al. zeigten, dass bei den analysierten Patienten mit B-CLL sogar der prozentuale Anteil an NK Zellen zurück geht [Zhang, Zhu et al. 2009]. Ob BAT3 auch im Zusammenhang mit der Aktivität von NK Zellen bei B-CLL steht, wurde in dieser Arbeit näher untersucht.

Die B-CLL ist eine der häufigsten Leukämie-Erkrankungen in der westlichen Welt. Pro Jahr erkranken 3-6 von 100 000 Personen, dabei liegt das Durchschnittsalter bei 65-70 Jahren. Die Ursachen, die zur Entwicklung einer B-CLL führen, sind unbekannt. Der Verlauf der Erkrankung unterscheidet sich zwischen einer milden Form, bei welcher die Patienten nach einer Erstbehandlung lange in Remission sind, und einer aggressiven Form, bei der die Patienten trotz Behandlung schnell versterben.

Die Diagnose der B-CLL zeigt eine veränderte Anzahl der B-Zellen, die nach Rai und Binet klassifiziert werden. In frühen Stadien haben Patienten > 5.000 monoklonale B-Zellen pro  $\mu$ l (bei einem Normalwert von 1.500-3.000 Lymphozyten/ $\mu$ l) und eine Knochenmark-Lymphozytose von 30%, in den späten Phasen kommt es zu einer Lymphozytose mit einer krankheitsbedingten Anämie. Die Veränderungen im Blutbild und die Tumormasse können mittels histologischer Untersuchungen wie der mikroskopischen Analyse von Blutaussstrichen, so wie mit FACS-Analysen bestimmt werden.

Dabei wird nach den typischen Markern gesucht wie CD19 für B-Zellen und CD5 als Tumormarker, die bei der B-CLL hochreguliert werden.

Neben dem Einsetzen von monoklonalen Antikörpern wie Rituximab (gegen CD20) oder Alemtuzumab (gegen CD52) gibt es erste Ansätze einer Immuntherapie, bei der autologe NK Zellen ( $CD3^-CD56^+$ ) und NKT Zellen ( $CD3^+CD56^+$ ) aus dem peripheren Blut nach Aktivierung durch  $IFN\gamma$  und IL-2 die Tumorzellen eliminieren sollen. Dies geschieht über eine Perforin/Granzym-vermittelte Zytolyse, die in bis zu 15% der CLL Zellen eine Apoptose hervorrufen [Kornacker, Moldenhauer et al. 2006].

## 3.5 Der Entzündungsmediator MIF

Der sekretierte Faktor MIF (*macrophage migration inhibitory factor*) hat für die Pathogenese der B-CLL mögliche Bedeutungen [Binsky, Haran et al. 2007]. MIF gehört zur Gruppe der Zytokine und wird als Entzündungsmediator verstanden. Er hat ein Molekulargewicht von 12,5 kD und wird in vielen Zellen konstitutiv exprimiert. MIF wird besonders bei Entzündungsreaktionen und -ähnlich wie BAT3- von vielen Tumorzellen als *leaderless* Faktor sezerniert [Lolis 2001].

Bei der B-CLL ist der MIF-Rezeptor CD74 hochreguliert und die Bindung von MIF an CD74 gilt als Überlebenssignal für Tumorzellen [Binsky, Haran et al. 2007]. Andere Arbeiten zeigen, dass MIF die Aktivität von NK Zellen negativ beeinflussen kann: Hohe extrazelluläre MIF-Level inhibieren die NK Zell-Zytotoxizität über die Abschaltung des NKG2D-Rezeptors [Apte, Sinha et al. 1998; Krockenberger, Dombrowski et al. 2008; Krockenberger, Engel et al. 2010]. Mausexperimente belegen eine direkte pro-tumorale Aktivität von MIF, da die Depletion des Faktors mit Antikörpern nach Behandlung zu einem verringerten Tumorwachstum führt [Krockenberger, Dombrowski et al. 2008; Krockenberger, Engel et al. 2010].

Auch im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass nach Zugabe von anti-MIF-Antikörpern die Tiere überleben konnten, die zuvor mit LPS und MIF behandelt wurden. Ohne die Zugabe der Antikörper verlief die Behandlung der Tiere letal [Bozza, Satoskar et al. 1999; Winner, Meier et al. 2008].

### 3.6 Herstellung transgener Mausmodelle

Für Untersuchungen komplexer Zusammenhänge in physiologischer Umgebung, werden häufig Tiermodelle genutzt. Zur Beantwortung immunologischer Fragestellungen im humanen System werden Mausmodelle verwendet, da das murine Immunsystem größtenteils vergleichbar mit dem humanen ist. Das murine Genom kann außerdem mittels verschiedenster gentechnischer Methoden manipuliert werden. Das Verständnis der Biologie von NK Zellen weist immer noch Lücken auf. Da es zu Beginn dieser Arbeit noch keine Mausmodelle gab, um die Rolle der NK Zellen bei einer B-CLL näher zu untersuchen, wurde mit der Etablierung einer NK Zell-spezifischen Cre-Mauslinie begonnen.

Neben bekannten Methoden wie der „*knockout*“ oder „*knockin*“ von Genen ins Mausgenom, wird immer häufiger das Cre-*loxP*-System verwendet.

Das Cre-*loxP*-System wurde ursprünglich im Bakteriophagen P1 entdeckt. Cre (*causes recombination*) ist eine cyclische Rekombinase, die eine spezifische Sequenz von 34 bp erkennt, schneidet und die DNA ligiert. Bei dieser Erkennungssequenz handelt es sich um die sogenannte *loxP-site* (*locus of crossing (x)-over in P1*), die aus zwei *13 bp-invert repeats* (ATAACTTCGTATA; TATCGAAGTTAT) und einem *8 bp-spacer* (ATGTATGC) bestehen, der die Orientierung der *loxP-sites* festlegt [Garcia und Mills 2002].

Für einen konditionalen *Knockout* in einem spezifischen Zelltyp müssen zwei Kriterien erfüllt sein. Zunächst muss eine zell- oder gewebespezifische Aktivierung von Cre gewährleistet werden. Das heißt, die Transkription von Cre steht unter der Kontrolle eines zellspezifischen Promotors. Für die Etablierung der NK Zell-spezifischen Cre-Linie wurde hier der Minimalpromotor von NKp46 verwendet. Als zweites müssen das Zielgen oder entscheidende Sequenzabschnitte mit *loxP-sites* flankiert („gefloxt“) sein. Der gefloxt Sequenzbereich wird in Cre exprimierenden Zellen eliminiert. Folglich kommt es zum Gen-*knockout* in nur einem Zelltyp. Im Mausmodell werden Cre-Linien mit Tieren verpaart, die ein gefloxtes Zielgen haben. Die nachfolgende Generation besitzt dann auf einem Allel das gefloxtes Gen und auf dem anderen Cre, die schließlich den zellspezifischen *knockout* bedingt (Abb. 3.4).

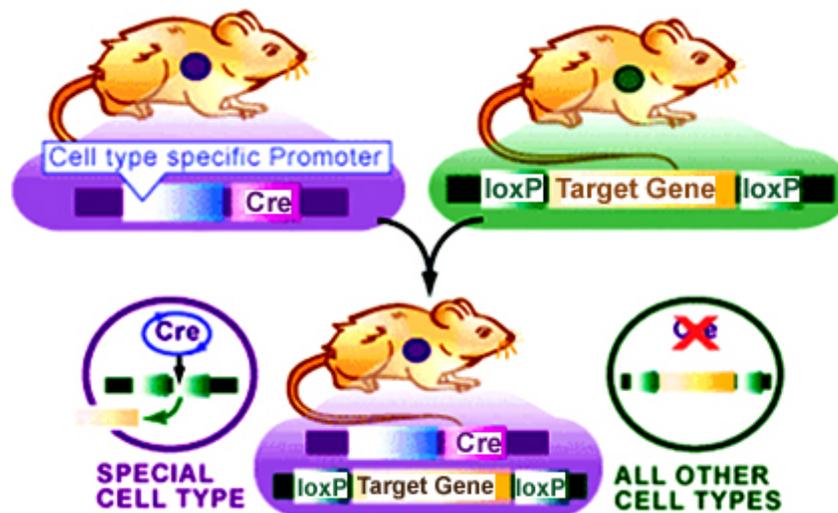


Abb. 3.4 Schematische Darstellung der Verpaarungsstrategie von Cre- und *loxP*-Mäusen [Alfred Pechisker, 2009].

Neben dem konditionalen *knockout* kann die Deletion eines Gens induziert werden. Hierfür wird die Expression von Cre zusätzlich unter die Kontrolle eines z.B. nukleären Hormonrezeptors (NHR) gebracht. Dabei wird Cre mit dem NHR fusioniert. Im inaktiven Zustand des NHR ist dieser im Zytoplasma lokalisiert und Cre damit nicht in der Lage, geflochte Gene zu deletieren. Mit der Aktivierung des NHR durch Zugabe eines Liganden wird der NHR zusammen mit Cre in den Zellkern transportiert. Cre kann dann das geflochte Gen eliminieren [Tian, James et al. 2006]. Bei dieser induzierbaren Variante ist es jedoch wichtig, modifizierte NHRs bzw. Liganden einzusetzen, so dass es nicht durch eine Aktivierung der Rezeptoren mittels endogener Liganden kommen kann. Im Tiermodell wird deshalb oft das Östrogenanalogon Tamoxifen® verwendet, das an den modifizierten Östrogenrezeptor bindet [Tian, James et al. 2006; Casanova, Fehsenfeld et al. 2002; Garcia und Mills 2002; Scholten, Hartmann et al. 2008]. Zur Überprüfung der Zell-spezifischen Expression oder Funktionalität von Cre werden häufig sogenannten Reporterlinien (R26R) verwendet. Diese enthalten im ROSA26-Lokus z.B. die Sequenz des *lacZ*-Gens oder Sequenzen fluoreszierender Proteine wie GFP oder YFP. Die Transkription wird zunächst durch eine vorangesetzte geflochte Stop-Kassette unterbrochen. Erst durch eine funktionale Cre-Expression wird diese Stop-Kassette entfernt und die Transkription der „Reportergene“ gewährleistet. Der Vorteil der R26R-GFP-Linien und R26R-YFP-Linien gegenüber den *lacZ*-Linien ist, dass die Funktion von Cre *in vivo* überprüft und visualisiert werden kann, wohingegen die Überprüfung der Expression von *lacZ* häufig eine Entnahme von Geweben oder Organen für den anschließenden

Galactosidase-Test erfordert [Srinivas, Watanabe et al. 2001; Mao, Fujiwara et al. 2001].

### 3.7 Zielsetzung

Natürliche Killer (NK) Zellen spielen eine essentielle Rolle bei der Erkennung von Tumorzellen und *Tumor surveillance*. Zur Aktivierung der NK Zell-Funktion tragen die Mitglieder der NCRs bei. Das intrazelluläre Protein BAT3 ist ein Ligand für NKp30, der untypisch für NK Zell-Liganden konstitutiv intrazellulär lokalisiert und erst nach Abgabe aus der Zelle an NKp30 binden kann [Pogge von Strandmann, Simhadri et al. 2007].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Transport von BAT3 aus dem Zellkern ins extrazelluläre Milieu untersucht werden. Vorarbeiten weisen auf einen exosomal Transportweg hin. An der Bildung von Exosomen ist die neutrale Sphingomyelinase 2 (nSMase2) beteiligt. Daher sollte hier (I) eine Korrelation zwischen der nSMase2-Aktivität und dem Transport von BAT3 über Exosomen und eine mögliche Beteiligung der ESCRT-Maschinerie untersucht werden.

Darüber hinaus (II) sollten Proteindomänen von BAT3 identifiziert werden, die essentiell für den Transport von BAT3 via Exosomen sind.

Extrazelluläre "leaderless" Zytokine und NK Zell-Liganden sind wichtige Faktoren für die *Tumor-Immunsurveillance* und weisen bei Tumoren vielfach eine aberrante Expression und Funktion auf. In dieser Arbeit sollte (III) der Einfluss des extrazellulären BAT3 auf die NK Zell-Funktion am Beispiel von B-CLL näher untersucht werden.

Um die Rolle der NK Zellen bei B-CLL zu untersuchen, sollten im Rahmen dieser Arbeit (IV) Voraussetzungen geschaffen werden, um ein transgenes Mausmodell zu etablieren. Hierbei sollte die Expression von Cre konstitutiv oder induzierbar unter dem Einfluss des humanen Minimalpromotors von NKp46 stehen.

## 4 Material und Methode

Alle Salze und Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (München), Invitrogen<sup>TM</sup> (Karlsruhe) bezogen. Zellkultur-Medien und Zusätze wurden von GIBCO®-Invitrogen (Karlsruhe) verwendet.

Die verwendeten Geräte werden an entsprechender Stelle erwähnt.

### 4.1 Standard molekularbiologische Methoden

#### 4.1.1 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Die PCR-Methode wurde zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten, für die Klonierung und zur Kontrolle von Plasmiden verwendet. Als Polymerasen wurden Pfu- und Taq-Polymerasen (Fermentas, St. Leon-Rot) eingesetzt.

Die Reaktionsansätze enthielten die Komponenten 10x Reaktionspuffer (Fermentas), 100 nM Primer, ca. 5-10 ng Template-DNA bzw. eine Bakterienkolonie, 10 mM dNTPs-Mix (Fermentas) und Pfu-Polymerase bzw. Taq-Polymerase (Fermentas).

Alle PCRs wurden in Thermocyclern der Firma Biometra durchgeführt. Vorab erfolgte eine initiale Denaturierung bei 95 °C über 3 min, daran schlossen sich Denaturierung, Annealing und Elongation entsprechend der verwendeten Primer und der Länge des Amplifikats an. Abschließend wurde die Elongation mit 10 min bei 72 °C durchgeführt und die Proben danach bei 4 °C gekühlt.

Die verwendeten Primer sind in den Tabelle 4.1 und 4.2 aufgeführt.

#### 4.1.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten über Agarosegele

PCR-Ansätze und mittels Restriktionsenzyme verdaut DNA wurden über ein 1% Agarosegel mit TAE-Puffer inkl. Ethidiumbromid aufgetrennt und anschließend mit dem MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Protokoll aufgereinigt. DNA, die für die Mikroinjektion in Mausoozyten verwendet wurde, wurde in Doppelansätzen auf ein ethidiumbromidfreies Agarosegel aufgetragen und anschließend ein Teil im Ethidiumbromidbad gefärbt.

Dies diente als Vorlage zum Herausschneiden der DNA für die Mikroinjektion. Die ethidiumbromidfreie DNA wurde mit einem endotoxinfreien Extraktionskit (EndoFree Plasmid Maxi Kit, Qiagen) nach Protokoll aufgereinigt und in Mikroinjektionspuffer (5 mM Tris, 0,1 EDTA, pH 7,6, steril) eluiert.

### 4.1.3 DNA-Verdau mittels Restriktionsenzyme und Ligation

Für die Klonierung von PCR-Fragmenten, zur Linearisierung von Vektoren sowie zur Überprüfung von Plasmidkonstrukten wurde die DNA mit Restriktionsenzymen verdaut.

Dazu wurden Ansätze mit 5-10 µg DNA, Reaktionspuffer und 1-1,5 µl Restriktionsenzym verwendet. Die Ansätze wurden generell 2 h bei 37 °C inkubiert. Linearisierte Vektoren wurden zusätzlich im Anschluss des Restriktionsverdaus mit 1-2 µl CIAP (*calf intestinal alkaline phosphatase*, Fermentas) für 30-60 min bei 37 °C inkubiert, um die 5'-Phosphatreste der DNA zu dephosphorylieren und eine Religation des Vektors zu verringern.

Für Ligationen wurde das Rapid DNA Ligation Kit (Fermentas) verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 4.1.4 Sequenzierung der Klonierungen

Die Sequenzierung von DNA wurde von externen Instituten (ZMMK in Köln und Starseq® GmbH in Mainz) durchgeführt und nach vorgegebenem Protokoll angesetzt bzw. vorbereitet.

Zur Sequenzierung von pNK46-Cre und pNKp46Cre-EBD wurden die Primer 5'Ncr1-EcoRI und 3'CreSeq 1b53 verwendet. Für die Sequenzierung von Exon7 wurden die Primer 4/5for und 9/10rev verwendet (siehe Tabelle 4.2).

### 4.1.5 Lyse von NKL Zellen zur Gewinnung genomischer DNA

Um die genomische DNA von NKL-Zellen zu fällen, wurden  $10^5$  Zellen in 20 µl Lysepuffer (1 ml 10x PCR-Puffer, 45 µl NP40, 45 µl Tween20, 8,1 ml H<sub>2</sub>O) aufgenommen und eine Pipettenspitze Proteinase K hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 60 min bei 37 °C wurde die Proteinase K für 10 min bei 94 °C hitzeinaktiviert. Nach einem Zentrifugationsschritt von 1 min bei 13.000 rpm wurde der Überstand

aufbewahrt und 5 µl Überstand als Template DNA in eine PCR mit spezifischen Primern (5'Ncr1-EcoRI und 3'Ncr1-Bst1107I; siehe Tabelle 4.1) eingesetzt.

### 4.1.6 Präparation von RNA und cDNA-Synthese

Zur Gewinnung von mRNA aus kultivierten Zellen wurden  $5 \cdot 10^6$  Zellen eingesetzt und mit dem RNeasy® MiniKit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Für die Präparation von RNA aus murinem Vollblut wurde den Tieren 100-200 µl Blut aus der Schwanzvene entnommen. Anschließend wurde die RNA mittels QIAMP RNA Blood MiniKit (Qiagen) nach Herstellerangaben gefällt.

Die Konzentration der RNA wurde nach der Aufreinigung mit dem Bio-Rad Smart Spec 3000 Spectrophotometer bzw. dem NANODROP 1000 Spectrometer (PeQlab) bestimmt. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm und einem berechneten Faktor von 40 µg/ml für RNA.

Für die Synthese von cDNA aus RNA wurde das Advantage® RT-for-PCR Kit (Clontech) oder das Quanti Tect® Reverse Transcription Kit (Qiagen) verwendet und gemäß dem vorgehenden Protokoll angewendet.

### 4.1.7 Verwendete Primer für BAT3-Konstrukte

Bezeichnung	Oligonukleotide	Annealing Temp.
BAT3 BgIII for	5'-GGAATCAGATCTATGGAGCCTATGATAGTAC-3'	56°C
BAT3 BgIII rev	5'-GGAAGATCTACTGAGGCGTTGTATGAAGGCAGC-3'	56°C
5BgLBATlg	5'-GAAGATCTATGGAGCCTAATGATAG-3'	56°C
3BgLBATlg	5'-GAAGATCTAGGATCATCAGCAAAG-3'	56°C
BAT3fl-BspH for	5'-GGATCATGAGCATGGAGCCTAATG-3'	57°C
BAT3fl for	5'-GGATGGAGCCTAATGATAG-3'	57°C
BATCTFNcoI for	5'-CATGCCATGGGGGCTTCAGCTG-3'	57°C
Xho5UBL-GFP	5'-CCGCTCGAGTGGAGCCTAATGAT-3'	58°C

Bezeichnung	Oligonukleotide	Annealing Temp.
Eco3UBL-324-GFP	5'-GGAATCAGTGGCTGAGGCAGACCC-3'	58°C
Eco3UBL-834-GFP	5'-GGAATTCCTCGACATACTCCGCAGG-3'	58°C
BAT3dUBL HindIII for	5'-CCCAAGCTTCCTCCTCAGACTCACC-3'	55°C
BAT3dNLS rev (xho)	5'-CCGACTCGAGCGCTGGCTCTGAATGTCC-3'	55°C
BAT3 XhoI revNSC	5'-CCGACTCGAGCGAGGATCATCAGCAAAGGCCCG-3'	55°C
4/5 for	5'-AATCTTCTTAGTGACGGCTC-3'	58°C
9/10 rev	5'-CAGATTGATCTGTATGGGAATGG-3'	58°C
nSMas2 for	5'-GCATGGTTTTGTACACGACC-3'	54°C
nSMas2 rev	5'-GGCTATGCCTCCTCCTCCC-3'	54°C
SMPD3for	5'-GCTCCTCTGACGACAAGCTG-3'	58°C
SMPD3rev	5'-TGTCCAGCAGAGTACCGATG-3'	58°C
CD16 for*	5'-CCAAAAGCCCACTCAAAGAC-3'	58°C
CD16 rev*	5'-ACCCAGGTGGAAAGAATGATG-3'	58°C
pEGFP C1 for	5'-GCCGGGATCACTCTCG-3'	57°C

Tabelle 4.1 Auflistung der verwendeten Primer für Klonierungsstrategien, Expressionskontrollen und Quantifizierung von BAT3 u.a. (\*) Primer von [Hatjiharissi, Xu et al. 2007] übernommen.

#### 4.1.8 Verwendete Primer für die transgene Mauslinie

Bezeichnung	Oligonukleotide	Annealing Temperatur
5'Ncr1-EcoRI	5'-CCGGAATTCAAACACTCCATATGTTTTA-3'	62°C
3'Ncr1-Bst1107I	5'-CCGGTATACGCTCAGATTCTGCC-3'	62°C
5'Cre-check	5'-CCAAGCTGGTGGAGAGATGGATCTC-3'	62°C

Bezeichnung	Oligonukleotide	Annealing Temperatur
3'Cre-check	5'-ATGGACACACCAGCCCTG-3'	62°C
5'EBD-mt	5'-CAGGAACCAGGGAAAATGTGTAGAGG-3'	62°C
3'EBD-check	5'-CGACGGCCAGTGAATTGTAATACG-3'	62°C
5'Nkp46-mt	5'-GTGTCAGAGGGACCACGGCCTTTCTG-3'	62°C
3'CreNkp-mt	5'-CTTGGCTCTCTCCCCAGCATCCAC-3'	62°C
3'CreSeq 1b53	5'-GTCAGTGC GTTCAAAGGCCA-3'	62°C
5'YFPsoriPCR1	5'-CCAAATCGCTCTGAGTTGTTATC-3'	62°C
5'YFPsoriPCR2	5'-GCGAAGAGTTTGTCTCAACC-3'	62°C
5'YFPsoriPCR3	5'-GGAGCGGGAGAAATGGATATG-3'	62°C

Tabelle 4.2 Auflistung der verwendeten Primer für die Klonierung und Typisierung transgener Mäuse.

#### 4.1.9 Verwendete Vektoren zur Klonierung von DNA-Konstrukten

Vektor	Fusion	Prokaryontischer Selektionsmarker	Eukaryontischer Selektionsmarker
pcDNA3.1 His/Myc A	His/Myc	Ampicillin	Geneticin
pcDNA3.1 His/Myc B	His/Myc	Ampicillin	Geneticin
pEGFP C1	EGFP	Kanamycin	Neomycin
pCreER <sup>T2</sup> Amp*	Cre/EBD	Ampicillin	-

Tabelle 4.3 Auflistung der verwendeten Vektoren für Klonierungsstrategien. \* In Kooperation mit Giuseppe Testa und Prof. Axel Roers [Scholten, Hartmann et al. 2008].

#### 4.1.10 Klonierungsstrategie der BAT3-Deletionskonstrukte

Ligation	Vektor	Template	forward Primer	reverse Primer
pEGFP-BAT3 fl	pEGFP-C1	cDNA K562	5BgLBATlg	3BgLBATlg

Ligation	Vektor	Template	forward Primer	reverse Primer
pEGFP-BAT3ΔBAG	pEGFP-C1	cDNA K562	5BgLBATlg	3BgLBATlg
pCDNA3.1-BAT3 fl	pCDNA3.1+ myc-His A	Simhadri, Reiners et al. 2008		
pCDNA3.1- BAT3ΔBAG	pCDNA3.1+ myc-His B	pEGFP- BAT3ΔBAG	BAT3BgIII for	BAT3 XhoIrevNSC
pCDNA3.1- BAT3ΔUBL	pCDNA3.1+ myc-His B	pCDNA3.1- BAT3 fl	BAT3BgIII for	BAT3 XhoIrevNSC
pCDNA3.1- BAT3ΔNLS	pCDNA3.1+ myc-His B	pEGFP-C1- BAT3ΔBAG	BAT3BgIII for	BAT3dNLSrev (xho)
pCDNA3.1- BAT3ΔUBLΔNLS	pCDNA3.1+ myc-His B	pEGFP- BAT3ΔBAG	BAT3BgIII for	BAT3dNLSrev (xho)
pEGFP-BAT3_1-324	pEGFP-C1	pCDNA3.1- BAT3 fl	Xho5UBL- GFP	Exo3UBL-324- GFP
pEGFP-BAT3_1-834	pEGFP-C1	pCDNA3.1- BAT3 fl	Xho5UBL- GFP	Exo3UBL-834- GFP

Tabelle 4.4 Klonierung der BAT3-Deletionskonstrukte. Verwendete Primer siehe Tabelle 4.1.

## 4.2 Mikrobiologische Methoden

### 4.2.1 Bakterien und Medien

Für die Arbeiten mit Bakterien wurden nur chemokompetente Bakterien der *E. coli* Stämme XL1 blue, DH5alpha und DH10b verwendet. Die Bakterien wurden je nach Resistenzeigenschaft der Vektoren in LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml Endkonzentration) bzw. Kanamycin (10 µg/ml Endkonzentration) bei 37 °C angezogen. Übernachtskulturen wurden bei 37 °C zusätzlich mit 150 rpm geschüttelt. Die Zusammensetzung der verwendeten Medien ist Tabelle 4.6 zu entnehmen.

### 4.2.2 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

Die Transformation von Ligationen oder Plasmid-DNA in chemokompetenten Bakterien der *E.coli* Stämme XL1 blue und DH5alpha erfolgte durch die Zugabe von 100 µl kompetenter XL1 blue- oder DH5α-Zellen zu 10 µl Ligationsansatz bzw. 1 µl Plasmid und einer Inkubation auf Eis für 30 min. Nach dem 30 sekündigen Hitzeschock bei 42 °C wurden die Zellen erneut für 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 800 µl LB-Medium zugegeben. Die phänotypische Expression wurde für 30-60 min bei 37 °C unter Schütteln durchgeführt. Nach der phänotypischen Expression wurden die Bakterien zunächst 1 min bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in ca. 100 µl verbleibenden Medium resuspendiert und auf Selektionsplatten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Von der Übernachtskultur wurden entweder Vorkulturen für die Plasmidpräparation angelegt oder einzelne Klone in einer Kolonie-PCR überprüft.

### 4.2.3 FLIP-vermittelte Rekombinase in *E.coli*

Um die mit *FRT-Sites* flankierte EBD in *E.coli* zu eliminieren, wurde das *706-FLP Expression Plasmid* (Gene Bridges) verwendet. Die Transformation und die weiteren Schritte wurden gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Für die Transformation von pNKp46Cre-EBD in *DH10B-706FLP*-Zellen wurden 0,2-0,3 µg DNA eingesetzt.

### 4.2.4 Präparation von Plasmid-DNA

Für die Präparationen von Plasmiden wurden die QIAGEN Plasmid Mini- und Maxi-Kits (Qiagen, Hilden) oder NucleoBond® Xtra Maxi (Macherey-Nagel) verwendet und die Plasmide anschließend zur transienten Transfektion von eukaryotischen Zellen oder für die Sequenzierung genutzt. Die Präparationen wurden gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

## **4.3 Methoden zu Mausearbeiten**

### **4.3.1 Mikroinjektion von pNKp46Cre und pNKp46Cre-EBD in fertilierte C57BL/6 Mausoozyten**

Die pronukleäre Mikroinjektion von pNKp46Cre und pNKp46Cre-EBD in fertilierte C57BL/6 Mausoozyten wurde freundlicherweise von Dipl.-Ing Ronald Naumann (Transgenic Core Facility, MPI of Molecular Cell Biology and Genetics, Dresden) durchgeführt. Hierfür wurden 100-150 µg DNA von pNKp46Cre und pNKp46Cre-EBD eingesetzt, die in einem sterilen TE-Puffer eluiert wurde.

### **4.3.2 Schwanzbiopsie und Typisierungs-PCR**

Für die Genotypisierung von putativen transgenen Tieren dienten Schwanzbiopsien als Ausgangsmaterial. Diese wurden über Nacht in 500 µl Lysepuffer (400 µl 5 M NaCl, 1 ml 1 M Tris/HCl pH 8,5, 100 µl 0,5 M EDTA, 100 µl 20% SDS, 8,4 µl ddH<sub>2</sub>O) und 7 µl Proteinase K (Fermentas) bei 56 °C und 500 rpm verdaut. Nach einer 10 minütigen Zentrifugation bei 12.000 rpm wurden 500 µl Überstand in ein neues Eppendorfgefäß transferiert und 500 µl Isopropanol zur Fällung der DNA dazugegeben. Im Anschluss eines weiteren Zentrifugationsschritts von 10 min bei 12.000 rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet (DNA) zweimal mit 300 µl kaltem 70% Ethanol für 2 min bei 12.000 rpm gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurde der Überstand verworfen und das Pellet 10-15 min bei RT getrocknet. Das Pellet wurde in 80-100 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst, ohne zu resuspendieren. Für das Lösen der DNA wurde diese für zwei Tage bei 4 °C gelagert, bevor sie für eine PCR zur Typisierung verwendet wurde. Zur Typisierung putativer transgener Tiere wurden drei unterschiedliche PCR-Ansätze verwendet. Ein Ansatz belegte das Vorhandensein der Promotorregion (5'Ncr1-EcoRI, 3'Ncr1Bst), ein weiterer überprüfte den Übergang von Promotor- zur Cre-Sequenz (5'NKp46-mt, 3'CreNKp46-mt), der dritte Ansatz zeigte, ob es sich bei der Integration um NKp46Cre oder NKp46Cre-EBD handelte (5'CreCheck, 3'EBDcheck). Die PCR wurde wie unter 4.2.1 beschrieben durchgeführt.

## 4.4 Zellbiologische Methoden

### 4.4.1 Zelllinien, Zellmedien und Wachstumsbedingungen

Für die durchgeführten Experimente wurden folgende Zelllinien verwendet:

Name	Eigenschaft	Referenz
293T	Humane embryonale Nierenzellen	Rio et al., 1985
HeLa	Humane Zervixkarzinom-Zelllinie	Scherer et al., 1953
K562	Humane Chronisch myeloische Leukämie	Lozzio et al., 1973
RAJI	Humanes Burkitt's Lymphom	Pulvertaft, 1964
NKL	Humanes Natürliches Killer Zell-Lymphom	Robertson et al., 1996
L428	Humanes B-Zelllymphom	Schaadt et al., 1979
L540 cy	Humanes B-Zelllymphom	Diehl et al., 1987
MCF7 wt*	Humane Brustkrebs-Zelllinie	Soule et al., 1937
MCF7 SMase2*	Humane Brustkrebs-Zelllinie, stabile Überexpression von nSMase 2	

**Tabelle 4.5: Verwendete Zelllinien.** (\*) In Kooperation mit Prof. Dr. M. Krönke.

Des Weiteren wurden primäre humane PBMCs, NK und B-CLL Zellen bzw. primäre murine PBMCs und NK Zellen für verschiedene Fragestellungen eingesetzt.

MCF7wt- und MCF7 SMase2 Zellen wurden in DMEM (*Dulbecco's Minimal Essential Medium Eagle*) komplementiert mit 10% *Heat Inactivated Fetal Calf Serum* (FCS), 365 g/ml L-Glutamin, 1 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) kultiviert. 293T, K562, RAJI, L428, L540cy sowie primäre Zellen wurden in RPMI1640-Medium gehalten, das dieselben Zusätze wie das DMEM enthielt und unter Standardbedingungen kultiviert. NKL Zellen wurden in MEMalpha-Medium mit 20% FCS, L-Glutamin, PrenStrep und 20 U IL-2 unter Standardbedingungen gehalten. Je nach Fragestellung wurden primäre NK Zellen ebenfalls mit 10-100 U IL-2 kultiviert. Die Zellen wurden im 3 Tagesrhythmus passagiert, wobei die Ablösung der adhärennten Zellen von den Kulturflaschen mit Trypsin/EDTA (Gibco) erfolgte.

### 4.4.2 Transiente Transfektion der Zellen

Zur transienten Transfektion wurden je nach Versuchsbedingungen eine Größe der Zellkultur-Platten bzw. Flaschen gewählt und entsprechend der Herstellerangaben der verwendeten Transfektionsreagenzien oder der Fragestellung ausgesät. Die Zellen wurden zunächst für ca. 20 h unter Standardbedingungen inkubiert bis sie eine Konfluenz von 50% bis 80% erreicht hatten.

Die Transfektionen erfolgten mithilfe der Transfektionsreagenzien FuGENE™ 6 (Biron, Mahieu et al.), Lipofectamine™ Reagent (Invitrogen) oder METAFECTENE® EASY (Biontex) und wurde nach Protokollangaben der Hersteller durchgeführt.

Nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen weitere 24-48 h inkubiert und später für entsprechende Analysen und Experimente verwendet.

### 4.4.3 Transfektion mit siRNA

Um die Expression eines definierten Zielgens in einer Zelle zu unterbinden, geht es darum die mRNA (messenger RNA), die für die Translation des entsprechenden Zielproteins notwendig ist, abzubauen.

Für die Transfektion mit siRNA wurde sich an die Vorschriften aus dem Handbuch „RNAiFect Transfection Handbook 10/2003“ gehalten. Abweichend wurden in eine 6-well Platte  $7,5 \cdot 10^5$  Zellen pro well ausgesät. Die Zellen wurden mit 6 µg siRNA und 25 µl RNAiFect in 100 µl OptiMEM bzw. in einer 12-well Platte mit 3 µg siRNA und 18 µl RNAiFect in 50 µl OptiMEM nach einer Inkubationszeit von 15 min bei RT transfiziert. Die hier verwendeten Zelllinien waren 293T, MCF7 wt und MCF7-SMase2. Bei den eingesetzten siRNAs wurden das GeneSolution siRNA Kit für Hs\_SMPD3 (Qiagen), nSMase2 siRNA (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Krönke) und *neg. control* siRNA AlexaFluor488 (Qiagen) verwendet.

Auch hier wurden nach erfolgter Transfektion die Zellen weitere 24-48 h inkubiert und später für Experimente verwendet.

### 4.4.4 Transfektion von primären humanen NK Zellen mit AMAXA®

Die primären humanen PBMC's (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*) wurden zunächst aus einem Leukozyten-Thrombozyten-Konzentrat (*buffy coat*) über einen Ficoll-Gradienten aufgetrennt (Leucosep™, Greiner). Im Anschluss wurden NK Zellen aus den PBMC's mithilfe des Zellseparationssystems Autodachs® von Malten

Biotec separiert. Die Durchführung erfolgte dabei nach Herstellerangaben und in Verwendung des MACS® NK Cell Isolation Kit human. Vor einer Transfektion der NK Zellen mit AMAXA® wurden die NK Zellen über Nacht mit 250 U IL-2 stimuliert. Für die Transfektion wurde das *Human NK Cell Nucleofector™ Kit* (Amaxa) verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurde jeweils eine Gesamtmenge von 5 µg DNA eingesetzt.

### 4.4.5 Zytotoxizitätsassay

Beim Zytotoxizitätsassay wird das zytotoxische Verhalten von NK Zellen gegenüber ihren Zielzellen analysiert. Die Zielzellen werden dafür mit Europium-Chlorid markiert. Nach einer Inkubationszeit wird das freigesetzte Europium im Überstand gemessen, das nach der Lyse der Zielzellen durch die NK Zellen abgegeben wurde.

Je nach Fragestellung wurden NK Zellen mit B-CLL Seren, Exosomen, Antikörpern oder Proteinen über Nacht prä-inkubiert oder mit 10 U IL-2 aktiviert. Für den Test wurden stimulierte NK Zellen zu Zielzellen im Verhältnis 10:1, 5:1, 2,5:1 und 1,25:1 eingesetzt. Als Reaktionsmedium dienten 200 µl RPMI-Medium ohne Zusätze in einer 96-well Spitzbodenplatte (Greiner). Die Zielzellen wurden zunächst in 400 µl *Labeling Buffer* (93 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM HEPES, 10 mM DTPA in NaOH, pH 7-8, 100 µl Europium-Chlorid, steril) aufgenommen und bei 250 V, 1.500 µF, ohne parallel Widerstand mit dem Easyject Optima Elektroporator elektroporiert. Nach vier Waschschritten, beginnend mit 20% FCS in RPMI, zweimal 100% FCS und abschließend mit 20% FCS, verbunden mit einer Zentrifugation von 8 min bei 1.200 rpm, wurden die markierten Zielzellen mit den stimulierten NK Zellen in den entsprechenden Zellzahlverhältnissen inkubiert. Dabei wurde festgelegt, dass pro Well  $5 \cdot 10^3$  Zielzellen eingesetzt wurden. Für das Bestimmen der relativen Zytotoxizität wurde der spontane *Release* (SR) und der maximale *Release* (MR) der Zielzellen zu Beginn und nach der Inkubationszeit ebenfalls gemessen. Hierbei wurden die Zielzellen ohne NK Zellen inkubiert und im Falle des MR zum Reaktionsmedium 1% Triton X100 (Sigma) hinzugegeben.

Nach einer Inkubationszeit von 3-4 h bei Standardbedingungen für Zellkultur, wurden 20 µl des Überstands zu 200 µl Enhancer Solution (PerkinElmer) in eine 96-well Flachbodenplatte (Falcon, Becton Dickinson) gegeben und die Fluoreszenz bei 615 nm (Victor, Wallac-Software, PerkinElmer) gemessen.

Anschließend wurde die relative Zytotoxizität mit folgender Formel bestimmt:

$$\% \text{ der Lyse} = \frac{\text{experimenteller Release} - \text{spontaner Release}}{\text{Maximaler Release}} * 100$$

Für die Ansätze mit Normalserum und B-CLL Serum wurden  $1,2-1,5 \cdot 10^6$  NK in 750  $\mu$ l Kulturmedium aufgenommen und mit 250  $\mu$ l Serum (1:4 in PBS/BSA vorverdünnt) versetzt. Für die Inkubation mit rekombinanten BAT3 fl wurden 100 ng/ml eingesetzt, für rekombinantes MIF (ab51096, Abcam) wurden 50 ng/ml genommen.

## 4.5 Immunologische Nachweismethoden

### 4.5.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Bei den hier verwendeten ELISAs handelte es sich um sogenannte Sandwich-ELISAs. Teilweise wurden dafür kommerzielle Kits verwendet wie DuoSet® Human MIF (R&D Systems), DuoSet® Human MICA (R&D System) und DuoSet® Human MICB. Hier wurde die ELISAs nach den jeweiligen Herstellerangaben durchgeführt.

Für den BAT3-ELISA wurden MaxiSorp-Platten (Nunc) mit BAT3-rabbitSerum (4160) 1:5.000 in *coating buffer* (Tabelle 4.6) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Platten dreimal mit 400  $\mu$ l Waschpuffer (Tabelle 4.6) gewaschen und für 2 h bei RT mit 200  $\mu$ l Blocking Buffer (Tabelle 4.6) geblockt. Nach einem weiterem Waschschrift wurden 100  $\mu$ l Probe pro well und 100  $\mu$ l Standard auf die Platten pipettiert. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe von BAT3-positiven Überständen. Nach einer 1,5 stündigen Inkubation bei RT und einem weiterem Waschschrift wurde zunächst mit chicken-anti BAT3 (abcam) 1:2.000 in 100  $\mu$ l Blocking Buffer pro well für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde nach dem Waschschrift noch mit anti-chicken-HRS 1:10.000 in 100  $\mu$ l Blocking Buffer für 1 h bei RT inkubiert. Für die Umsetzung des Substrats wurden 100  $\mu$ l 1-Step™ Ultra TMB-ELISA (Thermo Scientific) pro well pipettiert und 5-15 min bei RT abgedunkelt inkubiert bis ein deutlicher Farbumschlag beim Standard zu erkennen war. Abgestoppt wurde die Reaktion mit 30% Schwefelsäure. Die Platten wurden anschließend im  $\mu$ Quant (BIOTEK, Instruments, Inc.) ausgelesen und mit der KC4-Software ausgewertet.

### 4.5.2 Durchflusszytometrie

Bei der Vorbereitung der Proben für die Durchflusszytometrie wurde entsprechend des Ausgangsmaterials (Zellen bzw. Exosomen) unterschiedlich vorgegangen. Transfizierte Zellen und primäre NK Zellen wurden nach zwei Waschschritten mit 500 µl FACS Puffer (Tabelle 4.6) mit 1-5 µl Antikörpern (Tabelle 4.7) inkubiert. Ungekoppelte Antikörper wurden 1 h auf Eis inkubiert, direkt gekoppelte Antikörper wurden für 20-30 min abgedunkelt auf Eis inkubiert. Zwischendurch und abschließend erfolgten weitere Waschschrritte. Zum Schluss wurden die Zellen in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen und mit dem FACS Calibur (BD biosciences) analysiert.

Exosomen wurden zunächst an Latexbeads (Polybeads® carboxylate4.5 micron.microspheres, Polyscience, Inc.) gekoppelt (siehe 4.7.4). Anschließend wurden die gekoppelten Exosomen ebenso wie Zellen gefärbt und zum Schluss in 250 µl FACS-Puffer aufgenommen. Gemessen wurde mit dem FACS Calibur.

### 4.5.3 NK Zellseparation per MACS (*Magnetic Activated Cell Sorting*)

Zur Separation von Zellen aus z.B. Vollblut oder PBMC's bietet sich das autoMACS® System von Miltenyi Biotec an. Hier wurden die Separationskits „*NK isolation Kit human*“ bzw. „*NK isolation Kit mouse*“ (Miltenyi Biotec) verwendet. Zur Aufreinigung wurde das Gerät autoMACS® Pro (Miltenyi Biotec) genutzt. Bei der Durchführung der Schritte wurden die Herstellerangaben befolgt. Als Ausgangsmaterial dienten frisch isolierte humane Lymphozyten- und Thrombozytenkonzentrate (*buffy coats*) oder murines Vollblut. Die *buffy coats* wurden zunächst mittels Ficollgradienten in Granulozyten und PMBCs aufgetrennt. Die PBMC's wurden nach zweimaligem Waschen mit RPMI-Medium (ohne Zusätze), wie es die Herstellerangaben von Miltenyi Biotec vorsehen, weiterbearbeitet.

Das murine Vollblut wurde nach einer Erythrozytenlyse mit dem *NK isolation Kit mouse* nach Protokoll des Herstellers aufgereinigt.

### 4.5.4 Anfertigung von Zytospins

Separierte NK Zellen und andere Zellen wurden mit einer Cytospin3-Zentrifuge (Shandon) auf Polylysin beschichtete Objektträger (Polysine®Slides, Thermo Scientific) gesponnen. Dabei wurden nach Möglichkeit  $10^4$  Zellen pro 100 µl pro Spin eingesetzt. Gesponnen wurde für 1 min bei 1.000 rpm. Anschließend wurden die Zellen fixiert und gefärbt (siehe 4.6.5).

### 4.5.5 Immunhistochemie und Immunzytochemie

Zur Anfertigung von Präparaten wurden entweder  $5 \cdot 10^4$  HeLa Zellen auf Runddeckgläschen ausgesät oder Cytospins vorbereitet. HeLa Zellen wurden ca. 20 h wie unter 4.5.2 beschrieben transient transfiziert und weitere 20-24 h unter Standardbedingungen kultiviert. Nach einmaligem Waschen mit kaltem PBS wurden die Zellen bzw. Cytospins zunächst mit 3,7% Formaldehyd in PBS (Roth) für 30 min bei RT fixiert. Nach dreimaligen Waschen mit PBS wurden die Präparate mit 0,1% Triton X100 in PBS für 10 min permeabilisiert, da anschließend die Zellen intrazellulär gefärbt wurden. Für die Färbung wurden die Antikörper 1:200 bis 1:500 in 0,5% BSA in PBS eingesetzt und 1 h in abgedunkelten Feuchtkammern für 60 min inkubiert. Dem dreimaligen Waschschrift folgte eine weitere Inkubation mit sekundären Antikörpern. Hierfür wurden die AF594- und AF488-gekoppelte Antikörper (Invitrogen) 1:500 in 0,5% BSA in PBS eingesetzt und für 45 min in abgedunkelten Feuchtkammern inkubiert. Für die DAPI-Färbung von Zellen wurden die Präparate für 10 min mit Hoechst 33342 im Verhältnis 1:10.000 in PBS gefärbt. Nach zweimaligen Waschen mit PBS und einem abschließenden Waschschrift mit ddH<sub>2</sub>O wurden die Präparate mit Aqua Poly/Mount (Polysciences, Inc.) eingedeckelt.

Die Mikroskopie-Aufnahmen wurden mit dem Zeiss AxioScope A.1 AX10 gemacht und der AxiovisionRel.4.7-Software ausgewertet.

## 4.6 Proteinbiochemische Nachweismethoden

### 4.6.1 SDS-PAGE und Western Blot Analyse

Zum Nachweis von Proteinen wurden SDS-Poly-Acrylamid Gele mit Zelllysaten, Exosomen, Überständen oder Seren beladen. Dafür wurden zunächst Zellen in 2,5x SDS-Ladepuffer (nach Laemmli) lysiert und Exosomen, Überstände und Seren in 5x SDS-Ladepuffer aufgenommen. Die Proben wurden dann für 5-10 min bei 95 °C gekocht. Pro Tasche wurden 5-10 µl Lysat bzw. 10-20 µl Exosomen, Überstände oder Seren aufgetragen und die Proben in einem Biorad Mini-Protean Gel-System bei 160 V aufgetrennt. Als Proteinmarker wurden 5 µl Pageruler Pestaind Proteinladder (#SM0671 Fermentas) und MagicMark™XP (Invitrogen) aufgetragen. Im Anschluss wurden die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran (Protran®, Whatmann) oder PVDF Membran (GEHealthcare, Amersham™) bei 350 mA für 90 min geblottet. Die Membran wurde für 45 min bei RT in 5% Milchpulver in PBS+0,05% Tween20 (Roth) geblockt. Anschließend wurde die Membran über Nacht

bei 4 °C mit primären Antikörpern (1:1.000 bis 1:5.000) in 5% Milchpulver in PBS/T inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/T wurde die Membran mit sekundären Antikörpern (gekoppelt an POD oder HRS) 1:10.000 in 5% Milchpulver in PBS/T für 45 min bei RT inkubiert. Als letzter Schritt wurde nach mehrmaligem Waschen die Membran 1 min mit einer ECL-Lösung (GEHealthcare, Amersham™) inkubiert und schließlich mit Fotofilmen (Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film, Roche) in einer AGFA-Fotomaschine (Curix60, AGFA) entwickelt.

### 4.6.2 Proteinaufreinigung und Einengen von Überständen

Zum Einengen von Überständen wurde das sogenannte Vivaflow 50 bzw. Vivaspin 4 System (Sartorius stedim biotech) verwendet. Mit Vivaspin 4 können geringer Menge Überstand (bis zu 20 ml) aufkonzentriert werden. Dafür wurden die Vivaspin-Membranen zunächst mit PBS equilibriert, d.h. die Spinröhrchen wurden mit bis zu 3 ml PBS gefüllt und für 8 min bei 3.500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände auf die Membranen gegeben und so lange zentrifugiert bis man das gewünschte Endvolumen hatte.

Zur Konzentrierung größerer Mengen wurde das Vivaflow 50 System gewählt, zusammen mit einer Filtrationsanlage (MasterFlex L/S, Cole Parmer). Hierfür wurde nach Vorschrift die Membran gespült und equilibriert und die Überstände bis zum gewünschten Endvolumen eingengt.

Für die Aufreinigung von rekombinat hergestellten Proteinen, wie BAT3 fl, wurden 293T Zellen transient transfiziert (siehe 4.5.2). Die Überstände der Zellkultur wurde über einen Zeitraum von mehreren Tagen gesammelt und mit dem Vivaflow 50 System eingengt. Die Zellkulturüberstände wurden mit 4x Inkubationspuffer (200 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 1,2 M NaCl, 40 mM Imidiazol) verdünnt. Zu 2 ml Überstand wurden 20  $\mu\text{l}$  Ni-NTA-Agarose (Qiagen) hinzugegeben oder dem Überstandvolumen entsprechend angeglichen und für mind. 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde bei 2.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Ni-NTA-Agarose wurde 3x mit 20 ml Waschpuffer (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 300 mM NaCl, 20 mM Imidiazol) gewaschen und im Anschluss für 2 min bei 2.000 rpm zentrifugiert. Zum Eluieren wurde entsprechend des Ni-NTA-Agarose-Volumen mit gleichen Volumen Elutionspuffer (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 300 mM NaCl, 250 mM Imidiazol, pH 8 mit 5 M NaOH einstellen) eluiert.

### 4.6.3 Co-Immunpräzipitation

Um eine mögliche Interaktion von Proteinen zu zeigen, wurde eine co-Immunpräzipitation durchgeführt. Transient transfizierte Zellen wurden dabei pelletiert und in 500 µl Lysepuffer (für 50 ml: 20 mM Tris pH 7,4, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,05% Tween20, 1 Tablette complete EDTA-free Protease inhibitor cocktail (Roche)) lysiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration per NANODROP 1000 Spectrometer (PeQlab) wurden zu 30 µl equilibrierter Protein G Sepharose (Immobilized Protein G, Thermo Scientific) 200-500 µg Protein geben und zunächst für 3 h bei 4 °C rotierend inkubiert (*pre-clearing*). Anschließend wurden die Überstände zu 30 µl frisch equilibrierter Protein G Sepharose gegeben und mit 1-5 µg Antikörper über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Die Überstände wurden nach einem Zentrifugationsschritt von 2 min bei 10.000 rpm verworfen und die Sepharose-Beads dreimal mit 500 µl 0,1% TritonX100 in PBS gewaschen. Zum Schluss wurden die Beads in 30 µl 2,5x-SDS-Ladepuffer aufgenommen und im Western Blot analysiert (siehe 4.7.1).

### 4.6.4 Affinitätschromatographie und Gelfiltration

Zur Depletion von Proteinen aus Überständen (hier: BAT3 und MIF aus B-CLL Seren) wurden B-CLL Seren mit gekoppelte Antikörper an Sepharose inkubiert. Hierfür wurden 20 µl mit PBS equilibrierten Protein G Sepharosebeads mit 3 µg BAT3-rabbitSerum (S4160) bzw. 2 µg anti-MIF prä-inkubiert. Im Anschluss wurden die gekoppelten Antikörper mit 500 µl Serum über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dieser Schritt wurde durch Überführen der Überstände und neuen gekoppelten Antikörper an Sepharose wiederholt. Die Überstände wurden nach einem Zentrifugationsschritt von 1 min bei 10.000 rpm gewonnen.

Für die Depletion von BAT3 mithilfe einer Sepharose gefüllte Säule wurde diese mit antiBAT3-rabbit-S4160 beladen. Die Sepharose-Säulchen wurden dafür mit 1 mM HCl gespült. Danach wurden 50 µl S4160 in 900 µl *coupling Buffer* (0,2 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, pH 8.4) auf die Säule aufgetragen und für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Deaktivierung wurde die Säule mit 10 ml 0,5 M Ethanolamide und NaCl pH 8,3 gespült. Die verwendeten B-CLL Seren (600 µl) wurden 1:2 mit 600 µl 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7 verdünnt und auf die Säule aufgetragen. Als Referenz wurden 200 µl aufbewahrt. Der Durchlauf von 1 ml wurde in 3 Fraktionen aufgefangen.

Für die Gelfiltration wurden HiPrep<sup>TM</sup> Sephacryl HR Columns (GE Healthcare Life Sciences) verwendet. Dafür wurde eine Volumengröße von ≤ 5 ml (HiPrep<sup>TM</sup> 16/60)

gewählt. Die Säule wurde an das BioLogic Duo Flow System (Biorad) angeschlossen und mit 5 ml Serum beladen. Die Fraktionen wurden nach einem Ausschlussvolumen von 5 ml in 500 µl Fraktionen gesammelt.

### 4.6.5 Exosomenaufreinigung

Die Aufreinigung von Exosomen erfolgte nach einem nicht-letalen Hitzeschock. Hierfür wurden untransfizierte und transient transfizierte Zellen zunächst in OptiMEM aufgenommen und in einem Wasserbad bei 42 °C für 30 min einem Hitzeschock ausgesetzt. Nach weiteren 30 min unter Standardbedingungen (37 °C) wurden die Zellen für 5 min bei 1.200 rpm zentrifugiert und die Überstände überführt. Zwei weiteren Zentrifugationsschritten für je 15 min bei 5.300 rpm (10.000xg) mit Überführen der Überstände folgte eine Filtration der Überstände mithilfe eines 0,8 µm Filters (FP30/0,8 CA-S, Whatmann). Anschließend wurden die Überstände in einer Ultrazentrifuge für 1,5 h bei 32.000 rpm (100.000xg) zentrifugiert. Das Exosomen-Pellet wurde in einem weiteren Zentrifugationsschritt in der Ultrazentrifuge mit PBS gewaschen. Nach diesem Waschschrift wurde das Pellet vorsichtig in 100-200 µl PBS aufgenommen, in Aliquots bei -80 °C gelagert oder direkt für die Analyse am Durchflusszytometer vorbereitet. Die Konzentration der Exosomen ließ sich mithilfe des NANODROP 1000 Spectrometer (PeQlab) bestimmen oder durch CD9-Färbung im FACS quantifizieren. Für die Durchflusszytometrie wurden 150 µl Exosomen an 20-30 µl Latexbeads ( $5 \cdot 10^7$ /ml Polybeads® carboxylate 4.5 micron.microspheres, Polyscience, Inc.) für 90 min bei 25 °C und 700 rpm gekoppelt. In einem weiteren Schritt wurden die mit Exosomen beladenen Latexbeads für 15 sec bei 13.000 rpm zentrifugiert und mit 250 µl 1% BSA in PBS für 30 min bei 25 °C, 700 rpm blockiert. Dem folgten drei Waschschriffe mit je 500 µl PBS, die für 15 sec bei 13.000 rpm zentrifugiert wurden. Zum Schluss wurden die Latexbeads entsprechend der Anzahl der FACS-Proben mit je 100 µl in PBS aufgenommen und gefärbt (siehe 4.6.2).

## 4.7 Auswertung/Software

Die Daten wurden mit den Software-Programmen der entsprechenden Geräten (ELISA-Reader, BD FACS-Calibur) bzw. Microsoft Office Excel 2007 und GraphPrism 5.0 ausgewertet.

## 4.8 Verwendete Puffer

<b>Pufferbezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>Blot Puffer</b>	
für PVDF Membran	3g Tris Base +14,4g Glycin +200ml Methanol +800ml H <sub>2</sub> O
für Nitrozellulose Membran	250mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
<b>ELISA Puffer</b>	
Coating Puffer	8,4g NaHCO <sub>3</sub> + 3,4g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> in 1L, pH 9,5
Blocking Puffer	1% BSA in PBS oder 10%FCS in PBS
Wasch-Puffer	1xPBS+0,05% Tween20
<b>FACS Puffer</b>	1x PBS +0,2% BSA +0,2% Natriumazid
<b>LB Agar</b>	LB Medium+1,5% Agar
<b>LB Medium</b>	1% Trypton +1% NaCl +0,5% <i>Yeast extract</i>
<b>10x PBS</b>	1,37 M NaCl +27 mM KCL +20 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> +100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O
<b>10x TBS</b>	1,37 M NaCl +27 mM KCL +248 mM Tris Base
<b>50x TAE Puffer</b>	2M Tris acetat +50mM EDTA pH 8.0

Tabelle 4.6 Verwendete Puffer.

## 4.9 Verwendete Antikörper

<b>Antigen</b>	<b>Fluoro- chrom</b>	<b>Firma</b>	<b>gegen Spezies</b>	<b>aus Spezies</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Klon</b>
<b>anti-chicken</b>	PE	Dianova	chicken	donkey	IgG (H+L)	
<b>anti-chicken</b>	POD	Dianova	chicken	donkey	poly	
<b>anti-mouse</b>	FITC	BD Biosciences	mouse	goat	poly	
<b>anti-mouse</b>	PE	Dako	mouse	goat	poly	

#### 4 Material und Methode

<b>Antigen</b>	<b>Fluorochrom</b>	<b>Firma</b>	<b>gegen Spezies</b>	<b>aus Spezies</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Klon</b>
anti-mouse	Cy3	Dianova	mouse	goat	poly	
anti-mouse	POD	Dianova	mouse	goat	poly	
anti-rabbit	HRS	Dianova	rabbit	donkey	poly	
AlexaFluor488	488	Invitrogen	mouse	goat		
AlexaFluor488	488	Invitrogen	rabbit	goat		
AlexaFluor594	594	Invitrogen	mouse	goat		
BAT3	purified	Abcam	human	chicken	IgY	
beta-Aktin	purified	Sigma	human	mouse		
CD3	FITC	BD Biosciences	human	mouse		
CD3	PE	Immuno Tools	human	mouse	IgG1	UCHT1
CD3	APC	Immuno Tools	human	mouse	IgG2a	MEM57
CD9	purified	BD Biosciences	human	mouse		
CD16	PE	BD Biosciences	human	mouse		
CD56	FITC	Immuno Tools	human	mouse	IgG2a	MEM-188
CD56	PE	BD Biosciences	human	mouse		My31
CD56	APC	BD Biosciences	human	mouse		
c-myc	purified	Dianova	human	mouse	IgG1	9E10.3
GFP	purified	Santa Cruz		rabbit		
His	purified	Stressgen	human	mouse		
HRS	purified	Bethyl Laboratories, Inc.	human	rabbit	poly	
Hsp 70	purified	StressGen	human	mouse		

#### 4 Material und Methode

<b>Antigen</b>	<b>Fluoro- chrom</b>	<b>Firma</b>	<b>gegen Spezies</b>	<b>aus Spezies</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Klon</b>
<b>IgG</b>	PE	BD Biosciences	human	mouse		
<b>IgG Fc</b>	purified	Dianova	human	goat	F(ab)2	
<b>LAMP2b</b>	purified	Abcam	human	rabbit	IgG	
<b>MICA/B</b>	purified	BD Biosciences	human	mouse	IgG2a	6D4
<b>MIF</b>	purified	R&D System	human	mouse	IgG <sub>1</sub>	12302
<b>NKG2D</b>	PE	BD Biosciences	human	mouse	IgG1	
<b>NKp30</b>	PE	Beckman Coulter	human	mouse	IgG1	Z25
<b>NKp30</b>	purified	Santa Cruz	human	goat	poly IgG	G-19
<b>NKp46</b>	purified	Santa Cruz	human	goat	poly IgG	C-20
<b>NKp46</b>	purified	BD Pharmingen	human	mouse		9E/2
<b>NKp46</b>	PE	Beckman Coulter	human	mouse	IgG1	BAB281
<b>NKp46</b>	PE	R&D systems	human	mouse	IgG2b	
<b>S4160 (antiBAT3)</b>	purified	Pogge, unpublished	human	rabbit	poly	
<b>3E4 (antiBAT3)</b>	purified	Pogge, unpublished	human	mouse		3E4

**Tabelle 4.7** Verwendete Antikörper.

## 5 Ergebnisse

Im Hinblick auf den Transport des nukleär lokalisierten Proteins BAT3 war aus Vorarbeiten bereits bekannt, dass BAT3 nach Stressinduktion wie z.B. einem nicht letalen Hitzeschock, von verschiedenen Zelllinien ins extrazelluläre Milieu abgegeben wird. Unklar ist, über welchen Mechanismus BAT3 vom Zellkern aus der Zelle transportiert wird. Erste Indizien wiesen daraufhin, dass die Freisetzung von BAT3 aus der Zelle u.a. über den exosomalen Transportweg erfolgt, da BAT3 auf der Oberfläche von Exosomen nachgewiesen werden konnte [Simhadri, Reiners et al. 2008; Simhadri 2008]. Die Arbeit von Trajkovic et al. [Trajkovic, Hsu et al. 2008] zeigt, dass die neutrale Sphingomyelinase 2 (nSMase2, SMPD3) an der Bildung von Exosomen beteiligt ist. Um eine mögliche Korrelation zwischen der Aktivität von nSMase2 und dem Transport von BAT3 aus der Zelle zu untersuchen, wurde hier die nSMase2-Aktivität inhibiert bzw. das Enzym überexprimiert.

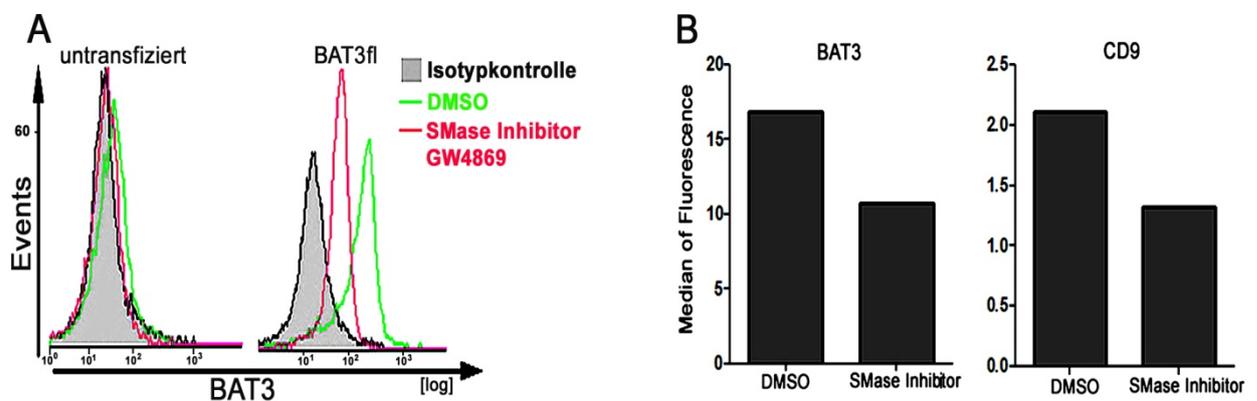
### 5.1 Die Aktivität von nSMase2 beeinflusst den exosomalen Transport von BAT3

In einem ersten Ansatz wurde die Aktivität der nSMase2 in 293T Zellen mit dem spezifischen Inhibitor GW4869 inhibiert und eine potentielle Auswirkung dieser Hemmung auf die Sekretion von Exosomen mittels FACS-Analyse gemessen. Hierfür wurden untransfizierte und mit BAT3 *full length* (fl) transient transfizierte 293T Zellen für 16 h mit 5  $\mu$ M GW4869 und als Kontrolle mit DMSO behandelt. Die Überexpression von BAT3 fl in 293T Zellen diente dazu, einen möglichen Effekt beim Nachweis von exosomal gebundenen BAT3 zu verdeutlichen. Für eine verstärkte Exosomensekretion wird häufig ein nicht letaler Hitzeschock durchgeführt, der auch hier zu einer vermehrten Abgabe der Exosomen von 293T Zellen führte. Die Exosomen wurden aus dem Zellüberstand aufgereinigt und für folgende FACS-Analysen an Latex-Beads gekoppelt. Diese wurden gegen BAT3 und CD9 gefärbt (Abb. 5.1). CD9 ist ein Marker für Exosomen, der als Maßeinheit verwendet wurde, da eine Proteinbestimmung von Exosomen z.B. nach Bradford nicht möglich ist.

Das Histogramm der untransfizierten Zellen in Abbildung 5.1 A zeigt eine schwache, aber reproduzierbare Expression von BAT3 auf Exosomen (grün). Diese ist nach ei-

ner Behandlung mit dem Inhibitor GW4869 nicht mehr nachweisbar (pink). Deutlicher lässt sich dieser Effekt nach der Überexpression von BAT3 in 293T Zellen (rechts) zeigen. In unbehandelten Zellen ist nach BAT3-Transfektion eine deutliche Zunahme der Expression auf den Exosomen um eine Logstufe nachweisbar. Dies wird in Anwesenheit von GW4869 drastisch reduziert.

Das schwächere Signal von BAT3 nach der Behandlung mit GW4869 korreliert also mit einer geringeren Exosomenbildung. Das heißt BAT3 wird nach der Inhibition der nSMase2-Aktivität nicht mehr oder wenig effektiv aus der Zelle transportiert.



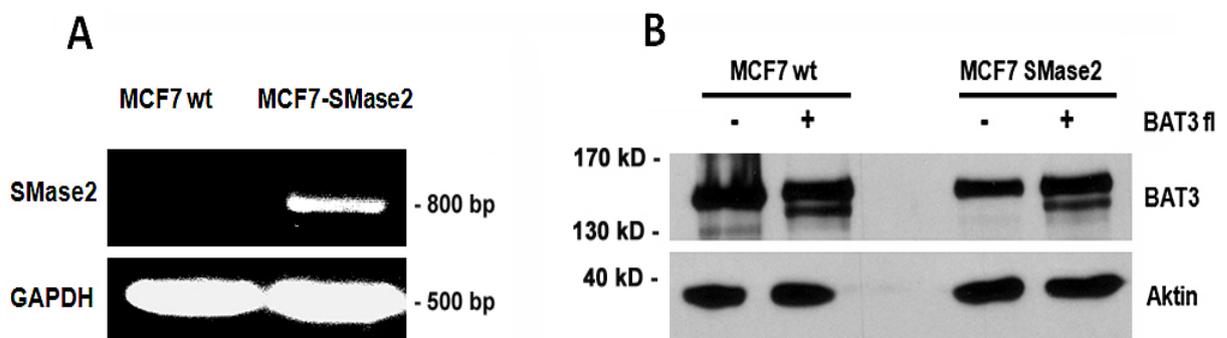
**Abb. 5.1 FACS-Analysen von Exosomen untransfizierter und mit BAT fl transfizierter 293T nach Behandlung mit GW4869.** (A) Histogramme von Exosomen untransfizierter (links) und mit BAT3 fl transfizierter (rechts) 293T Zellen nach Behandlung mit 5  $\mu$ M GW4869 (pink). Behandlung mit DMSO (grün) dient als Negativkontrolle. Nachgewiesen wurde BAT3 auf Exosomen. Die Werte in den Histogrammen sind logarithmisch aufgetragen. (B) Graphische Darstellung des Median der gemessenen Fluoreszenz im FACS (1 von 3 repräsentativen Experimenten). Dargestellt sind die Messungen von BAT3-positiven Exosomen (links) und dem Exosomenmarker CD9 (rechts).

Die graphische Darstellung des Median der gemessenen Fluoreszenz eines typischen Experiments in Abbildung 5.1 B demonstriert den gleichen Effekt. Nach der Inhibition von nSMase2 mittels GW4869 wird im Durchflusszytometer weniger BAT3 gemessen. Dies ist vergleichbar mit dem geringeren Signal von CD9. Folglich hat die Aktivität von nSMase2 hier einen deutlichen Einfluss auf den exosomalen Transport von BAT3.

Zur Validierung dieser Ergebnisse wurde in einem weiteren Ansatz die Zelllinien MCF7wt und MCF7-SMase2 verwendet. MCF7wt Zellen weisen eine geringe

nSMase2-Aktivität auf, während die Zelllinie MCF7-SMase2 das Enzym stabil über-exprimiert.

Zunächst wurde durch cDNA von MCF7wt und MCF7-SMase2 das Expressionslevel von nSMase2 in beiden Zelllinien bestimmt. Das Ergebnis der PCR in Abbildung 5.2 A belegt eine starke Expression von nSMase2 in der Zelllinie MCF7-SMase2, während MCF7wt Zellen keine oder nur eine sehr schwache Expression von nSMase2 zeigen. Als interne Standardkontrolle diente das *housekeeping* Gen GAPDH. Die übereinstimmenden PCR-Produkte bestätigen, dass gleiche Mengen cDNA eingesetzt wurden.

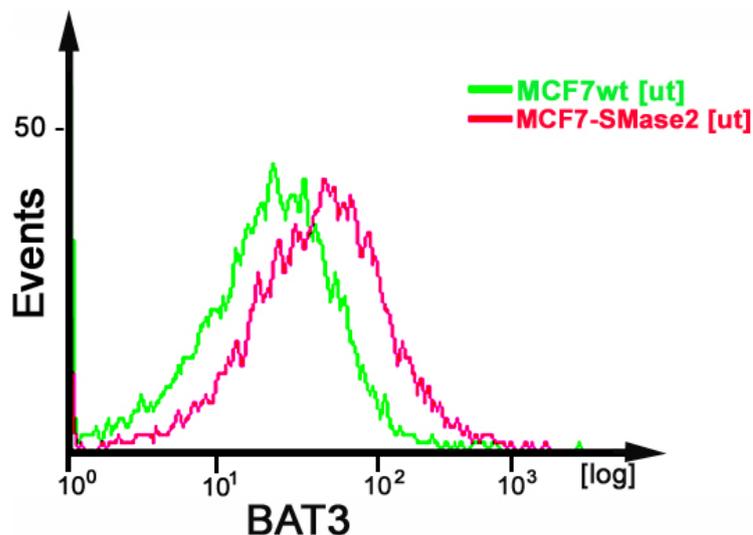


**Abb. 5.2 PCR mit cDNA und Westen Blot aus Zelllysaten von MCF7wt und MCF7-SMase2 Zellen.** (A) PCR von cDNA aus MCF7wt und MCF7-SMase2 Zellen zum Nachweis der nSMase2-Expression. Als interne Standardkontrolle für gleiche DNA-Ausgangsmengen diente GAPDH. (B) Der Western Blot zeigt endogenes und transfiziertes BAT3 aus MCF7wt- und MCF7-SMase2 Zelllysaten. Die Aktin-Kontrolle belegt das Auftragen gleicher Proteinmengen.

Da eine Expression von BAT3 in beiden Zelllinien für weitere Fragestellungen von essentieller Bedeutung ist, wurden Zelllysate von untransfizierten und mit BAT3 fl transfizierten MCF7wt und MCF7-SMase2 Zellen im Western Blot analysiert. Die Abbildung 5.2 B belegt die Expression von endogenen und transfizierten BAT3 in beiden Zelllinien. Dabei gibt es nur geringe Unterschiede in der BAT3-Proteinmenge zwischen den Zelllinien, was die Bandenstärken von BAT3 in MCF7wt und MCF7-SMase2 zeigen. Die Aktin-Kontrolle dient zum Nachweis gleichmäßig aufgetragener Proteinmengen. Damit ist die wichtige Voraussetzung, dass BAT3 in MCF7 Zellen exprimiert wird, für die anschließenden Experimente gegeben.

Im nächsten Schritt wurde das BAT3-Expressionslevel auf Exosomen im Durchflusszytometer bzw. im spezifischen BAT3 ELISA die Exosomen von MCF7wt und MCF7-SMase2 Zellen gemessen (Abb. 5.3 und Abb. 5.4). Des Weiteren wurden die Überstände und aufgereinigten Exosomen von untransfizierten und mit BAT3 fl transfizierten MCF7wt und MCF7-SMase2 Zellen nach einem nicht letalen Hitzeschock im Western Blot analysiert (Abb. 5.5).

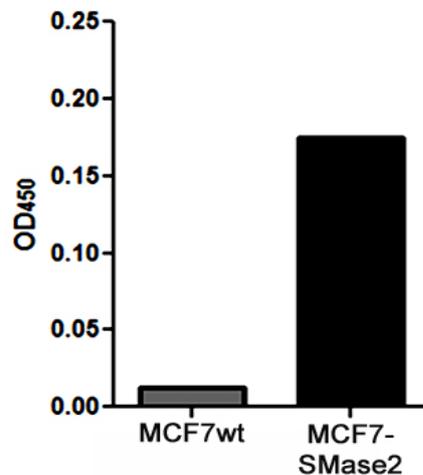
Die Messungen der Exosomen von untransfizierten und mit BAT3 fl transfizierten MCF7wt und MCF7-SMase2 Zellen im Durchflusszytometer zeigen einen Unterschied zwischen den beiden Zelllinien (Abb. 5.3). Bei den Exosomen von MCF7wt Zellen wird ein schwächeres Signal detektiert als bei MCF7-SMase2 Zellen. Das bedeutet, dass von MCF7wt Zellen weniger Exosomen sekretiert werden als im Vergleich zu MCF7-SMase2 Zellen. Gleichzeitig impliziert das schwächere Signal bei MCF7wt einen geringeren Transport von BAT3, während bei MCF7-SMase2 Zellen BAT3-positive Exosomen gemessen wurden. Dies stärkt die Hypothese, dass nSMase2 am Transport von BAT3 beteiligt ist.



**Abb. 5.3 Exosomen von untransfizierten MCF7wt und MCF7-SMase2 Zellen.** Die Exosomen von untransfizierten MCF7wt (grün) und MCF7-SMase2 Zellen (pink) wurden im Durchflusszytometer gemessen. Die Werte im Histogramm sind logarithmisch aufgetragen.

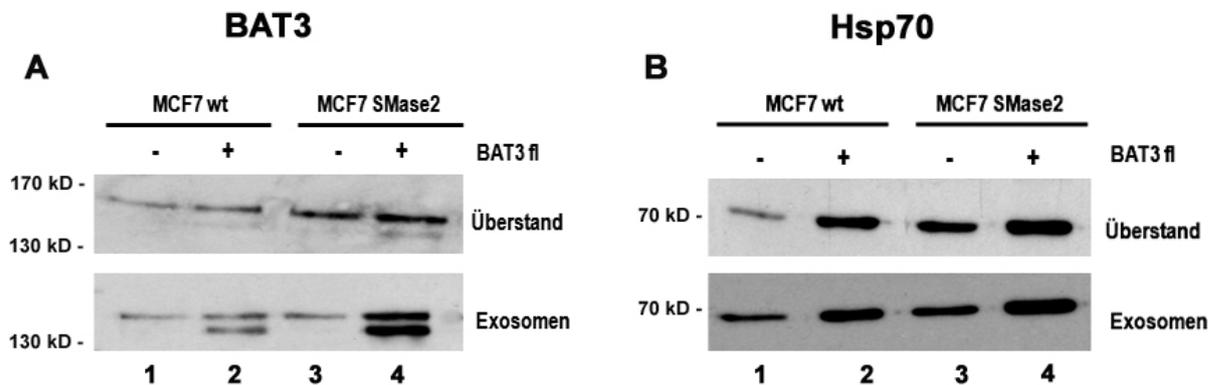
Ein spezifischer BAT3 ELISA mit Exosomen belegt weiterhin den Einfluss der nSMase2-Aktivität auf den Transport von BAT3-positiven Exosomen (Abb. 5.4). Nach einer Exosomenaufreinigung von MCF7wt Zellen wurde weniger BAT3 detektiert als

im Vergleich zu MCF7-SMase2 Zellen. Bei MCF7-SMase2 Zellen wurden deutlich mehr BAT3-positive Exosomen gemessen.



**Abb. 5.4 Bestimmung der Menge an BAT3-positiven Exosomen von MCF7wt und MCF7-SMase2 Zellen im ELISA.** Die Darstellung zeigt die Menge an BAT3-positiven Exosomen der Zelllinien MCF7 wt und MCF7-SMase2 im ELISA.

Abbildung 5.5 (A) zeigt endogenes (Spur 1+3) und überexprimiertes BAT3 fl (Spur 2+4) in Überständen und Exosomen von MCF7wt und MCF7-SMase2 Zellen. Dabei ist zu beachten, dass die Überstände neben vielen löslichen Faktoren auch Exosomen enthalten. Eine Aktin-Kontrolle ist nur bei Zelllysaten sinnvoll und wurde deshalb nicht angewendet. Der Blot zeigt im Überstand und der exosomalen Fraktion eine stärkere Expression von BAT3 in MCF7-SMase2 Zellen, als in MCF7wt Zellen. Besonders deutlich wird dies nach Überexpression (Transfektion) von BAT3 (Spur 2+4). Dies bestätigt, dass nSMase2 Einfluss auf die Sekretion von BAT3 hat.

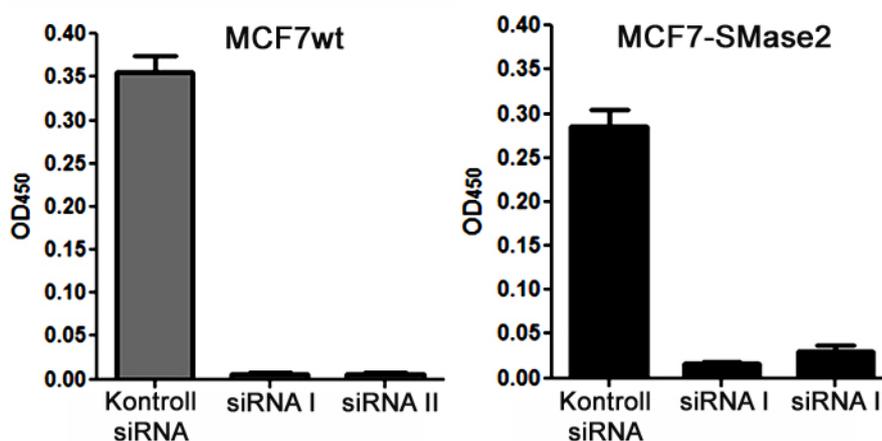


**Abb. 5.5 Überstände und Exosomen untransfizierter und mit BAT3 fl transfizierter MCF7wt und MCF7-SMase2 Zellen.** Die Western Blots zeigen Überstände und aufgereinigte Exosomen von MCF7wt und MCF7-SMase2 Zellen. Zu sehen sind endogenes (1+3) und transfiziertes (2+4) BAT3 (A), sowie Hsp70 (B). Zu (A): Für den Nachweis von BAT3 wurde der ch-antiBAT3 verwendet. Die Doppelbanden treten typischerweise nach einer Transfektion mit pCDNA3.1-BAT3fl auf.

Der Blot in Abbildung 5.5 B zeigt den Nachweis von Hsp70 in Überständen und Exosomen von MCF7wt und MCF7-SMase2 Zellen. Für Hsp70 ist bekannt, dass es exosomal-gebunden von Zellen sekretiert wird [Gastpar, Gehrman et al. 2005] und es mit BAT3 interagieren kann. Die Unterschiede der Intensität der Proteinbanden zeigen auch hier, dass die Aktivität von nSMase2 den exosomal Transport beeinflusst. So ist deutlich mehr Hsp70 in Überstand und Exosomen nachweisbar, wenn nSMase2 überexprimiert wird (Spur 3+4). Eine Transfektion mit BAT3 fl verstärkt zusätzlich die extrazellulär nachweisbare Proteinmenge von Hsp70 (Spur 2+4). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass BAT3 und Hsp70 interagieren und beim Transport assoziieren können. Eine erhöhte BAT3-Proteinmenge würde demnach eine ebenfalls erhöhte Hsp70-Proteinmenge auf Exosomen bedingen. Eine andere Erklärung könnte sein, dass die Überexpression von BAT3 in MCF7wt und MCF7-SMase2 Zellen sich zusätzlich zum *heat shock*, dem alle Zellen ausgesetzt waren, sich als Stress auswirkt. Die erhöhte Hsp70-Expression könnte somit eine Folgereaktion auf zellulären Stress sein.

In einem letzten Ansatz zur Fragestellung, welchen Einfluss die Aktivität von nSMase2 auf den exosomal Transport von BAT3 hat, wurden MCF7wt und MCF7-SMase2 Zellen mit nSMase2-spezifischen siRNAs (siRNA I, siRNA II) behandelt. Bei dieser Methode bildet die siRNA Dimere mit der RNA von Proteinen, welche in der Zelle von sogenannten Dicer-Proteinen erkannt und schließlich abgebaut werden.

Für die Mengenbestimmung der BAT3-positiven Exosomen wurden die Überstände von MCF7wt und MCF7-SMase2 Zellen 24 h nach Transfektion mit siRNA I und siRNA II im BAT3-spezifischen ELISA gemessen. Die Überstände wurden zunächst konzentriert, um die im Überstand enthaltenen Exosomen messen zu können. Da MCF7wt Zellen eine sehr geringe Sekretion von Exosomen zeigten (Abb. 5.4), wurde für die Behandlung von MCF7wt Zellen entsprechend mehr Zellen und Überstand eingesetzt, um einen möglichen Effekt zeigen zu können.



**Abb. 5.6 Überstände von MCF7wt und MCF7-SMase2 Zellen nach Behandlung mit siRNA.** Im ELISA wurde die BAT3-Menge im Überstand von MCF7wt (links) und MCF7-SMase2 Zellen (rechts) bestimmt. Die Zellen wurden zuvor mit nSMase2-spezifischen siRNAs behandelt. Kontrolle: unspezifische Kontroll-siRNA AF488; siRNA I: in Kooperation mit Prof. Dr. Krönke; siRNA II: Hs\_SMPD3 von Qiagen.

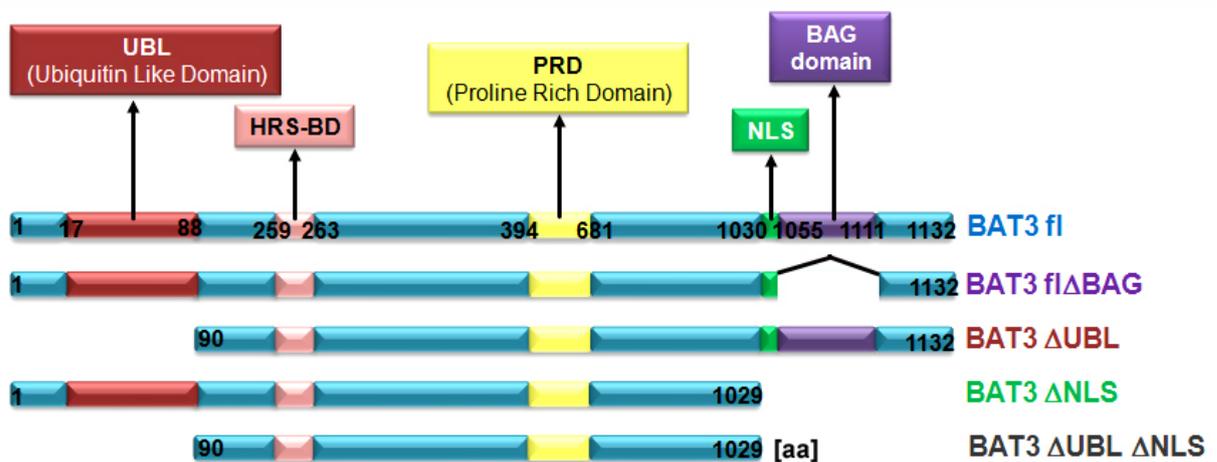
Abbildung 5.6 zeigt, dass die Behandlung mit siRNA in beiden Zelllinien in einer nicht mehr nachweisbaren Menge an BAT3-positiven Exosomen resultiert. Der *knockdown* des Enzyms nSMase2 führt folglich dazu, dass keine Exosomen gebildet werden und BAT3 somit nicht mehr aus der Zelle transportiert wird.

Die Resultate dieser Versuchsansätze belegen somit, dass BAT3 von Zellen über den exosomalen Transportweg sekretiert wird. So konnte gezeigt werden, dass die verringerte Sekretion von Exosomen durch Inhibition von nSMase2, die essentiell für die Exosomen-Biogenese ist, mit einer geringeren Sekretion von BAT3 korreliert. Das Gleiche wurde nach einem *knockdown* von nSMase2 mRNA gezeigt, der in ei-

ner gleichzeitig verringerten Sekretion von BAT3 resultierte. Eine Überexpression von nSMase2 zeigte simultan eine erhöhte Sekretion von BAT3.

## 5.2 Die Bedeutung der Proteindomänen für die Lokalisation und den Transport von BAT3

Um den möglichen Einfluss einzelner Proteindomänen von BAT3 auf die Lokalisation und den Transport zu untersuchen, wurden unterschiedliche Deletionskonstrukte kloniert und verwendet (siehe Abb. 5.7).



**Abb. 5.7 Aufstellung verschiedener BAT3-Konstrukte.** Die Darstellung zeigt die Proteindomänen (Angaben in aa) von BAT3 und die unterschiedlichen Deletionskonstrukte. Diese wurden in den Expressionsvektor pcDNA3.1 kloniert. Das Konstrukt BAT3 fl besteht aus der kompletten Aminosäuresequenz. BAT3ΔBAG ist durch den Wegfall der BAG-Domäne im C-Terminus verkürzt. Bei BAT3ΔUBL wurden die ersten 90 aa am N-Terminus deletiert, bei BAT3ΔNLS die letzten 103 aa vom C-Terminus. Das Konstrukt BAT3ΔUBLΔNLS weist Deletionen am N- und C-Terminus auf.

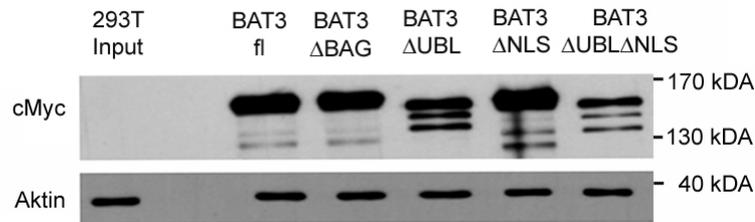
Neben dem BAT3-Konstrukt mit kompletter Aminosäuresequenz von 1132 aa (BAT3 fl) wurde eine Splicevariante von BAT3 ohne BAG-Domäne (BAT3ΔBAG) in den Expressionsvektor pcDNA3.1 kloniert. Die BAG-Domäne ist wichtig für eine Interaktion mit Hsp70 [Corduan, Lecomte et al. 2009]. Zur Untersuchung möglicher Veränderungen im Transport von BAT3 wurde die UBL-Domäne im N-Terminus deletiert (BAT3ΔUBL und BAT3ΔUBLΔNLS). Es ist bekannt, dass HRS aus der ESCRT-

Maschinerie mit UBL-Domänen verschiedener Proteine assoziieren kann und diese zu den MVBs sortiert [Kobayashi, Tanaka et al. 2005]. Zusätzlich zur UBL-Domäne besitzt BAT3 eine Konsensussequenz für die HRS-Bindedomäne (HRS-BD) mit dem Bindemotiv PTPAP [Schlundt, Sticht et al. 2009], über das HRS mit der HRS-BD interagieren kann. Der Polyprolin-Stretch (*Polyprolin rich domain*, PRD) ermöglicht die Assoziation mit Signalproteinen. Für eine veränderte Lokalisation von BAT3 wurden Deletionskonstrukte mit einem verkürzten C-Terminus ohne NLS verwendet (BAT3 $\Delta$ NLS und BAT3 $\Delta$ UBL $\Delta$ NLS). Dadurch konnten mögliche Einflüsse auf den Transport durch eine Lokalisation im Zytoplasma näher analysiert werden.

### 5.2.1 Alle BAT3-Deletionsmutanten werden nach Transfektion in 293T Zellen exprimiert

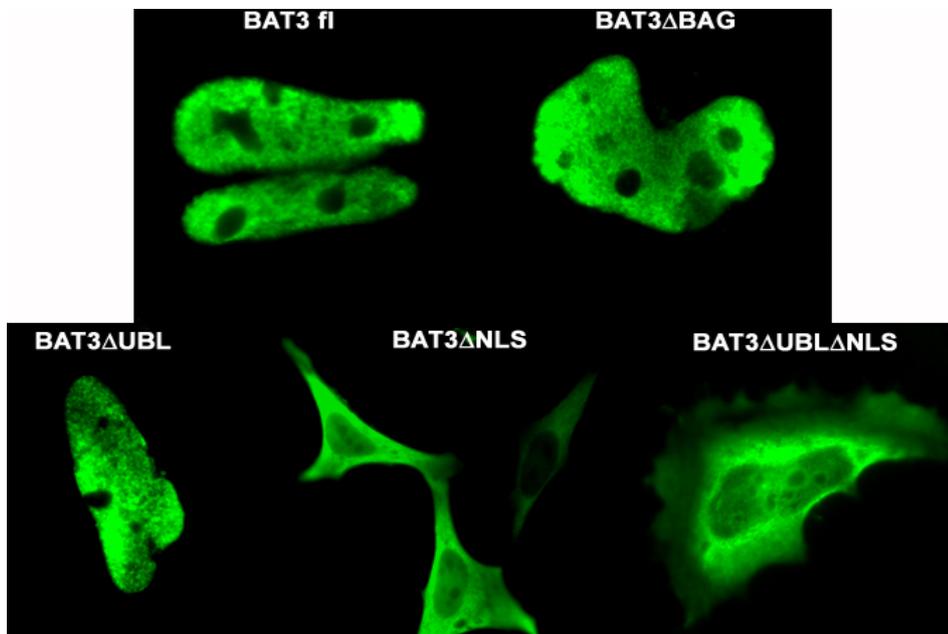
Die zuvor beschriebenen BAT3-Deletionskonstrukte wurden zunächst durch DNA-Sequenzierungen auf die Vollständigkeit ihrer Sequenzen überprüft. Im nächsten Schritt wurden die BAT3-Deletionskonstrukte durch transiente Transfektion in der humanen Zelllinie 293T exprimiert. Durch die Klonierung der BAT3-Sequenzen in den Expressionsvektor pcDNA3.1 wurde BAT3 mit einem Myc-His-Tag fusioniert. Die Zelllysate transfizierter und untransfizierter 293T Zellen wurden in gleichen Proteinmengen auf SDS-Gele aufgetragen. Zum Nachweis der BAT3-cMyc-Fusionsproteine wurde mit einem Antikörper gegen cMyc gefärbt. Das endogene BAT3 wird dadurch nicht detektiert. Als interne Kontrolle für vergleichbare Proteinmengen wurde zusätzlich gegen Aktin gefärbt (Abb. 5.8).

Das Protein BAT3 läuft im SDS-Gel bei reduzierenden Bedingungen zwischen 130 kDA und 170 kDA. Das tatsächliche Molekulargewicht ist abhängig von fusionierten Tags und posttranslationalen Modifikationen. Die Proteine resultierend aus den Transkripten BAT3 $\Delta$ UBL und BAT3 $\Delta$ UBL $\Delta$ NLS sind evtl. weniger stabil. Die zusätzlichen Proteinbanden deuten auf einen verstärkten Abbau hin, dessen Ursache sterische Fehlbildungen im N-Terminus sein könnten. Sie sind aber dennoch gut nachweisbar und haben das entsprechende Molekulargewicht.



**Abb. 5.8 Western Blot von Zelllysaten aus BAT3-transfizierten 293T Zellen.** 293T Zellen wurden mit BAT3-Konstrukten im Expressionsvektor pcDNA3.1 transient transfiziert. Aufgetragen wurden die Zelllysate von 293T Zellen (Mock-Vektor) und den jeweiligen BAT3-Konstrukten (siehe Beschriftung des Blots). Gefärbt wurde gegen cMyc des BAT3-cMyc-Fusionsproteins. Zur Kontrolle gleicher Proteinmengen wurde zusätzlich gegen Aktin gefärbt.

Zur Visualisierung der Expression und Lokalisation in der Zelle wurden HeLa Zellen mit unterschiedlichen BAT3-Deletionsmutanten transfiziert. Mittels immunzytochemischer Färbung wurde gegen cMyc der BAT3-cMyc-Fusionsproteine gefärbt (Abb. 5.9).



**Abb. 5.9 Lokalisation der BAT3-Deletionsmutanten in HeLa-Zellen.** Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen die Lokalisation von BAT3 mit und ohne Deletionen. Das BAT3-cMyc-Fusionsprotein wurde gegen cMyc gefärbt (grün).

Die Konstrukte BAT3 fl, BAT3 $\Delta$ BAG und BAT3 $\Delta$ UBL sind eindeutig im Zellkern nachzuweisen. Nach einer Deletion der NLS befindet sich das Protein nur noch im Zytoplasma, aber nicht mehr im Zellkern. Dies zeigen die Aufnahmen von BAT3 $\Delta$ NLS und BAT3 $\Delta$ UBL $\Delta$ NLS. Die Lokalisation von BAT3 im Zellkern ist eindeutig von der NLS abhängig, die NLS ist also funktional.

### **5.3 Die UBL-Domäne ist für ein Targeting von BAT3 auf Exosomen essentiell**

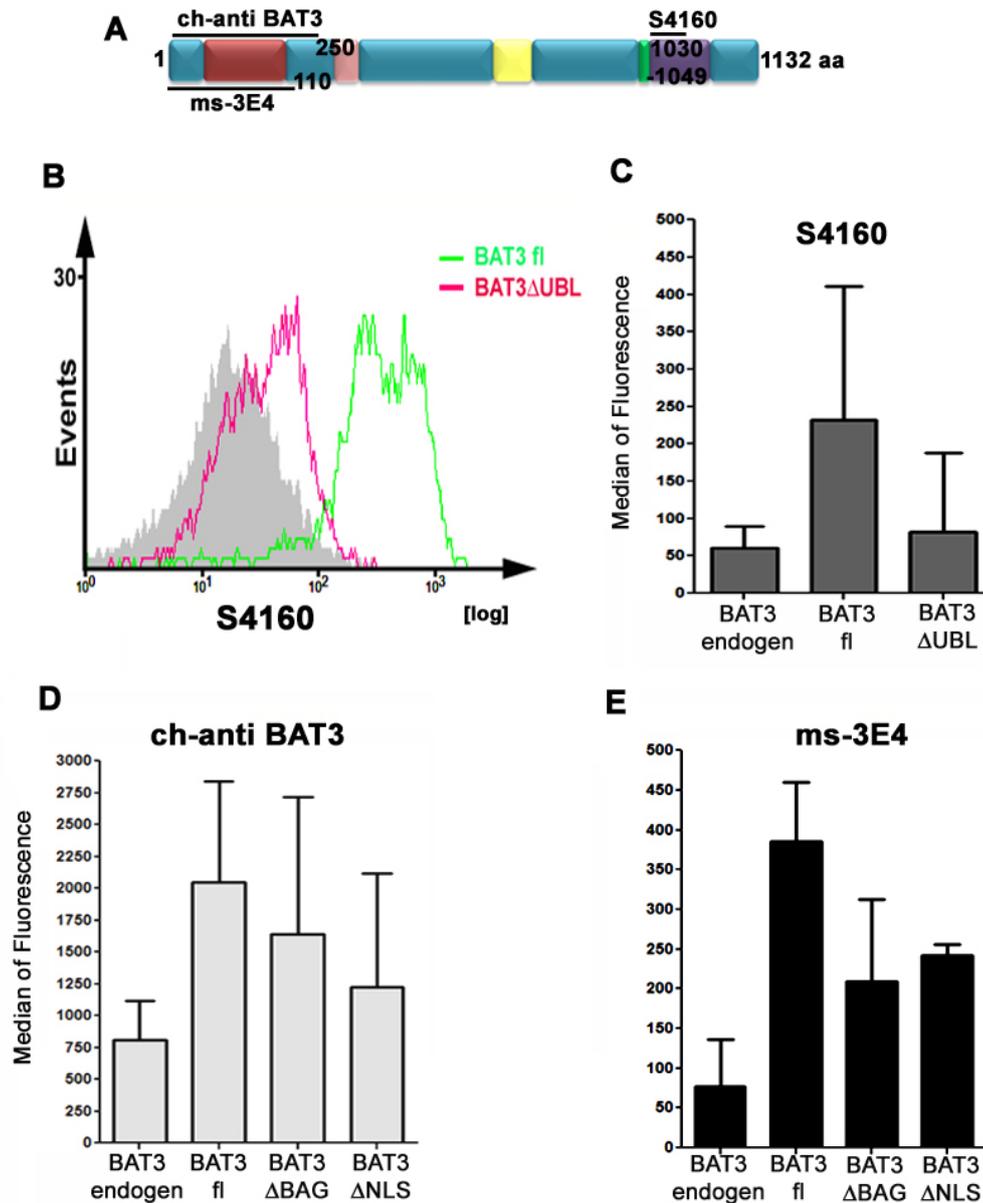
In den folgenden Experimenten wurde der Einfluss der unterschiedlichen Proteindomänen auf den Transport von BAT3 näher analysiert. Ein besonderer Schwerpunkt wurde dabei auf die Rolle von HRS gelegt, das an der intrazellulären Sortierung von Proteinen zu den MVBs beteiligt ist.

#### **5.3.1 Die UBL-Domäne ist für die exosomale Expression notwendig**

Um die Rolle von BAT3-Domänen für den exosomalen Transport zu analysieren, wurden Exosomen von 293T Zellen nach Transfektion der Deletionskonstrukte aufgereinigt. 293T Zellen exprimieren zusätzlich endogenes BAT3.

Für die Färbung der BAT3-Konstrukte auf Exosomen wurden verschiedene Antikörper eingesetzt. Diese binden unterschiedlich im N-Terminus oder im C-Terminus von BAT3 (ch-anti-BAT3: 1-250 aa, ms-3E4: 1- 110 aa, rb-S4160: 1030-1049 aa, siehe Abb. 5.10 A). Durch die Deletionen im N- und C-Terminus können die verwendeten Antikörper deshalb nicht jede Variante von BAT3 detektieren. Der cMyc-Antikörper konnte für die FACS-Analyse nicht verwendet werden.

Abbildung 5.10 B-E zeigt die Ergebnisse dreier unabhängigen Messungen von Exosomen transfizierter 293T Zellen. Dabei wurden die Graphen nach BAT3-Antikörpern unter Berücksichtigung ihrer Bindungsmöglichkeit unterteilt (C-E).



**Abb. 5.10 Exosomen transfizierter 293T Zellen.** Im Durchflusszytometer wurden Exosomen mit unterschiedlichen BAT3-Deletionkonstrukten untersucht (B-E). (A) Schematische Darstellung von BAT3 und der Bindungsstellen der verwendeten Antikörper. Gefärbt wurde mit folgenden Antikörpern: (B/C) rb-S4160 (C-terminal), (D) ch-antiBAT3 (N-terminal), (E) ms-3E4 (N-terminal). (B) zeigt ein typisches Histogramm, das dem Graphen aus (C) entspricht. Exosomen untransfizierter 293T entsprechen der Menge an endogenem BAT3. In den Graphen wurden je drei unabhängige Messungen zusammengefasst (n=3).

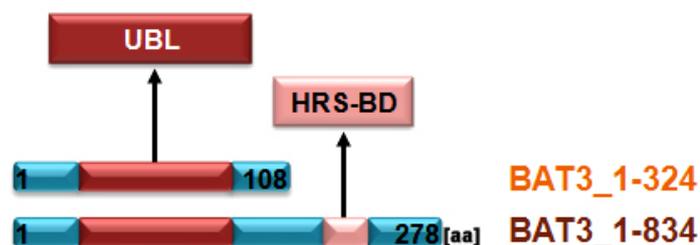
Die Graphen C-E zeigen, dass BAT3 fl nach Überexpression in hohen Konzentrationen auf den Exosomen detektiert werden kann. Dies konnte mit allen drei anti-BAT3 Antikörpern gezeigt werden. Das Histogramm (B) zeigt eine typische Messung von BAT3 fl und BAT3 $\Delta$ UBL. Das gemessene Signal von BAT3 $\Delta$ UBL ist im Vergleich zu BAT3 fl drastisch reduziert. Dies konnte in drei unabhängigen Messungen gezeigt werden (C). Beim Vergleich der Werte (n=3) von endogenen BAT3 mit BAT3 $\Delta$ UBL zeigt sich kaum ein Unterschied. Die Expression von BAT3 $\Delta$ UBL ist also auf Exosomen praktisch nicht nachweisbar. Die Deletion der UBL-Domäne scheint verantwortlich zu sein, dass BAT3 nicht mehr zu den Exosomen transportiert wird.

Die Konstrukte BAT3 $\Delta$ BAG und BAT3 $\Delta$ NLS sind beide auf Exosomen nachweisbar, aber in geringeren Mengen als BAT3 fl. Sie scheinen somit auch beim Transport von BAT3 eine Rolle zu spielen, aber nicht so entscheidend wie die UBL-Domäne.

Das Konstrukt BAT3 $\Delta$ UBL $\Delta$ NLS konnte nicht detektiert werden, da keiner der verwendeten Antikörper ausreichend binden kann (siehe Abb. 5.10 A).

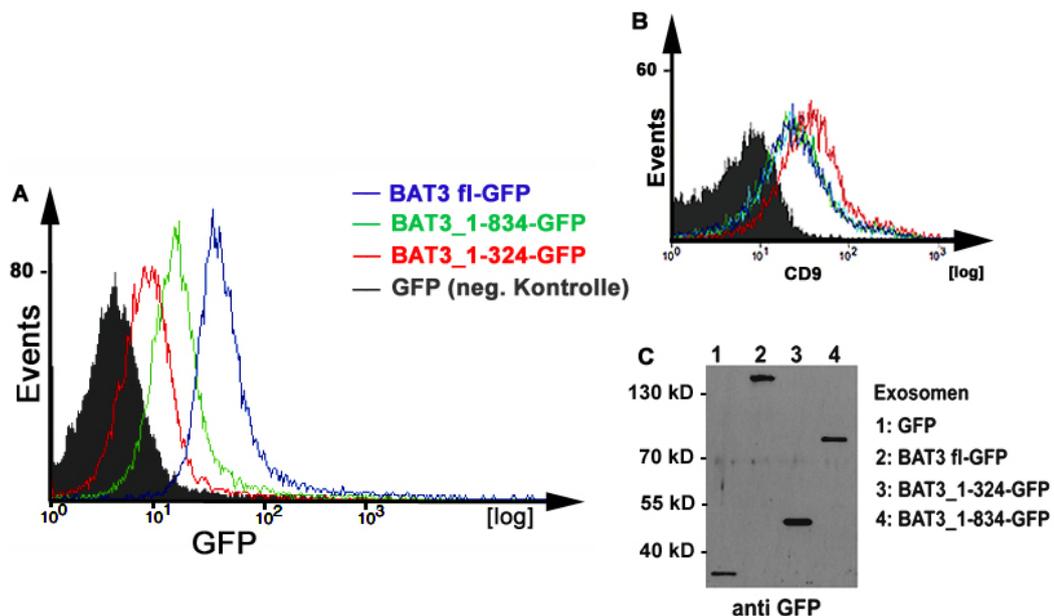
### 5.3.2 Die HRS-Bindedomäne verbessert den Transport von BAT3

Die Daten zeigen, dass die UBL-Domäne für den exosomalen Transport von BAT3 notwendig ist. Zusätzlich wurde untersucht, ob diese Sequenz ausreichend für den Transport von Proteinen auf Exosomen ist. Hierfür wurde der trunktierte N-Terminus von BAT3 mit GFP als *Tracer* fusioniert. Das Konstrukt BAT3\_1-324 enthält nur den Bereich um die UBL-Domäne (324 bp), während das Konstrukt BAT3\_1-834 (834 bp) zusätzlich eine HRS-BD mit dem Konsensus-Bindemotiv PTPAP enthält (Abb. 5.11). Als Expressionsvektor wurde pEGFP verwendet.



**Abb. 5.11 Trunktierte BAT3-UBL-Konstrukte.** Die Konstrukte BAT3\_1-324 und BAT3\_1-834 enthalten den N-Terminus von BAT3 und wurden in den Expressionsvektor pEGFP kloniert. BAT\_1-324 besteht dabei aus 108 aa inklusive der UBL-Domäne (1-324 bp), BAT3\_1-834 enthält zusätzlich zur UBL-Domäne die HRS-BD (1-834 bp bzw. 278 aa).

Für FACS-Analysen wurden BAT3 fl, BAT3\_1-324 und BAT3\_1-834 im Expressionsvektor pEGFP in 293T Zellen exprimiert und die Exosomen aufgereinigt. Als Negativkontrolle dienten Exosomen von Zellen nach Transfektion mit GFP. Zum Nachweis der Fusionskonstrukte wurde das Signal von GFP im FACS gemessen. Zur Normierung der Exosomen wurde zu dem CD9 als Exosomen-Marker quantifiziert (Abb. 5.12 B).



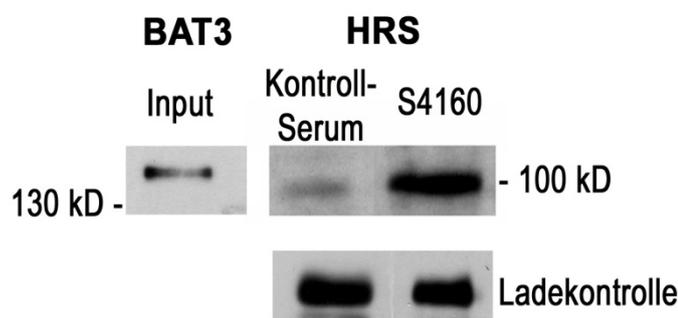
**Abb. 5.12 FACS-Analyse mit BAT3-UBL-Konstrukten.** (A+B) Im FACS wurden Exosomen von 239T Zellen nach Transfektion mit BAT3 fl (blau), BAT3\_1-834 (grün) und BAT3\_1-324 analysiert. Als Negativkontrolle dienten Exosomen von GFP-exprimierenden Zellen. Das Histogramm (A) zeigt die Messungen für GFP, das Histogramm (B) zeigt die Werte für CD9. Die Werte in den Histogrammen sind logarithmisch aufgetragen. (C) Der Western Blot zeigt Exosomen mit (1) GFP, (2) BAT3 fl-GFP, (3) BAT3\_1-324-GFP und (4) BAT3\_1-834-GFP. Gefärbt wurde mit anti-GFP.

Das Histogramm in Abbildung 5.12 A zeigt, dass die UBL-Domäne als *Targeting*-Signal für den exosomalen Transport dienen kann. GFP alleine kann nicht auf Exosomen nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu kann bereits das Fusionsprotein BAT3\_1-324, das nur die UBL-Domäne enthält, auf der Oberfläche von Exosomen detektiert werden. Deutlich verstärkt wird das Detektionssignal, wenn zusätzlich die HRS-Bindedomäne vorhanden ist. BAT3 fl als Positivkontrolle zeigt das stärkste Signal. Der Western Blot von Exosomen transfizierter 293T Zellen zeigt, dass die eingesetzten Kontrollen alle exprimiert werden (Abb. 5.12 C).

Die UBL-Domäne ist wie erwartet essentiell wichtig für den Transport. Zusammen mit der HRS-Bindedomäne wird der exosomale Transport noch verbessert.

### 5.3.3 Endogenes BAT3 interagiert mit HRS

Um eine physikalische Interaktion von BAT3 und HRS *in vitro* nachzuweisen, wurde eine co-Immunpräzipitation (co-IP) durchgeführt. Hierfür wurden Zelllysate lysierter 293T Zellen mit Protein G-Sepharose prä-inkubiert, um unspezifisch bindende Faktoren aus den Lysaten zu entfernen. Im Anschluss wurden die gereinigten Lysate mit dem BAT3-Antikörper S4160 inkubiert, der zuvor an Protein G-Beads gekoppelt wurde. Potentielle interagierende Proteine werden zusammen mit BAT3 mithilfe des BAT3 Antikörpers präzipitiert. Als Isotypkontrolle wurde mouse-IgG anstelle von anti-BAT3 verwendet. Die inkubierten Protein G Beads wurden im Western Blot analysiert. Dabei wurde mit anti-HRS gefärbt, um eine Bindung von HRS an BAT3 zu belegen. Als Input wurden von lysierte 293T Zellen endogenes BAT3 im Western Blot nachgewiesen und als Ladekontrolle für die co-IP dienten die Protein G Beads.



**Abb. 5.13 Western Blot einer co-IP mit anti-BAT3 S4160 aus 293T Zelllysaten.** Für die co-IP wurde Protein G-Sepharose mit anti-BAT3 S4160 vorbehandelt und anschließend mit 293T Zelllysaten inkubiert. Die Blot-Membran wurde mit anti-HRS gefärbt. Als Input wurde endogenes BAT3 lysierter Zellen nachgewiesen, als Ladekontrolle für den Nachweis von HRS dienten Protein G Beads im Western Blot.

Wie die Abbildung 5.13 zeigt, ist eine deutliche Bande für HRS zu erkennen. BAT3 und HRS liegen also in einem Komplex vor. Somit konnte eine Interaktion zwischen HRS und endogenem BAT3 belegt werden.

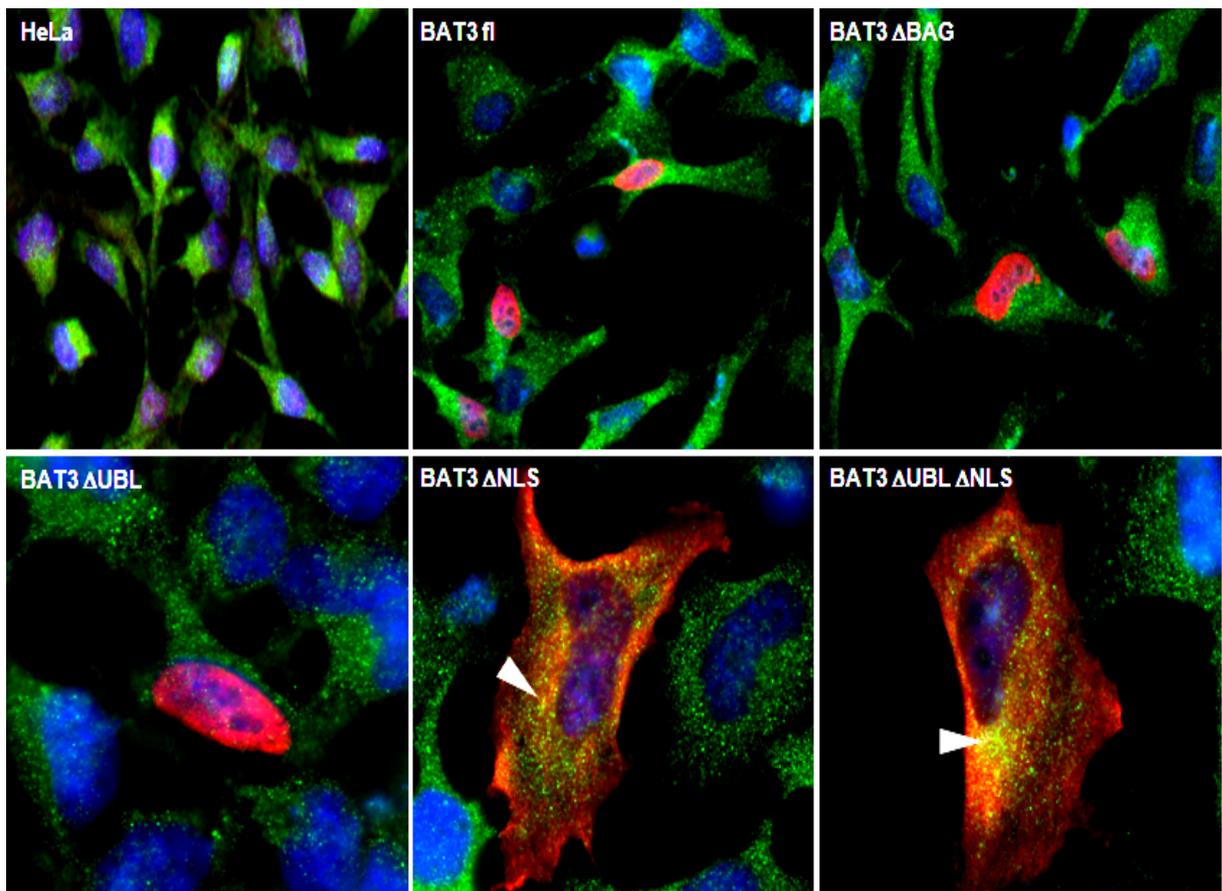
### 5.3.4 BAT3 co-lokalisiert mit HRS im Zytoplasma

Die Deletion der NLS des BAT3-Proteins resultiert in einer geänderten Lokalisation von BAT3. Diese Deletionsmutanten sind ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert und nicht mehr im Zellkern (Abb. 5.9). Einen entscheidenden Einfluss auf den exosomalen Transport von BAT3 hat diese Deletion jedoch nicht (Abb. 5.10). Im Gegensatz dazu konnte für die UBL-Domäne in den vorangegangenen Experimenten eine essentielle Rolle für den exosomalen Transport gezeigt werden. Weiterhin konnte eine Interaktion von HRS aus der ESCRT-Maschinerie mit endogenem BAT3 nachgewiesen werden (Abb. 5.13).

Zur Visualisierung dieser Interaktion zwischen HRS und BAT3 wurden HeLa Zellen mit BAT3-Deletionskonstrukten transfiziert und mittels Immunzytochemie gefärbt.

Abbildung 5.14 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellen unter nicht gestressten Bedingungen. Hierbei lokalisieren die BAT3-Konstrukte mit NLS im Zellkern und zeigen durch die Trennung in den verschiedenen Kompartimenten (Kern und Zytoplasma) keine co-Lokalisation in der intakten Zelle.

Im Gegensatz dazu sind die Deletionsmutanten BAT3 $\Delta$ NLS und BAT3 $\Delta$ UBL $\Delta$ NLS im Zytoplasma nachweisbar. Wie Abbildung 5.14 nach Überlagerung der Rot-Grün-Kanäle zeigt, ist eine Gelbfärbung (siehe Pfeil) im Bereich des Zellkerns (blau) erkennbar. Die Gelbfärbung kommt durch die Überlagerung der Signale zustande und weist damit eine co-Lokalisation der Proteine HRS und BAT3 in diesem Bereich nach. Trotz der Deletion der UBL-Domäne im Bereich 1-90 aa kann HRS mit diesen BAT3-Konstrukten interagieren. Die Aminosäuresequenz enthält immer noch die HRS-Bindedomäne, über die BAT3 mit HRS interagieren bzw. co-lokalisieren kann.



**Abb. 5.14** Mikroskop-Aufnahmen der verschiedenen BAT3-Deletionsmutaten und HRS in HeLa. In HeLa-Zellen wurden unterschiedlichen BAT3-Deletionkonstrukten exprimiert. Gefärbt wurde gegen BAT3-cMyc-Fusionsprotein (rot) und HRS (grün) zusammen mit der DAPI-Färbung (blau). Die Pfeile (weiß) zeigen eine co-Lokalisation von BAT3 und HRS im Zytoplasma.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass der exosomale Transport von BAT3 zum einen abhängig von der Aktivität von nSMase2 ist, zum anderen von der UBL-Domäne von BAT3. Zu dem belegen die Ergebnisse eine Interaktion von BAT3 mit dem HRS-Protein aus dem ESCRT-Komplex.

## 5.4 Die Rolle und Funktion von BAT3 bei einer B-CLL

Klinische Studien zeigen, dass es bei Tumorerkrankungen häufig zum *Tumor Escape* kommt, d.h. das Immunsystem wird durch verschiedenste Faktoren inhibiert. Der Tumor kann somit nicht mehr vom Immunsystem eliminiert werden und ist vor Immunantworten geschützt. Ein Beispiel ist der Makrophagen Migrationsinhibitorische Faktor (MIF) in der B-CLL, der bei dieser Erkrankung im Serum der Patienten in erhöhten Konzentrationen nachweisbar ist. Beim Zervixkarzinom und Ovarialkarzinom wurde gezeigt, dass MIF u.a. die Aktivität von NK Zellen beeinflusst. Der Aktivierungsrezeptor NKG2D wird nach einer Inkubation mit MIF herunter reguliert und somit ist die NK Zell-Funktion inhibiert [Krockenberger, Dombrowski et al. 2008; Krockenberger, Engel et al. 2010].

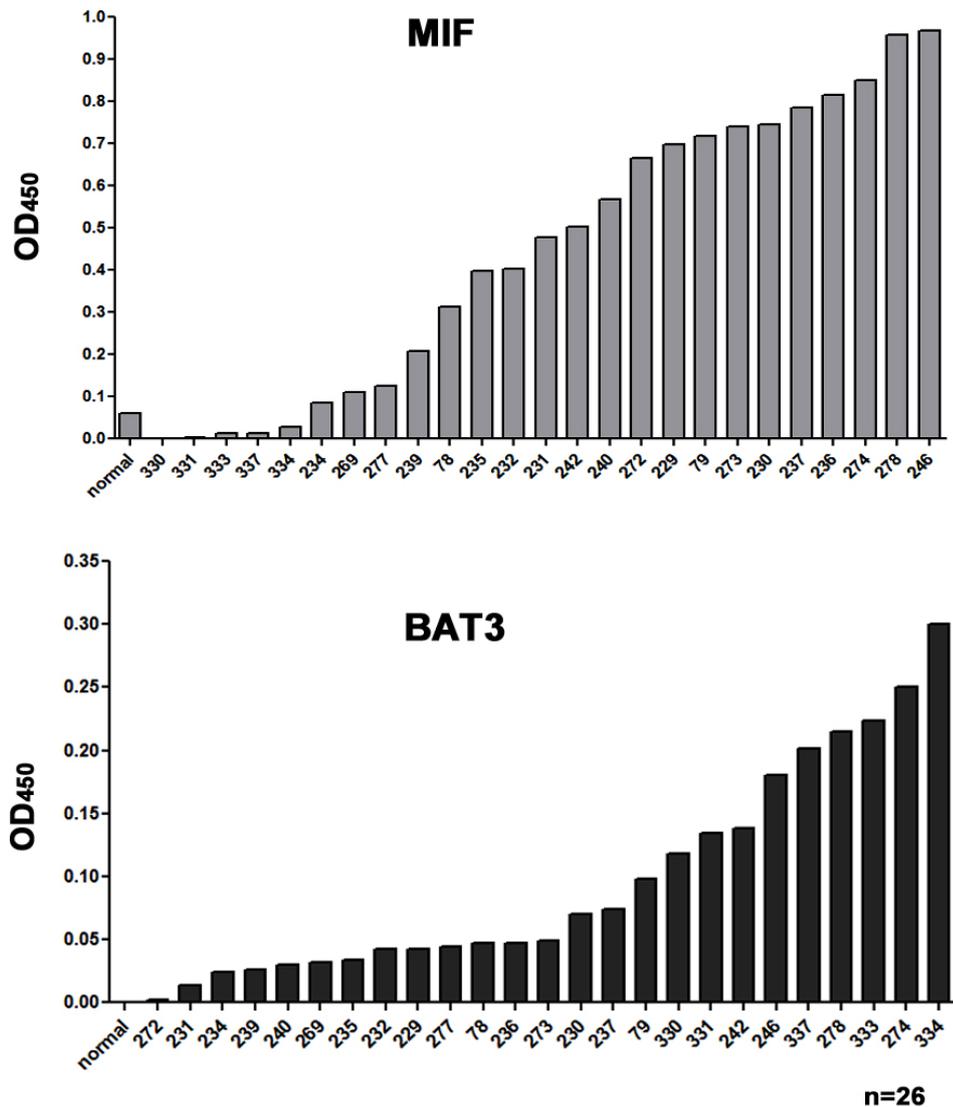
Die Liganden für NKG2D und die NCRs sind wichtig für die *Immunsurveillance*. Für NKp30 konnte in Vorarbeiten gezeigt werden, dass exosomal gebundenes BAT3 als Ligand an diesen Rezeptor bindet und NK Zellen aktiviert. Es wurde allerdings auch gezeigt, dass BAT3 als lösliches Protein die Zytokinsekretion von NK Zellen inhibiert [Pogge von Strandmann, Simhadri et al. 2007; Simhadri, Reiners et al. 2008].

In dieser Arbeit wurde die Fragestellung bearbeitet, welchen Einfluss BAT3 auf die Funktion von NK Zellen hat. Dies wurde am Beispiel der B-CLL durchgeführt.

### 5.4.1 B-CLL Patienten weisen im Serum hohe Konzentration an löslichen BAT3 und MIF auf

In einem ersten Ansatz wurden Seren von B-CLL Patienten und gesunden Probanden hinsichtlich der Konzentration von BAT3 und MIF in spezifischen ELISAs analysiert. Im Gegensatz zu gesunden Probanden wiesen etwa 2/3 der Patienten eine erhöhte Konzentration von BAT3 und MIF im Serum auf.

Abbildung 5.15 zeigt die Ergebnisse von 25 repräsentativen B-CLL Seren aus über 70 analysierten Seren. Dabei wurden die Seren mit steigender MIF- bzw. steigender BAT3-Konzentration dargestellt. Häufig korrelieren hohe MIF-Konzentrationen mit hohen BAT3-Konzentrationen (siehe Serum 246, 274, 278). Es kommen aber auch Fälle vor, bei denen viel MIF, aber wenig BAT3 nachgewiesen werden konnte (236, 240, 272) und der umgekehrte Fall mit wenig MIF und viel BAT3 (330, 334, 333). In einigen Fällen sind MIF und BAT3 nur in geringen Mengen nachweisbar (234, 269, 277).

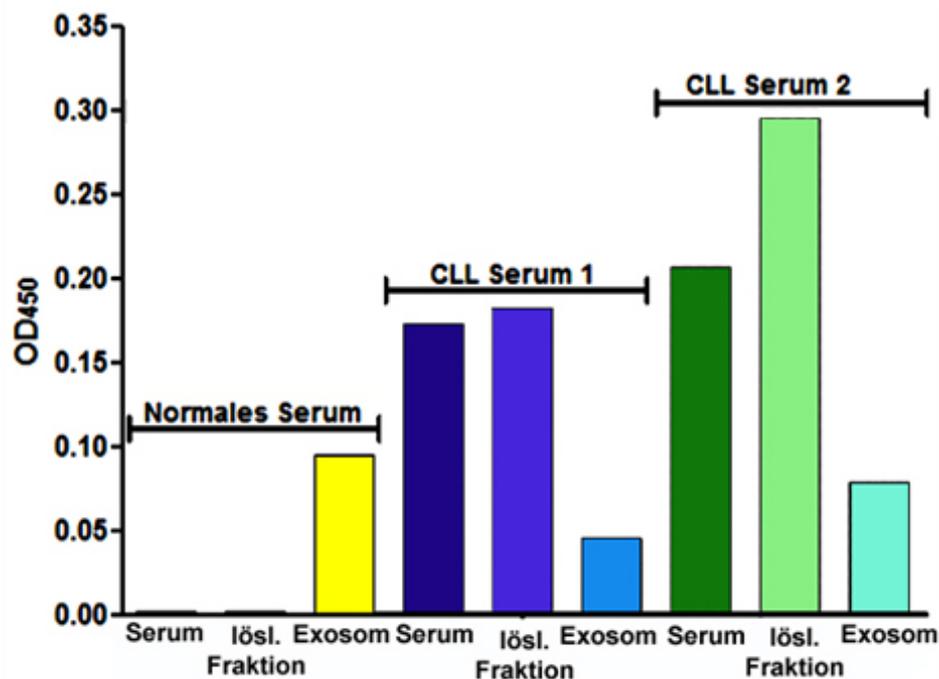


**Abb. 5.15 MIF- und BAT3-Konzentration im Serum von B-CLL Patienten.** Im ELISA wurde die Menge von MIF (oben) und BAT3 (unten) aus B-CLL Seren bestimmt. Als Beispiel wurden 25 von 70 B-CLL Seren und einem gesunden Probanden (normal) dargestellt.

Da die Liganden MICA und MICB des NK Zellrezeptors NKG2D und TGF $\beta$  bei Tumorerkrankungen vermehrt exprimiert werden, wurden auch die B-CLL Seren in spezifischen ELISAs auf diese Faktoren überprüft. Allerdings waren die Werte dieser Messungen unterhalb der Nachweisgrenze (Daten nicht gezeigt).

In einem weiteren Schritt wurde der Frage nachgegangen, ob BAT3 als lösliches Protein oder exosomal gebunden vorliegt. Dafür wurden einige Seren, die im ELISA eine erhöhte BAT3-Konzentration aufwiesen, in eine lösliche und eine exosomale Fraktion separiert. Im BAT3-spezifischen ELISAs wurde dann erneut das Expressionslevel von BAT3 in den einzelnen Fraktionen gemessen. Als Kontrolle wurde fraktioniertes Serum eines gesunden Probanden eingesetzt.

Die Darstellung (Abb. 5.16) zeigt die BAT3-Mengenbestimmung der fraktionierten Seren von einem gesunden Probanden (normales Serum) und zwei B-CLL Patienten. Das Normalserum weist kein lösliches BAT3 auf und nur geringe Mengen an exosomal gebundenem BAT3. Im Gegensatz dazu wurde im Serum beider B-CLL Patienten hohen Mengen an BAT3 nachgewiesen. Auffällig ist auch, dass BAT3 hauptsächlich als lösliches Protein vorliegt (siehe lösl. Fraktion, Abb. 5.16).



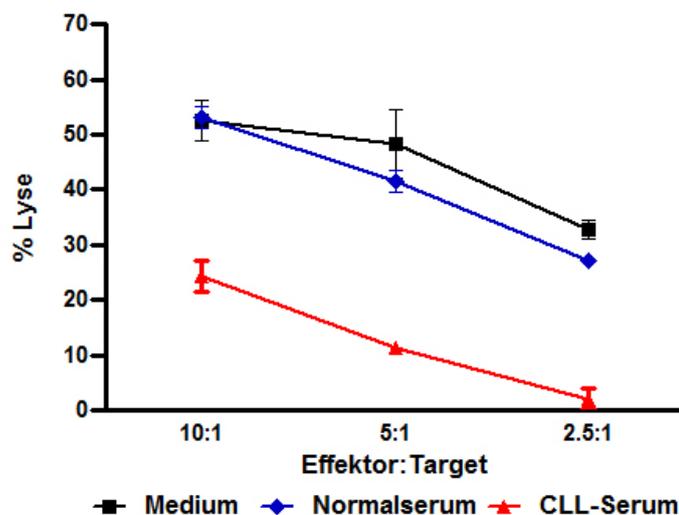
**Abb. 5.16 Bestimmung der BAT3-Menge in fraktionierten Seren.** Die Seren von einem gesunden Probanden (normales Serum), sowie von zwei B-CLL Patienten (CLL Serum 1 und 2) wurden in eine lösliche Fraktion und Exosomen separiert. Diese wurden zusammen mit dem nicht separierten Serum im ELISA gemessen und dabei die Menge an BAT3 bestimmt.

Welche Konsequenzen dies auf die Aktivität von NK Zellen hat, wurde in weiteren Versuchen näher untersucht (siehe 5.4.2).

### 5.4.2 Lösliches BAT3 aus B-CLL Seren wirkt inhibitorisch auf die Zytotoxizität von NK Zellen

Um der Frage nachzugehen, ob das erhöhte Expressionslevel von BAT3 bei einer B-CLL Konsequenzen auf die NK Zell-Funktion hat, wurden NK Zellen aus *buffy coats* von gesunden Spendern mit B-CLL Seren inkubiert. Mithilfe des Zytotoxizitätstest (*Europium release assay*) wurde das zytotoxische Verhalten dieser NK Zellen im Vergleich zu unbehandelten NK Zellen analysiert.

Beim Zytotoxizitätstest werden Effektorzellen (hier NK Zellen) auf ihre Fähigkeit, Targetzellen (hier RAJI) zu lysieren, getestet. Die Targetzellen werden dabei mit Europium intrazellulär gefärbt. Effektor- und Targetzellen werden in unterschiedlichen Verhältnissen eingesetzt. Bei einer Lyse der Targetzellen, die durch die Effektorzellen bedingt wurde, tritt der Farbstoff aus der Zelle aus und kann fluorimetrisch quantifiziert werden. Daraus wird die relative Zytotoxizität ermittelt (siehe Material & Methode).

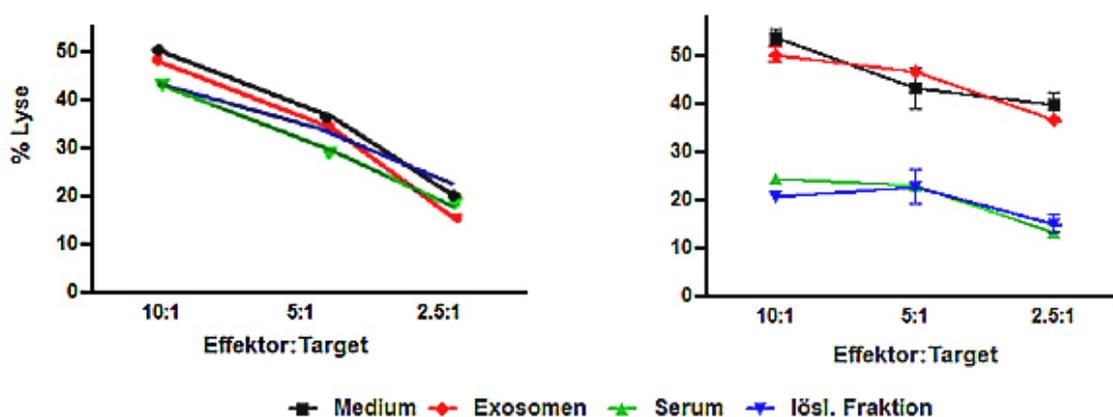


**Abb. 5.17 Zytotoxizitätstest verschieden stimulierter NK Zellen.** NK Zellen aus *buffy coats* wurden mit Normalserum (gesunder Proband) und B-CLL Serum stimuliert. Die Inkubation in Medium ohne Serum diente als Kontrolle.

Abbildung 5.17 zeigt das zytotoxische Verhalten von unbehandelten NK Zellen (Medium) im Vergleich zu NK Zellen nach Prä-Inkubation mit normalem und B-CLL Serum. Die relative Zytotoxizität der unbehandelten NK Zellen und mit Normalserum inkubierten NK Zellen ist vergleichbar. Im Gegensatz dazu ist die Zytotoxizität bei

NK Zellen nach Prä-Inkubation mit B-CLL Serum deutlich herabgesetzt. Das B-CLL Serum und darin enthaltenen Faktoren wirken sich nachweisbar auf die Funktion von NK Zellen aus.

In einem weiteren Ansatz wurden die verschiedenen Fraktionen der Seren im Zytotoxizitätstest analysiert (siehe dazu Abb. 5.16). NK Zellen aus *buffy coats* wurden dafür mit totalem Serum, der Fraktion mit löslichen Proteinen und der Exosomenfraktion prä-inkubiert.



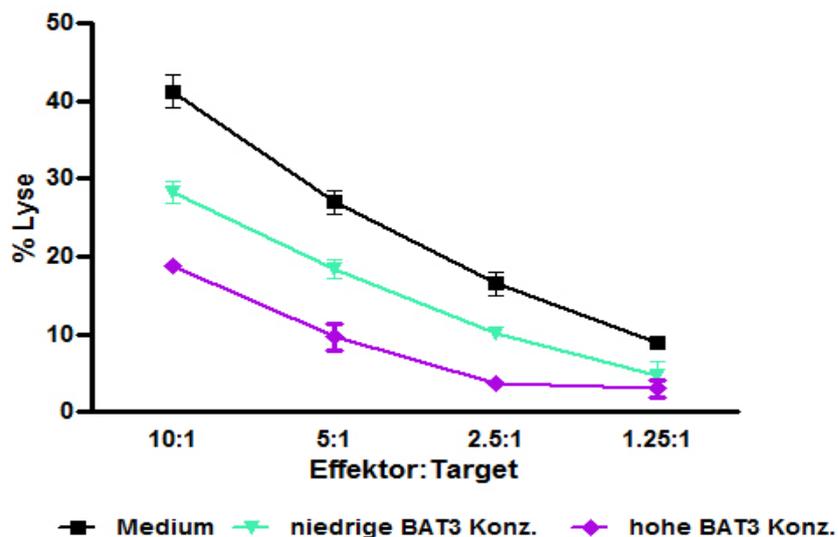
**Abb. 5.18 Zytotoxizitätstest mit unterschiedlichen Fraktionen aus Normalserum und B-CLL Serum.** Dargestellt wurden zwei repräsentative Zytotoxizitätstests von einem gesunden Probanden (links) und einem B-CLL Patienten (rechts). Dabei wurden NK Zellen mit totalem Serum (grün), der Fraktion mit löslichen Proteinen (blau), Exosomen (rot) und Medium (schwarz) inkubiert.

Die Darstellung (Abb. 5.18) zeigt, dass die Zytotoxizität der mit Exosomen stimulierten NK Zellen vergleichbar mit unbehandelten NK Zellen (Medium) ist. In einigen Fällen wurde sogar eine gesteigerte Zytotoxizität ermittelt, wenn NK Zellen mit Exosomen prä-inkubiert wurden. Dies bestätigt die stimulierende Funktion von BAT3-positiven Exosomen auf die NK Zell-Aktivität.

Die Inkubation der löslichen Fraktion aus Normalserum wirkt sich nicht auf das zytotoxische Verhalten der NK Zellen aus. Die Daten sind vergleichbar mit den Werten von unbehandelten NK Zellen. Im Gegensatz dazu wird die Zytotoxizität deutlich inhibiert, wenn NK Zellen mit totalem Serum oder nur mit der löslichen Fraktion von B-CLL Seren prä-inkubiert wurden.

Um einen direkten Bezug der Zytotoxizität von NK Zellen zum Expressionslevel von BAT3 herzustellen, wurden die löslichen Fraktionen zweier B-CLL-Seren miteinander verglichen. Ein Serum wies nur geringe Mengen an BAT3 auf, im anderen konnte ein hohes Expressionslevel von BAT3 nachgewiesen werden. Die Menge an MIF war nahezu vergleichbar (269, 418).

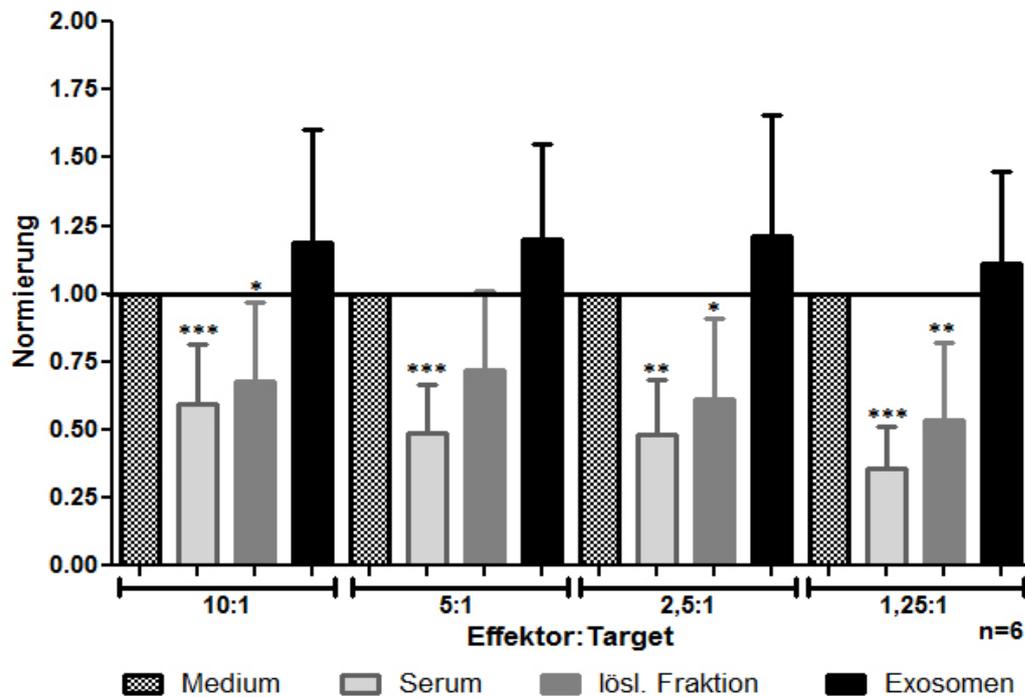
Wie Abbildung 5.19 zeigt, korreliert die Menge an löslichem BAT3 mit der Zytotoxizität von NK Zellen. Nach Prä-Inkubation der NK Zellen mit B-CLL Serum, das hohe Mengen an löslichem BAT3 enthält, zeigt sich eine deutliche Reduktion der Zytotoxizität (lila). Im Kontrast dazu wird die NK Zell-Funktion nach einer Prä-Inkubation mit B-CLL Serum mit wenig löslichen BAT3 (grün) weniger stark inhibiert. Es wurde damit gezeigt, dass die Inhibition der NK Zell-Zytotoxizität mit dem BAT3-Level korreliert.



**Abb. 5.19 Vergleich von B-CLL-Seren mit niedrigem versus hohem BAT3-Expressionslevel.** Dargestellt wurde der inhibierende Effekt von B-CLL Seren mit niedrigen (grün) versus hohen (lila) Mengen an BAT3 im Zytotoxizitätstest. Die Inkubation mit Medium (schwarz) diente als Maß für die Zytotoxizität unbehandelter NK Zellen.

Um die Signifikanz der Ergebnisse statistisch zu überprüfen, wurden die Daten aus sechs Zytotoxizitätstest zusammengefasst (Abb. 5.20). Dabei wurden die Werte der relativen Zytotoxizität von unbehandelten NK Zellen auf den Wert 1 normiert und die Werte für totales Serum, für die lösliche Fraktion und für die Exosomenfraktion mit

dem entsprechenden Faktor angeglichen. Des Weiteren wurde die Signifikanz ( $p < 0.05$ ) im t-Test bestimmt.



**Abb. 5.20 Zusammenfassung von sechs Zytotoxizitätstests nach Normierung.** Das Diagramm zeigt die Auswertung von sechs verschiedenen B-CLL Seren. Dabei wurden die Werte normiert, d.h. die Werte für die Zytotoxizität unbehandelter NK Zellen gleich 1 gesetzt und die Werte für Serum, lösliche Fraktion und Exosomenfraktion angeglichen. Die Signifikanz (\*) wurde im t-Test ( $p < 0.05$ ) berechnet.

Die Zusammenfassung der Daten zeigt, dass die Zytotoxizität von NK Zellen gesunder Spender signifikant inhibiert wird, wenn diese mit totalem Serum bzw. nur der löslichen Fraktion von B-CLL Patienten inkubiert wurden. Im Kontrast dazu werden NK Zellen nach Inkubation mit Exosomen stimuliert.

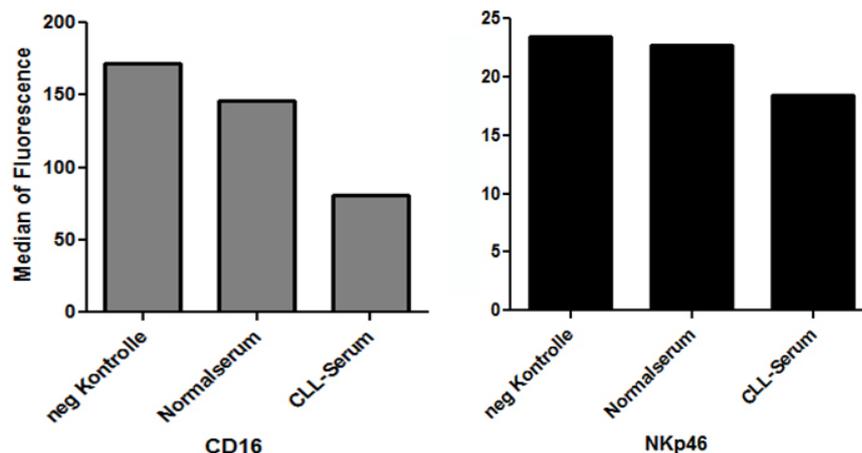
### 5.4.3 Der Aktivierungsrezeptor CD16 wird nach Inkubation mit B-CLL Seren herunter reguliert

Für die Frage, welche Ursache die Inhibition der NK Zell-Funktion haben könnte, wurden die Aktivierungsrezeptoren von NK Zellen näher untersucht. Zu dieser Gruppe gehören u.a. CD16, NKp30, NKp44, NKp46 und NKG2D. Für NKG2D konnte bereits im Zusammenhang mit MIF beim Zervixkarzinom und Ovarialkarzinom eine reduzierte Expression dieses Rezeptors und eine damit verbundene Inhibition der NK Zell-Funktion gezeigt werden [Krockenberger, Dombrowski et al. 2008].

In dieser Arbeit wurden die mit Normalserum und B-CLL Serum inkubierten NK Zellen im Durchflusszytometer, bezüglich der Expression der Aktivierungsrezeptoren, analysiert.

Für die Aktivierungsrezeptoren NKp30 und NKp44 konnten keine Unterschiede im Expressionslevel nach Inkubationen mit Normalserum und B-CLL Seren gemessen werden. Vergleichbar waren auch die Expressionslevel von NKG2D nach Inkubationen mit Normalserum und B-CLL Seren, was im Gegensatz zu den Ergebnissen von Krockenberger und Wischhusen et al. [Krockenberger, Dombrowski et al. 2008] beim Ovarialzervix steht (Daten nicht gezeigt).

Die Messungen zu NKp46 und CD16 zeigten hingegen eine verminderte Expression dieser Oberflächenrezeptoren nach Inkubation der NK Zellen mit B-CLL Seren (Abb. 5.21).



**Abb. 5.21 CD16- und NKp46-Expression von NK Zellen.** NK Zellen wurden mit normalem oder B-CLL Serum inkubiert. Im FACS wurde die CD16- (links) und NKp46- (rechts) Expression auf der Oberfläche analysiert. Die neg. Kontrolle entspricht unbehandelten NK Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel von 3 Messungen.

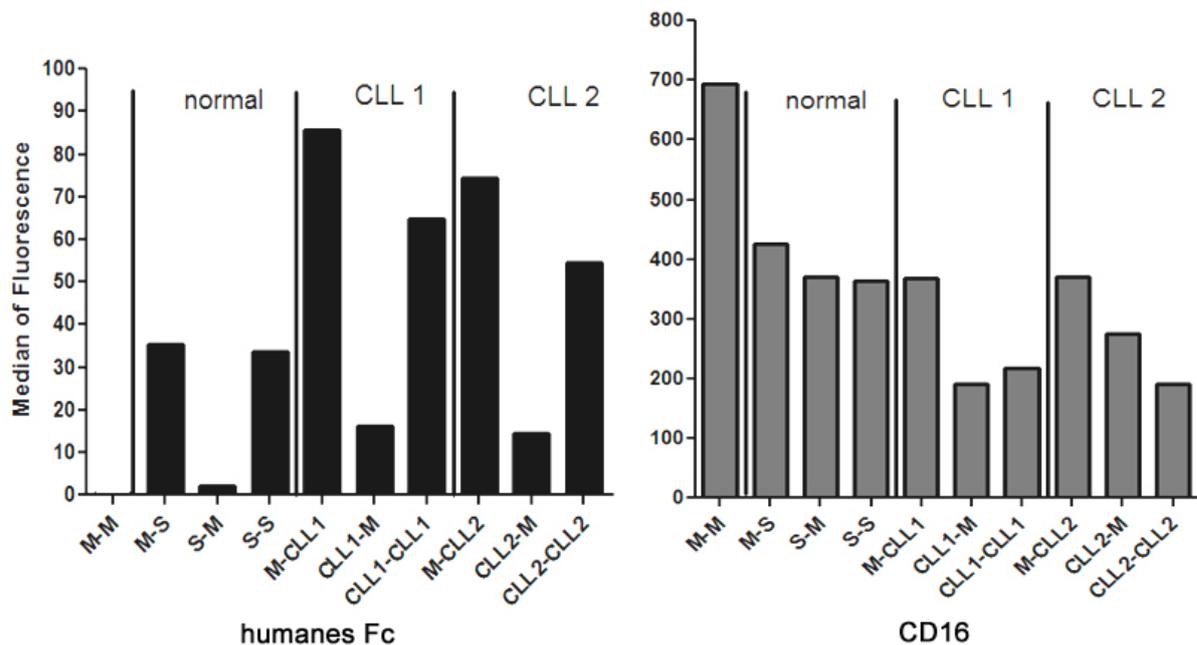
Dieses Phänomen könnte im direkten Zusammenhang mit dem verminderten, zytotoxischen Verhalten der NK Zellen stehen.

Es muss jedoch erst ausgeschlossen werden, dass das gemessene Signal nicht durch eine mögliche Maskierung von CD16 verursacht wird. CD16 bindet die Fc-Region von IgG-Antikörpern. Da in Seren die Konzentration von IgG-Antikörpern sehr variieren kann und bei B-CLL Patienten meist stark erhöht ist, könnte die Oberfläche der NK Zellen mit an CD16 gebundenen IgGs gesättigt sein. Bei einer Färbung der NK Zellen mit einem spezifischen Antikörper gegen CD16 könnte dieser unter diesen Bedingungen nicht mehr an den Rezeptor binden, da die Bindungsstellen von CD16 weitestgehend mit IgGs besetzt wären. CD16 wäre maskiert und es würde ein geringeres Signal detektiert werden.

Um das Phänomen der Maskierung auszuschließen, wurden verschiedenste Ansätze durchgeführt. Dafür wurden NK Zellen für unterschiedliche Inkubationszeiten mit und ohne B-CLL Seren inkubiert. Im FACS wurden CD16 und die Fc-Regionen gebundener IgGs an der Oberfläche der NK Zellen gemessen.

Für die Ansätze wurden unterschiedliche Bedingungen gewählt. Ein Teil der NK Zellen wurde nur mit Medium inkubiert (M-M). In einem weiteren Ansatz wurden NK Zellen über Nacht in Medium kultiviert und schließlich für 30 min mit Serum von gesunden Probanden (M-S) oder mit unterschiedlichen CLL-Seren (M-CLL1 bzw. M-CLL2) stimuliert. Als dritte Variante wurden NK Zellen über Nacht mit normalem Serum bzw. CLL-Seren inkubiert und anschließend für 30 min die Seren durch den Austausch mit Medium weg gewaschen (S-M, CLL1-M, CLL2-M). Der letzte Ansatz entsprach den Ansätzen der bisherigen Versuche, in dem NK Zellen über Nacht mit Seren inkubiert wurden, diese aber bis zur Messung nicht mehr weg gewaschen wurden (S-S, CLL1-CLL1, CLL2-CLL2). Für die folgende FACS-Analyse wurden die behandelten NK Zellen mit anti-CD16 und gegen humanes Fc gefärbt und gemessen.

Abbildung 5.22 zeigt die Daten der FACS-Analyse. Die Bindung von IgG an der Oberfläche von NK Zellen entspricht den Werten für humanes Fc. Dabei zeigt sich kein Signal, wenn NK Zellen nur mit Medium (M-M) inkubiert wurden. Die Inkubation mit normalem Serum über Nacht oder für 30 min zeigt die Bindung von IgG an der Oberfläche der NK Zellen. Im Vergleich dazu wird bei Normalserum deutlich weniger IgG gebunden als bei B-CLL Seren. Durch eine 30 minütige Inkubation mit Medium lassen sich gebundene IgGs wieder entfernen.



**Abb. 5.22 FACS-Analyse gegen CD16 und humanes Fc stimulierter NK Zellen.** NK Zellen wurden mit Medium (M), Serum von gesunden Probanden (S; normal) oder CLL-Seren (CLL1; CLL2) inkubiert. Die Inkubationszeiten waren wie folgt: über Nacht (M-M; S-S; CLL1-CLL1; CLL2-CLL2), über Nacht und 30 min ohne Serum (S-M; CLL1-M; CLL2-M) oder über Nacht nur Medium und 30 min mit Serum (M-S; M-CLL1; M-CLL2). Im FACS wurde die Bindung von humanen Fc (links) und der Expression von CD16 (rechts) analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel von 3 Messungen.

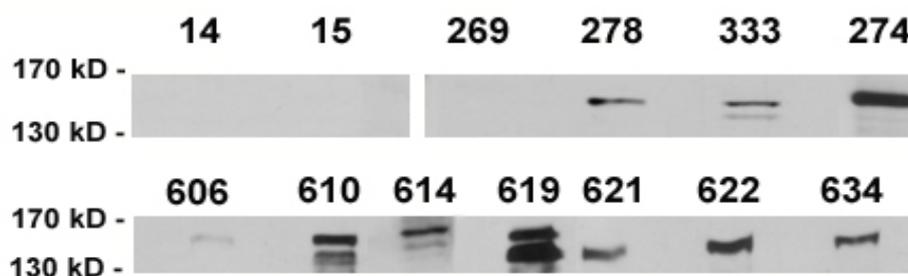
Die Messungen für CD16 zeigen ein starkes Signal, wenn NK Zellen nur mit Medium kultiviert wurden. Dies entspricht dem Expressionszustand von CD16 unbehandelter NK Zellen. Im Vergleich dazu wird nach der Inkubation mit Seren ein geringeres Signal für CD16 gemessen. Besonders auffällig ist ein reduziertes Signal nach der Inkubation mit B-CLL Seren zu sehen.

Um eine mögliche Maskierung von CD16 durch IgGs auszuschließen, müssen die Datensätze S-M, CLL1-M und CLL2-M verglichen werden. Die gebundenen IgGs werden durch die 30 minütige Inkubation mit Medium von der Oberfläche der NK Zellen entfernt. Die FACS Analysen zeigen wieder eine stärkere Reduktion des Expressionslevel von CD16 nach einer Inkubation mit B-CLL Seren (CLL1-M, CLL2-M) im Vergleich zum Normalserum (S-M). Das schwächere Signal wird also nicht durch eine Maskierung von CD16 verursacht, sondern durch Faktoren aus den B-CLL Seren. Dieser Aspekt könnte somit die Antwort auf die inhibierte Zytotoxizität von NK Zellen sein, wenn diese mit B-CLL Seren kultiviert wurden.

#### 5.4.4 In Seren von B-CLL Patienten sind unterschiedliche Splicevarianten von BAT3 nachweisbar

Zur Untersuchung möglicher Unterschiede in der Proteinstruktur von BAT3 bei einer B-CLL wurden die Seren im Western Blot analysiert. Hierfür liefen die Seren unter reduzierenden Bedingungen im SDS-Gel. Zum Vergleich wurden auch Proben gesunder Probanden aufgetragen.

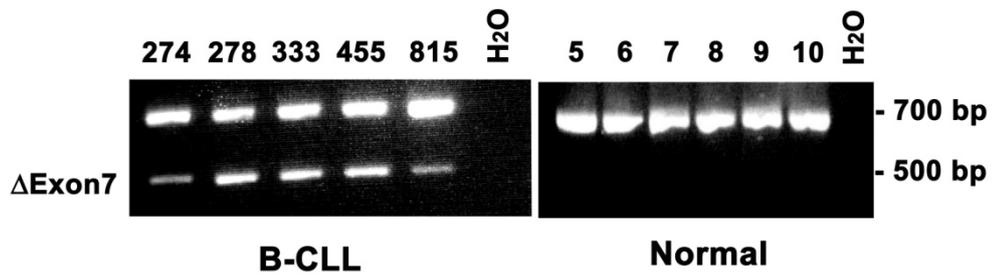
Abbildung 5.23 zeigt wie schon bei ELISA Daten, dass im Serum von gesunden Probanden kein BAT3 nachzuweisen ist (14, 15). Bei B-CLL Seren konnten unterschiedliche Mengen an BAT3 gezeigt werden, die von wenig (269, 606) bis viel BAT3 variieren. In diesen B-CLL Seren (278, 333, 274, 610-634) konnte BAT3 als Einzel- oder Doppelbande detektiert werden. Die Doppelbände könnten auf verschiedenen Splicevarianten von BAT3 beruhen.



**Abb. 5.23 Western Blot von normalen und B-CLL Seren.** Aufgetragen wurden die Seren von zwei gesunden Probanden (14 +15) und 11 repräsentativen B-CLL Patienten (269-634). Detektiert wurde mit antiBAT3 (ch-antiBAT3).

Um der Frage nach möglichen Splicevarianten von BAT3 bei B-CLL Patienten nachzugehen, wurde Material von B-CLL Patienten genetisch analysiert. Hierfür wurden aus den PBMCs von 10 Patienten (z.B. 274, 278, 333, 455, 815) und 10 gesunden Probanden (1-10) cDNA für Sequenzanalysen gewonnen.

Die Unterschiede zwischen gesunden Spendern und B-CLL Patienten zeigten sich im N-terminalen Bereich. Die RT-PCR mit einem Primerpaar, das Exon 4-9 amplifiziert, ergibt bei B-CLL Patienten zwei Produkte, bei gesunden Spendern hingegen nur ein Produkt.



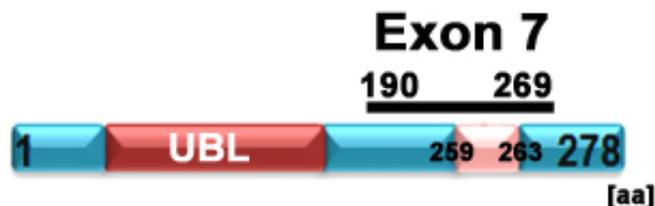
**Abb. 5.24 cDNA von B-CLL Patienten und gesunden Probanden.** Dargestellt sind repräsentative Beispiele von 5 B-CLL Patienten (links) und 6 gesunden Probanden (rechts). Die zwei Amplifikate bei B-CLL Patienten deuten auf Splicevarianten von BAT3 hin.

Die Sequenzierung der längeren und kürzeren Amplifikate der B-CLL Proben und der längeren Amplifikate der gesunden Spender zeigte, dass eine Splicevariante ohne Exon 7 nur bei den B-CLL Proben nachweisbar war (8/10). Im Gegensatz dazu konnte das Exon 7 bei gesunden Probanden in allen Fällen nachgewiesen werden (10/10) (Tabelle 5.1).

B-CLL Patient	Exon 7	gesunder Proband	Exon 7
592	fehlt	1	nachweisbar
606	fehlt	2	nachweisbar
610	nachweisbar	3	nachweisbar
621	fehlt	4	nachweisbar
634	nachweisbar	5	nachweisbar
274	fehlt	6	nachweisbar
278	fehlt	7	nachweisbar
333	fehlt	8	nachweisbar
455	fehlt	9	nachweisbar
815	fehlt	10	nachweisbar

**Tabelle 5.1 Zusammenstellung der Sequenzanalysen über Exon 7 von BAT3.** Die Tabelle zeigt die Analyse von Exon 7 von BAT3 bei 10 B-CLL Patienten und 10 gesunden Probanden. Bei 8 von 10 B-CLL Patienten fehlt Exon 7.

Eine mögliche Konsequenz dieser Deletion ist in der Literatur noch nicht zu finden. Das Exon 7 befindet sich im Bereich von Aminosäure 190 aa bis 269 aa (Abb. 5.25). Innerhalb des Exon 7 ist die HRS-Bindedomäne lokalisiert (259 aa-263 aa), die für den exosomalen Transport von BAT3 wichtig ist.



**Abb. 5.25** Der N-Terminus von BAT3 mit Exon 7. Der N-Terminus enthält u.a. die UBL-Domäne (rot), Exon 7 (190 aa-269 aa) und die HRS-Bindedomäne (rosa) in Exon 7.

### 5.4.5 Depletionsansätze zur Entfernung von BAT3 und MIF aus B-CLL Seren

Um direkt zu zeigen, dass MIF und/oder BAT3 die Ursache für die Inhibition der NK Zell-Funktion sein könnten, wurde zum Nachweis einer möglichen Korrelation in verschiedenen Ansätzen BAT3 und MIF getrennt aus B-CLL Seren depletiert.

Für die Isolation oder Depletion von gelösten Proteinen gibt es verschiedene Methoden. Die Gelfiltration unterteilt gelöste Substanzen nach ihrer Größe bzw. ihrem Molekulargewicht in verschiedene Fraktionen.

Eine weitere Möglichkeit, Proteine aufzutrennen, bieten die sogenannten VIVAspin®-Zentrifugalkonzentratoren. Die gelösten Proteine werden dabei auf die vertikal eingebauten Zwillingmembranen gegeben, die gleichzeitig eine Filtration nach Molekulargewicht und eine Konzentrierung ermöglicht.

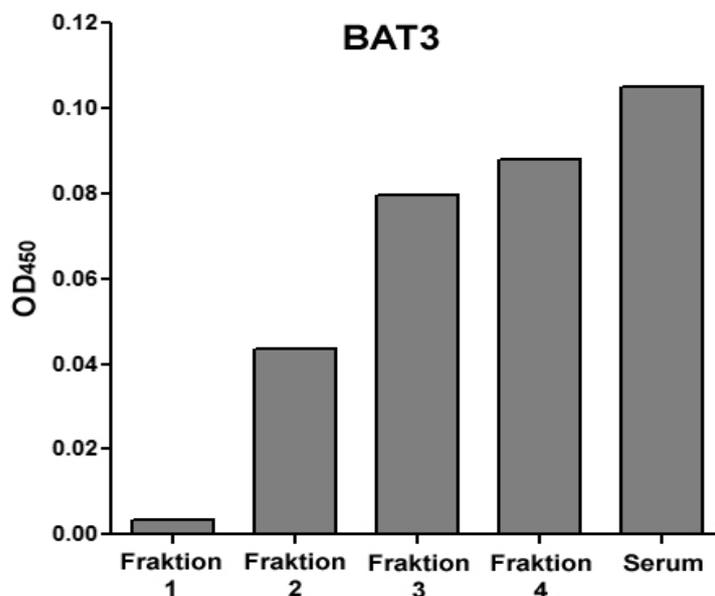
Neben diesen beiden Methoden, die Proteine nach dem Molekulargewicht aufzutrennen, gibt es noch die Möglichkeit der Affinitätschromatographie, bei der das Protein über einen spezifischen Antikörper aufgereinigt bzw. aus dem Serum depletiert werden kann.

Bei der BAT3/MIF-Depletion aus den Seren mittels Gelfiltration wurden die einzeln gesammelten Fraktionen zunächst in spezifischen ELISAs auf ihre BAT3- und MIF-Konzentrationen überprüft. Das Molekulargewicht von MIF ist 12,5 kD und von BAT3 130 kD, so dass eine ideale Auftrennung beider Proteine zu erwarten war. Allerdings wurden durch die Größe der Auftrennungssäulen die Proteine zu stark verdünnt, so dass Fraktionen mit ähnlichem Peak gepoolt und konzentriert werden mussten. Den-

noch konnte keine Auftrennung von BAT3 und MIF im ELISA gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Auch eine Trennung mittels VIVAspin-Zentrifugalkonzentratoren führte nicht zu einer Trennung von BAT3 und MIF, wie es mittels ELISA überprüft wurde (Daten nicht gezeigt).

In einem weiteren Ansatz sollten BAT3 und MIF mittels Affinitätschromatographie mit anti-BAT3 und/oder anti-MIF-Antikörper aus B-CLL Seren depletiert werden. BAT3 und MIF wurden in zwei aufeinander folgenden IPs aus dem Serum präzipitiert, um eine vollständige Depletion zu gewährleisten. Die Mengenbestimmungen in spezifischen ELISAs zeigten aber keine Depletion.

Als letztes wurden Sepharose-Säulchen mit BAT3-Antikörpern gekoppelt. Durch das Beladen der Säulchen mit B-CLL Seren wurde lösliches BAT3 an den Antikörper gebunden. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend im ELISA analysiert. Es konnten unterschiedliche BAT3-Konzentrationen nachgewiesen werden (Abb. 5.26).



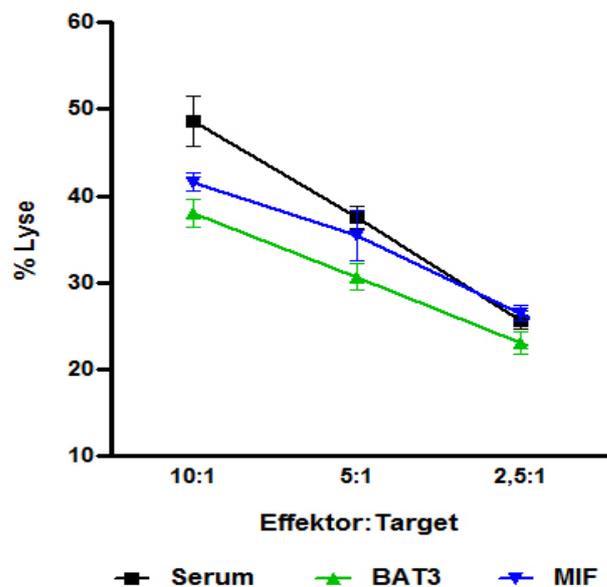
**Abb. 5.26 Depletion von BAT3 aus B-CLL Serum.** Mittels einer mit anti-BAT3 beladenen Sepharose-Säule wurde BAT3 aus B-CLL Serum depletiert. Im Anschluss wurden einzelne Fraktionen und das Serum im BAT3-spezifischen ELISA gemessen.

Für den Zytotoxizitätstest wurden diese Fraktionen mit NK Zellen inkubiert, um im Anschluss einen Unterschied der Zytotoxizität, abhängig von der BAT3-

Konzentration zu untersuchen. Dies konnte jedoch nicht gezeigt werden, da die NK Zellen nach der Inkubation mit den Fraktionen apoptotisch waren. Es liegt nahe, dass sich eine für NK Zellen toxische Substanz bei der Aufreinigung über die Sepharose-Säulchen gelöst hatte.

Somit konnte keine direkte Depletion von MIF und BAT3 aus den B-CLL Seren erreicht werden. Die Gründe dafür könnten die hohen Serumkonzentrationen sein oder mögliche Proteinkomplexbildungen zwischen BAT3 und MIF.

Als alternativer Ansatz wurden die Seren von gesunden Spendern mit rekombinanten löslichen BAT fl (100 ng/ml) bzw. rekombinanten MIF (50 ng/ml) versetzt. NK Zellen wurden mit diesen Seren prä-inkubiert und im Zytotoxizitätstest untersucht (Abb. 5.27).



**Abb. 5.27 Zytotoxizitätstest von NK Zellen nach Inkubation mit BAT3- bzw. MIF-positiven Seren.** Als Negativkontrolle wurden NK Zellen mit dem Serum eines gesunden Probanden inkubiert (schwarz). Für das BAT3-positive Serum wurde das gleiche Serum mit 100 ng rekombinanten BAT3 fl inkubiert (grün), für MIF-positives Serum wurde 50 ng rekombinantes MIF eingesetzt (blau) (1 von 3 Ansätzen).

Abbildung 5.27 zeigt, dass die Zytotoxizität der NK Zellen nach der Inkubation mit MIF abnimmt. Die Inkubation mit BAT3 führt ebenso zu einer Inhibition der Zytotoxizität. Dies bestätigt die Daten von Krockenberger et al. [Krockenberger, Dombrowski et al. 2008], die analoge Inhibitionsexperimente durchgeführt haben. Damit konnte ge-

zeigt werden, dass lösliches BAT3 entscheidend zur Inhibition der NK Zell-Zytotoxizität beiträgt.

In dieser Arbeit konnte eine Korrelation zwischen BAT3 aus B-CLL Seren und der NK Zell-Funktion nachgewiesen werden. BAT3 kommt in 2/3 der Seren von B-CLL Patienten als lösliches Protein in hohen Mengen vor. Im Vergleich dazu ist BAT3 bei gesunden Probanden exosomal gebunden und im Serum nicht nachweisbar. Das lösliche Protein wirkt sich inhibitorisch auf die Funktion von NK Zellen aus, die nach einer Inkubation mit B-CLL Seren in ihrer Zytotoxizität gehemmt sind. Das konnte auch nach einer Inkubation von rekombinanten BAT3 fl in Serum gezeigt werden. Die Inhibition korreliert dabei mit der Menge an löslichen BAT3. So bewirken hohen Mengen BAT3 eine stärkere Inhibition als niedrige Konzentrationen. Die Analyse der cDNA von BAT3 wies eine Deletion von Exon 7 bei B-CLL Patienten auf, welches das HRS-Bindemotiv enthält. Dies könnte zu dem beschriebenen Defekt der exosomalen Expression von BAT3 bei B-CLL Patienten beitragen.

### **5.5 Ergebnisse zur Etablierung einer konditionalen und induzierbaren NK Zell-spezifischen Cre-Maus**

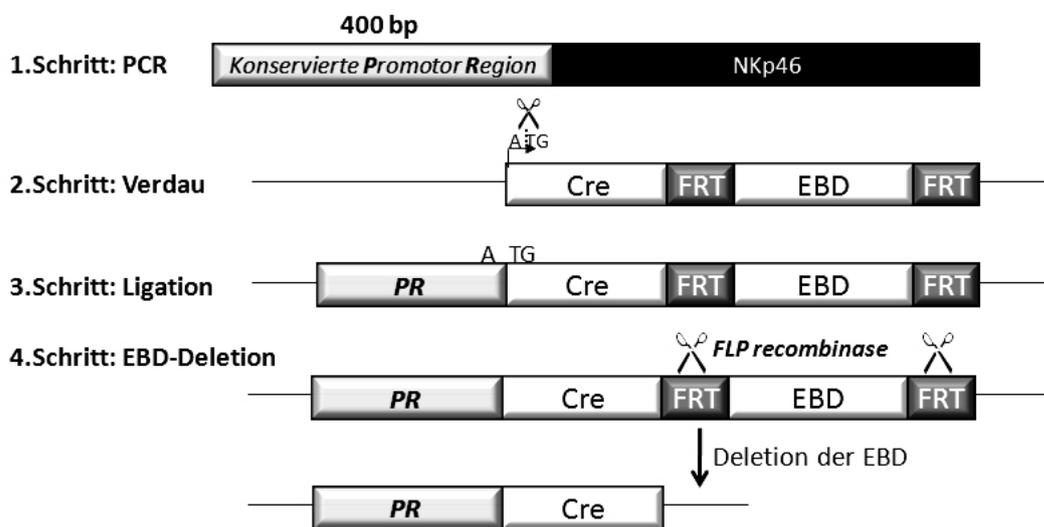
Um die Rolle der NK Zellen bei einer B-CLL zu untersuchen, sollten Konstrukte zur Herstellung einer NK Zell-spezifische Cre-Maus erzeugt werden. Ein zellspezifischer *knockout* eines Zielgens oder die Depletion von NK Zellen wären für solche Untersuchungen ein hilfreiches *Tool*.

Die Cre-Linie wurde so konzipiert, dass die Expression von Cre (cyclische Rekombinase) unter einem NK Zell-spezifischem Promotor steht, dem Promotor von NCR1 (NKp46). Als Promotorregion dient der Bereich 400 bp *upstream* des Exon 1 der humanen NKp46-Sequenz. Die Sequenzen in diesem Bereich sind unter Säugern stark konserviert [Walzer, Blery et al. 2007]. Die Verwendung der humanen NKp46-Sequenz soll eine unspezifische Expression in den murinen Lymphozyten bzw. hämatopoetischen Zellen verhindern. Für die Integration der Promotor- und Cre-Sequenz in das Mausgenom wurde der Vektor pCreER<sup>T2</sup>Amp verwendet. Dieser enthält eine sogenannte *improved Cre* (iCre) Rekombinase-Sequenz, die eine verbesserte Expression von Cre in Säugersystemen aufweist [Shimshek, Kim et al. 2002]. Des Weiteren enthält dieser Vektor eine mit *FRT sides* flankierte Östrogen-

bindedomäne (*Estrogen Binding Domain*, EBD). Mithilfe der EBD kann die Expression von Cre durch die Zugabe des Östrogenanalogen Tamoxifen® induziert werden. Diese Experimente wurden in Kooperation mit Prof. Axel Roers, Dresden, durchgeführt.

### 5.5.1 Die Klonierung des zellspezifischen Cre-Expressionsvektors

Als Template für die Promotorsequenz diente DNA aus NKL-Zellen. Der Promotor wurde bei der Ligation direkt vor das ATG der Cre-Sequenz gesetzt (Abb. 5.28). Die Konstrukte wurden anschließend mittels PCR und Sequenzierung überprüft.



**Abb. 5.28 Klonierungsstrategie.** Es wurde mittels PCR 400 bp des humanen Promotors von NKLp46 amplifiziert und über Ligation vor die Cre-Sequenz in den pCreER<sup>T2</sup>AmpVektor kloniert. Anschließend wurde mit der FLP-Rekombinase die EBD deletiert.

Für eine konstitutive Cre-Expression wurde im Anschluss die Östrogenbindedomäne (EBD) aus dem Vektor deletiert. Dies wurde mithilfe der FLP-Rekombinase erreicht, die *FRT sides* erkennt, dort schneidet und direkt den Vektor religiert. Die klonierten Vektoren wurden im Anschluss als pNKLp46Cre (konstitutive Cre-Expression) und als pNKLp46Cre-EBD (induzierbare Cre-Expression) bezeichnet.

### 5.5.2 Cre wird unter der Kontrolle des NKp46-Promotors in humanen NK Zellen exprimiert

Um die Expression von Cre Zelllinien zu testen, wurden humane NK Zellen separiert und mittels *AMAXA Nucleofection Kits* transfiziert. Als Reporterplasmid wurde das pZ/EG verwendet, das die Expression bzw. enzymatische Aktivität von Cre zeigt. Dieses Plasmid besitzt eine lacZ- und eGFP-Sequenz, deren Transkription durch eine gefloxtete Stop-Kassette unterbunden wird, d.h. der vorangehende CMV-Promotor hat keinen Einfluss auf die Expression von lacZ bzw. GFP (Abb. 5.29). Durch die Zugabe von Cre wird die Stop-Kassette entfernt und die nachfolgenden Sequenzen können transkribiert werden.

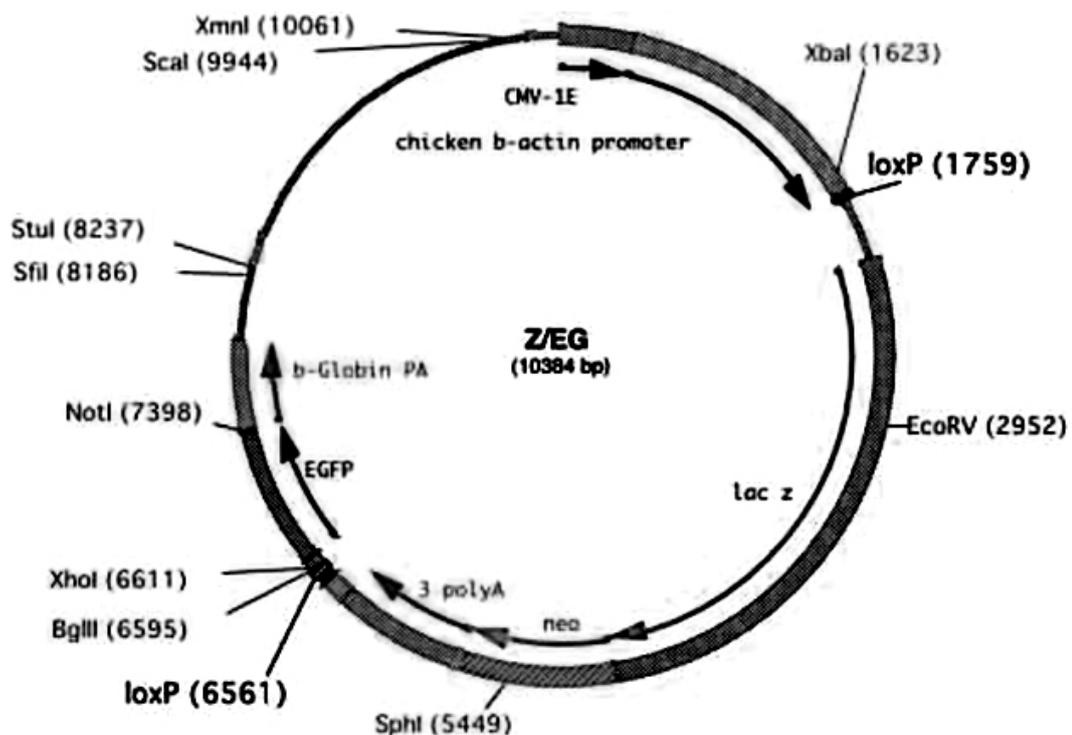
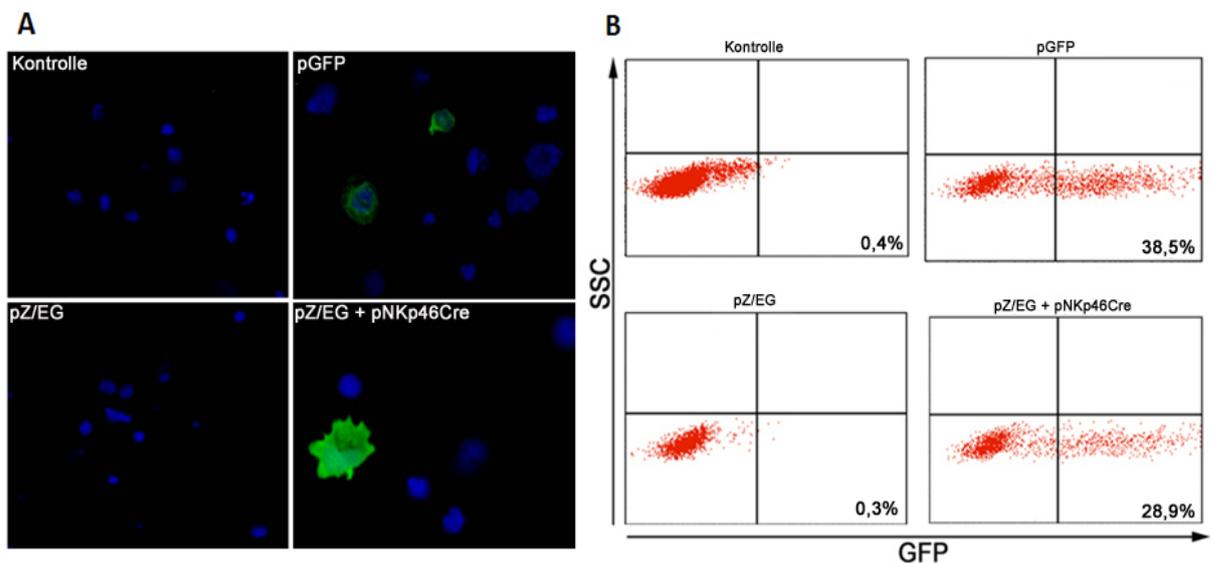


Abb. 5.29 Plasmidkarte von pZ/EG. (In Kooperation mit M.D., Ph.D. Jun-ichi Miyazaki).

Als Negativkontrollen wurden NK Zellen entweder mit dem Leervektor pCreER<sup>T2</sup>Amp oder pZ/EG und für die Positivkontrolle mit einem GFP-Vektor transfiziert. Zur Überprüfung der Cre-Expression wurden NK Zellen mit pZ/EG und pNKp46Cre bzw. pNKp46Cre-EBD co-transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mikroskopisch und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Aufnahmen im Fluoreszenzmikroskop

zeigen eine GFP-Expression nach Transfektion mit dem Kontrollvektor pGFP und nach co-Transfektion mit dem Reporterplasmid pZ/EG und pNKp46Cre (Abb. 5.30 A). Die GFP-Expression dient als direkter Nachweis der Cre-Aktivität, da durch die Deletion der Stop-Kassette in pZ/EG GFP exprimiert werden kann. Die als Negativkontrolle transfizierten Zellen mit Leervektor bzw. pZ/EG alleine, zeigen keine Grünfärbung durch evtl. Autofluoreszenz der Zellen bzw. GFP-Expression durch ungewollten Verlust der geflochtenen Stop-Kassette in pZ/EG.

Die Durchflusszytometrie bestätigt diese Ergebnisse. Hierbei wurden die Zellen im FL1-Kanal (FITC-Kanal) analysiert. Im Vergleich zu den Negativkontrollen Leervektor und pZ/EG zeigt sich ein deutliches Signal im FL1-Kanal bei GFP exprimierenden Zellen (Abb. 5.30 B).



**Abb. 5.30 Mikroskopische Aufnahmen und durchflusszytometrische Analysen transfizierter NK Zellen.** (A): Die transfizierten NK Zellen wurden mittels Zytospin auf Objektträger gesponnen und im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Zellkerne wurden mit Hoechst angefärbt (blau), Grünfluoreszenz entspricht GFP-Expression. (B): Im Durchflusszytometer wurden die Zellen im FL1-Kanal analysiert. Die Messungen erfolgten logarithmisch.

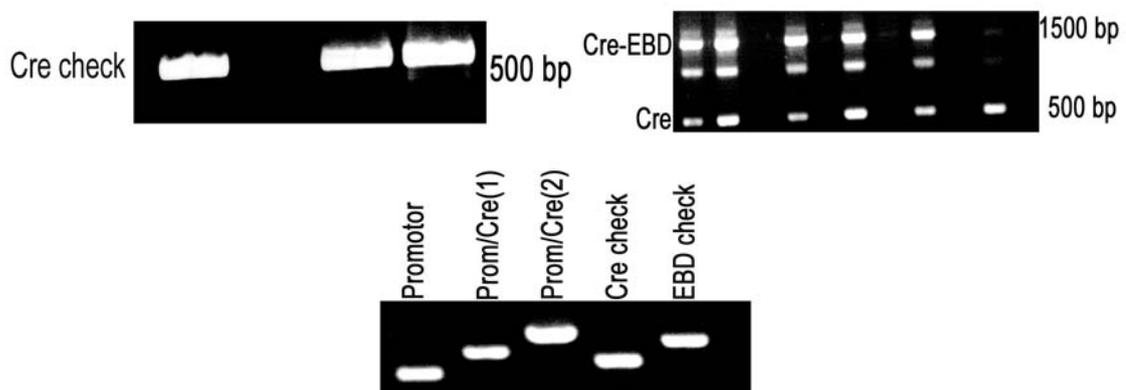
Zusätzlich zu NK Zellen wurden L428 und L540cy, monoklonale B-Zell-Lymphom-Zelllinien, transfiziert, um eine unspezifische Expression der Cre-Rekombinase auszuschließen. Alle Analysen belegten, dass Cre nicht exprimiert wird, was dafür spricht, dass eine spezifische Aktivierung der Cre-Expression ausschließlich in NK Zellen erfolgt (Daten nicht gezeigt). Die Konstrukte sind somit prinzipiell für die Entwicklung einer transgenen NK-Linie geeignet.

### 5.5.3 Die Mikroinjektion der Cre-Vektoren in C57BL/6 Mausoozyten

Für die pronukleäre Mikroinjektion von pNKp46Cre und pNKp46Cre-EBD wurde die DNA mittels endotoxinfreien Präparationskits aufgereinigt und im Anschluss linearisiert. Die geschnittene DNA wurde über ein ethidiumfreies Agarosegel aufgetrennt. Für die pronukleäre Injektion wurden 100-150 µg DNA in fertilisierte C57BL/6 Mausoozyten injiziert und in Ammentiere transplantiert. Diese Arbeiten wurden in Kooperation mit Dipl.-Ing Ronald Naumann (Transgenic Core Facility, MPI of Molecular Cell Biology and Genetics, Dresden) durchgeführt.

### 5.5.4 Screening putativ transgener C57BL/6-Tiere

Bei der Mikroinjektion und Transplantation der Mausoozyten wurden 31 putativ transgene Mäuse erzeugt, deren DNA aus Schwanzbiopsien mittels PCR analysiert wurde. Dabei wurde ausschließlich die Integration von NKp46Cre und NKp46Cre-EBD überprüft, nicht jedoch die Häufigkeit bzw. Anzahl der Kopien und der Ort der Integration. Es konnten drei transgene Tiere für NKp46Cre und 14 transgene Tiere für NKp46Cre-EBD ermittelt werden. Diese Ergebnisse wurden mit unterschiedlichen PCR-Ansätzen bestätigt (Abb. 5.31). Die positiven transgenen Foundertiere wurden als NKp46Cre bzw. NKp46Cre-EBD bezeichnet.

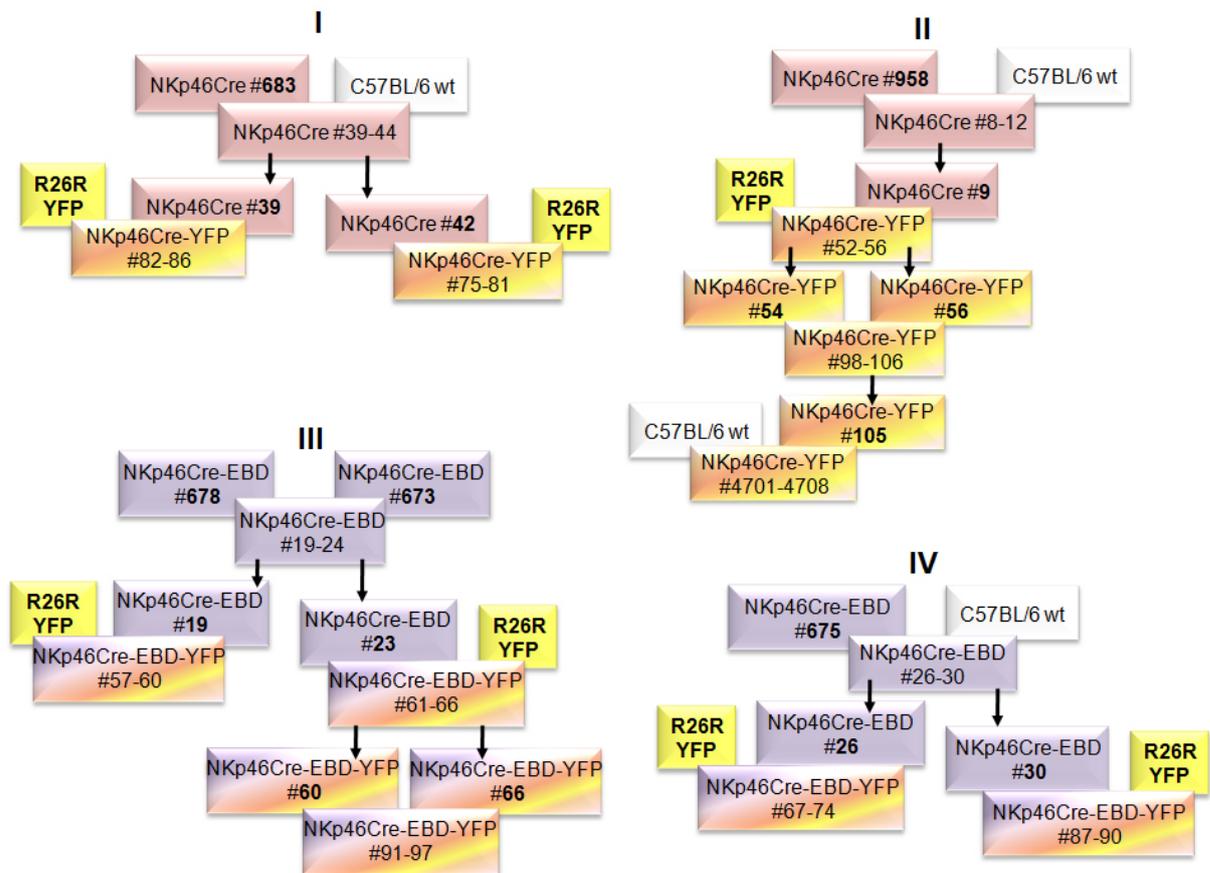


**Abb. 5.31 PCR zur Typisierung der DNA aus Mausbiopsien.** Die PCR wurde mit 6 verschiedenen Primer-Kombinationen durchgeführt. Ein PCR-Produkt von 500 bp lieferte den Nachweis für die Integration von NKp46Cre (siehe Cre check, oben links), ein PCR-Produkt von 1.500 bp bestätigte die Integration von NKp46Cre-EBD (siehe EBD, oben rechts). Zur Überprüfung der Integration der NKp46-Promotorsequenz, sowie der korrekte Übergang in die Cre-Sequenz, wurden weitere Primer-Paare in verschiedenen PCR-Ansätzen gewählt (siehe Promotor, Prom/Cre(1), Prom/Cre (2), unten Mitte).

Als nächstes wurden einige Foundertiere mit C57BL/6-Wildtypmäusen und ein transgenes Pärchen miteinander verpaart. Die nachfolgende F1-Generation wurde ebenfalls genotypisch charakterisiert und transgene Tiere erneut mit C57BL/6-Wildtypmäusen bzw. transgenen Tieren untereinander verpaart, um eine stabile Integration des Transgens im Mausgenom zu erhalten.

### **5.5.5 Selektion der NKp46Cre- und NKp46Cre-EBD-Linien nach funktionaler Cre-Expression**

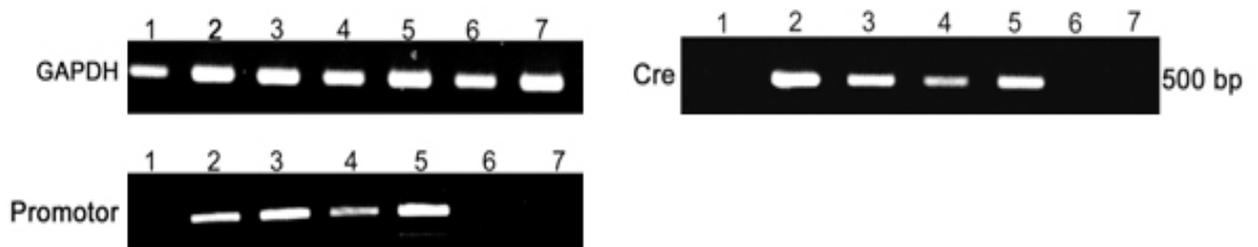
Um eine Cre-Expression nachweisen zu können, wurden die Foundertiere mit der Reporterline ROSA26-EYFP (R26R) [Srinivas, Watanabe et al. 2001] verpaart. Der genetische Hintergrund dieser Tiere beruht auf einer Cre-abhängigen EYFP-Expression. Das heißt zwischen dem SA-Promotor [Horvai, Palinski et al. 1995] und der Sequenz von eYFP befindet sich eine gefloxtete tpA-Stopkassette, die durch Cre eliminiert wird. Da Cre nur in spezifischen Geweben- bzw. Zelltypen exprimiert wird und enzymatisch aktiv ist, sollte nur in diesem Zelltyp die Expression von YFP stattfinden und nachweisbar sein. Insgesamt wurden vier unterschiedliche Linien bzw. acht teilverwandte Linien getestet (Abb. 5.32).



**Abb. 5.32 Züchtungsschema vier verschiedener Linien.** Die Darstellung zeigt die Verpaarungen vier verschiedener Linien. Founder-Tiere der NKp46Cre-Linie (rosa) bzw. NKp46Cre-EBD-Linie (lila) wurden mit C57BL/6 Wildtyp (weiß) oder gleichen Linien verpaart. Die F1-Generationen wurden dann mit der Reporterlinie R26R-YFP [Poggeler, Nowrousian et al.] verpaart. Die Nachwuchstiere waren hier genotypisch positiv für YFP und NKp46Cre (rosa-gelb, siehe I & II) bzw. für YFP und NKp46Cre-EBD (lila-gelb, siehe III & IV). Für weitere Verpaarungen wurden transgene Tiere untereinander verpaart.

### 5.5.6 Überprüfung der Cre-Expression mittels RNA-Analyse

Eine mögliche Cre-Expression wurde mittels RT-PCR überprüft. Hierfür wurde die RNA sowohl aus Vollblut, als auch von separierten NK Zellen extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Um eine mögliche Kontamination der cDNA-Proben mit genomischer DNA auszuschließen, wurde zusätzlich als Kontrolle eine PCR über die NKp46-Promotorregion durchgeführt, die im Falle einer Kontamination mit genomischer DNA ein PCR-Produkt zeigen würde. Als weiterer Kontrollansatz für die cDNA diente eine PCR über das *housekeeping* Gen (GAPDH) (Abb. 5.33).



**Abb. 5.33 PCR-Analyse von muriner cDNA.** Die cDNA verschiedener transgener Linien (1-6) und einer R26R-YFP-Reporter-Linie (7) wurden auf Cre-mRNA untersucht. Die GAPDH-Kontrolle dient dem Nachweis für vergleichbare cDNA-Mengen (oben, links). Bei 4 von 6 transgenen Tieren (2-5) wird eine Cre-Expression nachgewiesen (oben rechts). Die Kontroll-PCR zeigte eine genomische Kontamination der Proben 2-5 (unten links).

Die PCR zum Nachweis einer Expression von Cre zeigt nur bei 4 von 6 transgenen Tieren (2-5) ein positives Amplifikat (Abb. 5.31, oben rechts). Im Vergleich mit einer Kontroll-PCR, die im Falle einer Kontamination mit genomischer DNA ein Produkt von der Promotorsequenz liefert, gibt es für die gleichen Proben (Abb. 5.31, Proben 2-5) jeweils PCR-Produkte für Cre und die Promotorsequenz. Keine PCR-Produkte gibt es bei den Proben 1 und 6 (Abb. 5.31, oben rechts). Demzufolge muss es sich bei den Proben 2-5 um eine Kontamination mit genomischer DNA handeln. Die Behandlung mit DNasen in Wiederholungsansätzen bestätigte, dass Cre in keiner der Proben nachweisbar war.

In der Arbeit von Walzer et al. [Walzer, Blery et al. 2007] wurde für eine Expression eines Diphtherietoxin-Rezeptor-IRES-GFP-Konstrukts ebenfalls der Minimalpromotor von NKp46 verwendet. Dabei zeigte eine von sechs getesteten Linien eine GFP-Expression. Aufgrund dieser niedrigen Quoten sollten weitere NKp46Cre- und NKp46Cre-EBD-Linien gezüchtet und getestet werden.

## 6 Diskussion

### 6.1 BAT3: Ein *leaderless danger* Molekül, das über Exosomen transportiert wird

Das HLA-B assoziierte Transkript 3 (BAT3) ist ein multi-funktionelles Protein, das an vielen regulatorischen Prozessen innerhalb und außerhalb der Zelle beteiligt ist. Obwohl BAT3 im Nukleus lokalisiert ist, wird es nach Stress-Induktion aus den Zellen transportiert und ist im extrazellulären Milieu der Ligand des NK Zell-Rezeptors NKp30 [Pogge von Strandmann, Simhadri et al. 2007]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass BAT3 via Exosomen von gestressten Zellen abgegeben wird. Zum einen ist BAT3 auf der Oberfläche von Exosomen nachweisbar [Simhadri, Reiners et al. 2008]. Weiterhin ist ein Enzym, das für die Bildung von Exosomen essentiell ist [Trajkovic, Hsu et al. 2008], ebenfalls für die Sekretion von BAT3 notwendig. Die hier gezeigten Daten belegen eine Beteiligung der nSMase2 am exosomalen Transport von BAT3, da durch die Überexpression des Enzyms vermehrt BAT3-positive Exosomen sekretiert wurden. Eine Inhibition der nSMase2-Aktivität sowohl mit dem spezifischen Inhibitor GW4869, als auch nach Transfektion mit spezifischen siRNAs resultierte dagegen in einer reduzierten Abgabe von BAT3-positiven Exosomen.

Als weiteren Hinweis für den Transport von BAT3 via Exosomen konnte eine Assoziation zwischen BAT3 und HRS aus dem ESCRT-0-Komplex gezeigt werden. Dabei ist der N-Terminus von BAT3 essentiell für den Transport. Nach der Deletion der UBL-Domäne konnte diese Mutante (BAT3 $\Delta$ UBL) nicht mehr auf der Oberfläche von Exosomen nachgewiesen werden. Für eine genauere Untersuchung des N-Terminus und seine Beteiligung am Transport, wurde BAT3 N-terminal trunziert und mit GFP fusioniert. Das UBL-Fragment (BAT3\_1-324-GFP) allein reichte bereits für den exosomalen Transport aus. Der Transport konnte jedoch in Kombination von UBL mit der HRS-Bindedomäne (BAT3\_1-834-GFP) verstärkt werden. Auch intrazellulär konnte eine Assoziation von BAT3 mit HRS gezeigt werden. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen belegten eine co-Lokalisation von HRS mit der Mutante BAT3 $\Delta$ UBL $\Delta$ NLS. Andere deletierte Proteindomänen von BAT3 scheinen keine so drastische Bedeutung für den Transport von BAT3 via Exosomen zu haben. Eine reproduzierbare Reduktion von BAT3 auf der Oberfläche von BAT3 zeigte sich bei Mutanten ohne BAG-Domäne und ohne NLS. Die verringerte BAT3-Expression auf

den Exosomen könnte mit der Deletion der BAG-Domäne zusammenhängen. Hsp70 interagiert intrazellulär und membrangebunden mit BAG [Gastpar, Gehrmann et al. 2005]. Beide Proteine sind sogenannte *danger molecules*, die durch Stress induziert werden und infolgedessen über Exosomen sekretiert werden [Corduan, Lecomte et al. 2009; Zhan, Leng et al. 2009; Simhadri 2008]. Es besteht also die Möglichkeit, dass BAT3 nicht nur als einzelnes Molekül, sondern auch im Tandem mit Hsp70 auf Exosomen lokalisiert und somit die Menge an BAT3-Molekülen erhöht. Mit der Deletion der BAG-Domäne könnte aber eine Assoziation mit Hsp70 nicht mehr stattfinden und somit würde die Menge an BAT3 auf der exosomalen Oberfläche abnehmen. Hsp70 und BAT3 weisen keine Transmembrandomänen oder GPI-Anker zur Bindung an Membranen auf. Für Hsp70 konnte aber gezeigt, dass es mit dem Glycophospholipid Gb3 an Membranen assoziiert [Gehrmann, Liebisch et al. 2008]. Eine ähnliche Assoziation von BAT3 an der exosomalen Oberfläche wurde bisher nicht gezeigt. Durch die Bindung an Hsp70 könnte aber somit eine Lokalisation von BAT3 auf der exosomalen Oberfläche gewährleistet sein. Die Deletion der BAG-Domäne würde diese Bindung aber verhindern und BAT3 könnte nicht an der exosomalen Oberfläche assoziieren.

NK Zellen sind anders als T-Zellen direkt zytotoxisch und brauchen keine antigenvermittelte Stimulierung. So erscheint ein zwei-stufiger Prozess der NK Zell-Aktivierung, der in neueren Arbeiten postuliert wird, Sinn zu machen. Gestresste Zellen werden offensichtlich nicht nur durch ihre veränderte Expression an Liganden auf der Zelloberfläche für die angeborene Immunantwort sichtbar. Zusätzlich sekretieren die Zellen Signale zur Immunzell-Aktivierung, zu denen BAT3 nach Ergebnissen dieser Arbeit gezählt werden kann. Diese Signale, die als Stresssignal von Zellen ins extrazelluläre Milieu abgegeben werden, sind sogenannte *danger* Moleküle oder *alarmins* [Klune, Dhupar et al. 2008], die zur Zell-Zell-Kommunikation und Regulation der Immunantwort beitragen. Zu diesen Proteinen zählen HMGB1, MIF, S100 und Hsp70. HMGB1 ist konstitutiv im Zellkern und wird als *leaderless* Zytokin-ähnlicher Faktor von nekrotischen Zellen aktiv über Vesikel sekretiert. Im Zellkern ist HMGB1 via Interaktion mit DNA-bindenden Proteinen an der Regulation der Transkription beteiligt. HMGB1 wird in vielen Tumorzellen überexprimiert und rekrutiert im extrazellulären Milieu Leukozyten [Lotze and Tracey 2005]. Ähnlich wie HMGB1 wird auch MIF als Zytokin beschrieben. Es ist ebenfalls konstitutiv in Zellen und wird in vielen Tumorzellen überexprimiert. Auf die Aktivität von p53 wirkt MIF inhibierend [Lolis 2001]. MIF ist ein *leaderless* Molekül, weshalb der Transport ins extrazelluläre Milieu über Mikrovesikel stattfindet. Dort trägt es zum *Immune Escape*-Mechanismus bei [Krockenberger, Dombrowski et al. 2008]. Auch Hsp70 wurde als extrazellulärer Faktor identifiziert, der an der Regulation von Immunzellen beteiligt ist und somit zur

Gruppe der immun-modulatorischen, stressinduzierten Moleküle gehört. Intrazellulär übernimmt Hsp70 die Aufgabe als Chaperonen und interagiert mit p53. Bei Zellstress wird das *leaderless* Protein Hsp70 hoch reguliert und über Exosomen sekretiert [Lancaster und Febbraio 2005]. Extrazellulär induziert Hsp70 die Immunantwort [Calderwood, Theriault et al. 2005]. Dabei wirkt besonders membranständiges Hsp70 aktivierend auf die NK Zell-Funktion [Gehrmann, Marienhagen et al. 2005]. Hsp70 interagiert intrazellulär und membrangebunden mit Proteinen, die eine BAG-Domäne besitzen [Gastpar, Gehrmann et al. 2005]. Es konnte auch eine Interaktion mit BAT3 gezeigt werden, das als co-Chaperon die Funktion von Hsp70 reguliert [Sasaki, Marcon et al. 2008; Corduan, Lecomte et al. 2009].

Gemeinsam ist dieser neuen Gruppe von Proteinen, dass sie neben der extrazellulären Funktion in der Zelle an wichtigen Prozessen wie Apoptose (BAT3, p53, MIF) oder der Genexpression (HMGB1) beteiligt sind. So ist vorstellbar, dass diese Faktoren als frühe Sensoren für virus-infizierte oder transformierte Zellen fungieren, die in ersten Stadien der Pathogenese das angeborene Immunsystem aktivieren.

Die intrazelluläre Funktion von BAT3 könnte somit einen "*link*" von stress-induzierten DNA-Schädigungen und der Aktivierung von NK Zellen sein. Intrazellulär ist BAT3 an der Aktivierung von p53 beteiligt [Sasaki, Gan et al. 2007]. p53 wiederum reguliert eine stress-induzierte Sekretion von Exosomen. Eine durch DNA-Schäden induzierte Aktivierung von p53 führt zur Transkription von TSAP6, das am Transport von Proteinen zu Exosomen oder an der Regulation der Exosomenbildung beteiligt ist. Die verstärkte Transkription von TSAP6 als Antwort auf Zellstress führt zu einer vermehrten Exosomenfreisetzung [Yu, Harris et al. 2006; Lespagnol, Duflaut et al. 2008]. Die Sekretion von BAT3 wird somit über die Aktivierung von TSAP6 vermittelt.

Die Sekretion von BAT3 und auch von Hsp70 findet über einen nicht-klassischen Transportweg statt, nämlich über extrazelluläre Membranvesikel, sogenannte Exosomen statt. Dieser Mechanismus gewährleistet, dass BAT3 als NKp30-Ligand als membranständiges Molekül mit NKp30 interagieren kann. Es ist aus vielen Arbeiten bekannt [Lanier 2008; Terme, Ullrich et al. 2008], dass nur membranständige oder immobilisierte Liganden die Aktivierung und Rezeptor-vermittelte Signalkaskaden in NK Zellen auslösen können. Lösliche Liganden führen hingegen eher zur Inhibition von Rezeptoren auf NK Zellen.

Exosomen werden hauptsächlich von Immunzellen, wie z.B. T-Zellen und dendritischen Zellen abgegeben, aber auch von vielen Tumorzellen. Von Immunzellen sekretierte Exosomen wirken aktivierend auf die Funktion anderer Immunzellen und dienen der Zell-Zell-Kommunikation. So können z.B. die Exosomen von dendritischen Zellen die NK Zell-Funktion aktivieren [Simhadri, Reiners et al. 2008]. Ebenso

können Hsp70-positive Exosomen, die auch von einigen Tumorzellen sekretiert werden, Immunzellen wie NK Zellen oder T-Zellen aktivieren. Im Gegensatz dazu wirken einige von Tumorzellen sekretierte Exosomen inhibierend auf Immunzellen und tragen damit zum *Immune Escape* der Tumoren bei [They, Ostrowski et al. 2009].

### **6.2 Der Einfluss von BAT3 auf die NK Zell-Funktion: Eine Rolle für die Pathogenese bei der B-CLL?**

Das humane Immunsystem bildet nicht nur eine Abwehr gegen körperfremde Faktoren, wie Bakterien, Parasiten oder Viren. Es ist auch in der Lage, körpereigene aber entartete Zellen, wie autoreaktive Zellen oder Tumorzellen, zu erkennen und zu eliminieren. Besonders wichtig ist das Zusammenspiel der Immunzellen, die durch die Abgabe von *danger* Molekülen, Exosomen oder durch Zell-Zell-Kontakt andere Immunzellen aktivieren, rekrutieren oder zur Proliferation anregen können. BAT3 wird als *danger* Molekül von vielen Tumorzellen und Immunzellen exosomal sekretiert. Es gibt bereits genetische Evidenzen, dass BAT3 ein Tumorsuppressorgen beim Lungen- und beim Kolon-Karzinom ist [Ivanov, Lo et al. 2007; Haigis, Kendall et al. 2008]. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine Fehlfunktion von BAT3 bei einem hämatopoetischen Tumor, der B-CLL, vorliegt. Tatsächlich war die Serumkonzentration von BAT3 bei Patienten mit B-CLL stark erhöht. Anders als bei gesunden Spendern lag BAT3 jedoch als lösliches Protein vor und war in Assoziation mit Exosomen nicht nachweisbar. Bei 8/10 analysierten B-CLL Proben war eine BAT3-Splicevariante, der das Exon 7 fehlt, nachweisbar. Diese Splicevariante kam bei gesunden Spendern (10/10) nicht vor. Innerhalb des Exon 7 ist die HRS-Bindedomäne codiert, die essentiell für den exosomalen Transport von BAT3 ist [Schlundt, Sticht et al. 2009]. Die Arbeiten über den Transport von BAT3 zeigten, dass der N-Terminus und insbesondere die HRS-Bindedomäne entscheidend am exosomalen Transport von BAT3 beteiligt sind. Hier könnte also der Grund für lösliches BAT3 bei einer B-CLL liegen. Es ist möglich, dass das *leaderless danger* Molekül BAT3 ohne die HRS-Bindedomäne nicht mehr über Exosomen aus der Zelle transportiert werden kann und deshalb als lösliches Protein abgegeben wird.

Wie erwartet führten Prä-Inkubationen von NK Zellen gesunder Probanden mit B-CLL Seren zu einer verminderten Zytotoxizität der NK Zellen. Im Gegensatz hierzu hatte eine Prä-Inkubation mit Seren gesunder Spender keinen Einfluss auf die NK Zell-Aktivität. Ähnlich wie für BAT3 zeigte auch MIF ein erhöhtes Expressionslevel in Seren von B-CLL Patienten. Häufig, jedoch nicht in allen Fällen, korrelierte

die erhöhte MIF-Konzentration mit der erhöhten BAT3-Konzentration. Die Inhibition der NK Zell-Funktion war abhängig von der BAT3-Konzentration des eingesetzten Serums. Das heißt die Zytotoxizität der NK Zellen nimmt mit zunehmendem BAT3-Serumspiegel ab. Die Inkubation von NK Zellen mit Normalserum, das mit rekombinanten BAT3 versetzt wurde, resultierte ebenfalls in eine verringerte NK Zell-Zytotoxizität. Für exosomal gebundenes BAT3 konnte kein inhibitorischer Effekt gezeigt werden. So ist denkbar, dass die erhöhten löslichen BAT3-Serumspiegel zur systemischen Inhibition von NK Zellen bei B-CLL Patienten beitragen.

Als Ursache für die Inhibition der Zytotoxizität konnte ein verringertes Expressionslevel der NK Zellrezeptoren NKp46 und CD16 gezeigt werden, welches nach Kontakt mit B-CLL Seren auf NK Zellen nachweisbar war. Für MIF wurde bereits im Zusammenhang mit Ovarialkrebs gezeigt, dass es eine Einschränkung der NK Zell-Zytotoxizität hervorruft, die auf eine verringerte Expression von NKG2D zurückgeführt werden kann [Krockenberger, Dombrowski et al. 2008]. Auch für das Zervixkarzinom wurde von der gleichen Gruppe eine MIF-vermittelte Abnahme der NKG2D Expression beschrieben [Krockenberger, Dombrowski et al. 2008; Krockenberger, Engel et al. 2010].

In dieser Arbeit blieb die Expression von NKG2D jedoch nahezu unverändert. In Übereinstimmung mit Daten zum Ovarialkrebs [Krockenberger, Dombrowski et al. 2008] vermittelte rekombinantes MIF eine leichte, aber reproduzierbare Inhibition von normalen NK Zellen (Abb. 5.27). Der Tumormarker und Entzündungsmediator MIF wird als ein *leaderless* Faktor sekretiert [Thiele und Bernhagen 2005] und spielt besonders bei Erkrankungen wie z.B. in Melanomen, Prostatakrebs, Brustkrebs, Lymphomen und der B-CLL eine Rolle. Für die B-CLL ist bekannt, dass der MIF-Rezeptor CD74 auf den malignen Zellen überexprimiert ist. Die Bindung von MIF an CD74 gilt als Überlebenssignal für die B-CLL Zellen [Binsky, Haran et al. 2007]. Untersuchungen zur Rolle von MIF für die NK Zell-Aktivität bei der B-CLL gibt es bislang nicht.

Grundsätzlich kann die Sekretion verschiedener Faktoren von Tumorzellen (B-CLL und anderen Tumorerkrankungen) die Immunantwort beeinflussen. Häufig kann es dabei zum *Immune Escape* kommen, so dass die Tumorzellen vor der Immunantwort geschützt sind. In manchen Tumorzellen werden Adhäsionsmoleküle alternativ gespleißt, die als lösliche Faktoren sekretiert werden [van Kilsdonk, van Kempen et al. 2010]. Für BAT3 konnte hier eine tumorspezifische B-CLL Splicevariante identifiziert werden, der das Exon 7 fehlte. Obwohl daneben auch eine Wildtyp-Variante mit Exon 7 nachweisbar war, könnte diese Variante ohne HRS-Bindedomäne dominant

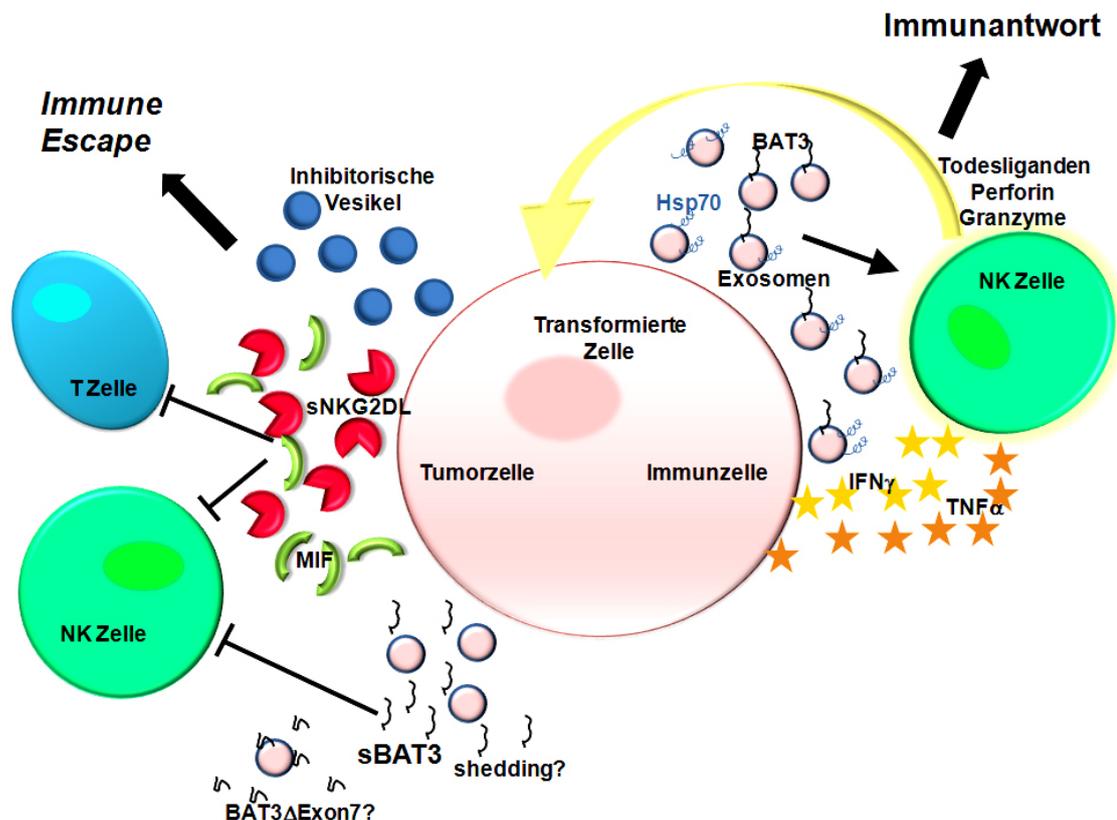
negativ für die exosomale BAT3-Expression sein, da bekannt ist, dass BAT3 Homodimere bildet [Pogge von Strandmann, Simhadri et al. 2007].

Einige Tumorzellen sekretieren Mikrovesikel und Exosomen, welche die Immunzell-Funktionen inhibieren. Für diese Vesikel konnte z.B. *in vitro* gezeigt werden, dass sie bei T-Zellen eine über CD95L-vermittelte Apoptose auslösen [Thery, Ostrowski et al. 2009]. Zusätzlich zu inhibitorischen Vesikeln können auch lösliche Liganden die Immunzellen in ihrer Funktion inhibieren. Schon bekannte Beispiele für lösliche Faktoren, die bei der *Tumor surveillance* eine Rolle spielen, sind MIF und lösliche NKG2D-Liganden (sNKG2DL). Die Expression von NKG2DL wird durch DNA-Schäden induziert. Bei malignen Tumoren werden sie konstitutiv überexprimiert [Waldhauer und Steinle 2008]. Über NKG2D und seinen Liganden konnte gezeigt werden, dass sie – gebunden an Membranen (z.B. Exosomen)- NK Zellen über NKG2D aktivieren. Lösliche NKG2D-Liganden regulieren jedoch NKG2D herunter und bedingen dadurch eine Inhibition der NK Zell-Funktion, was schließlich zum *Immune Escape* führt [Ashiru, Boutet et al. 2010; Fernandez-Messina, Ashiru et al. 2010]. Kürzlich wurde berichtet, dass auch in B-CLL Seren lösliche NKG2D-Liganden (sNKG2DL) vorkommen, die NK und T-Zellen möglicherweise in ihrer Funktion inhibieren [Nuckel, Switala et al. 2010]. Die Autoren stellen vor allem die Rolle von ULBP2 als wichtigen erhöhten Faktor heraus. Die Expression von ULBP2 wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, andere NKG2D-Liganden wie MICA und B waren in den hier analysierten Proben nicht nachweisbar. Da auch keine signifikante Abschaltung des NKG2D-Rezeptors beobachtet wurde, scheint das NKG2D/NKG2DL System bei der B-CLL nicht von herausragender Bedeutung zu sein. Funktionelle Daten wurden in der Arbeit von Nüchel et al. (2010) nicht erhoben.

Im Gegensatz zu BAT3 sind die NKG2DLs über GPI-Anker in Membranen verankert. Durch die Aktivität von ADAM 10 und ADAM 17 (*a disintegrin and metalloproteinase*) werden sie von Membranoberflächen *gesheddet* und liegen als lösliche Proteine vor (sNKG2D), welche die NK Zell-Funktion inhibieren [Ashiru, Boutet et al. 2010; Fernandez-Messina, Ashiru et al. 2010]. Ob auch BAT3 von der exosomalen Oberfläche *gesheddet* und dadurch als lösliches Protein vorliegt, ist nicht bekannt, da es noch keine Daten über die Bindung von BAT3 an Exosomen gibt. Es gibt zumindest keine Hinweise auf eine Verankerung über GPI.

Es gibt also inhibitorische Faktoren, die zum *Immune Escape* führen können, und extrazelluläre *danger* Moleküle, welche die Immunantwort aktivieren. Das Schema in Abbildung 6.1 zeigt ein Zusammenspiel von inhibitorischen und aktivierenden Faktoren. So führen inhibitorische Vesikel, sNKG2DL, MIF und sBAT3, die von Tumorzellen sekretiert werden, zum *Immune Escape*. Dagegen können Zytokine wie

IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  oder Mikrovesikel wie BAT3- und Hsp70-positive Exosomen von Tumorzellen oder Immunzellen aktivierend auf NK Zellen wirken, was zur Eliminierung der transformierten Zellen und Tumorzellen führt.



**Abb. 6.1 Modell von *Immun surveillance* und *Immune Escape*.** Dargestellt ist das Zusammenspiel von inhibitorischen und aktivierenden Faktoren, welche die Immunantwort bei Tumorerkrankungen regulieren. Bezeichnungen: sBAT3: lösliches BAT3; BAT3 $\Delta$ Exon7: BAT3-Splicevariante ohne Exon 7; *Immune Escape*: Tumor ist vor Immunantwort geschützt; sNKG2DL: lösliche NKG2D-Liganden; leuchtende NK Zelle: aktivierte NK Zelle.

Zur Behandlung vieler Tumorerkrankungen könnte sich grundsätzlich die Depletion der löslichen, inhibitorischen Faktoren als Therapieansätze anbieten. Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass BAT3 erst als lösliches Protein die NK Zell-Funktion inhibiert. Lösliches BAT3 konnte nur in B-CLL Seren nachgewiesen werden, während bei gesunden Probanden BAT3 nur exosomal-gebunden vorlag. Eine erfolgreiche Depletion von BAT3 aus B-CLL Seren konnte hier zwar nicht erreicht werden, aber dies sollte mithilfe anderer Methoden weiterverfolgt werden. Hierfür könnte die Herstellung von BAT3<sup>-/-</sup> B-CLL Zelllinien hilfreich sein, um weitere Erkenntnisse

über die Funktion von BAT3 bei einer B-CLL zu gewinnen. Dies ist allerdings mit der Schwierigkeit verbunden, da es keine B-CLL Zelllinien gibt. Es können daher nur primäre Zellen verwendet werden, bei denen eine BAT3-*knockout* mit viralen Vektoren erreicht werden könnte. Allerdings stellt die Verwendung von Viren ein Problem bei den Arbeiten mit Immunzellen dar, die ungewollt aktiviert werden und unspezifische Reaktionen hervorrufen könnten. Letzlich könnte die Fragestellung am besten in Mausmodellen, nach genetischem *knockdown* von BAT3 untersucht werden. Hierzu müsste man jedoch humanisierte Mäuse mit einem humanen Immunsystem einsetzen, da NKp30 (nicht aber BAT3) in Mäusen nicht exprimiert wird.

Die erfolgreiche Depletion von MIF in Mausmodellen erscheint therapeutisch aussichtsreich. So führt die Behandlung tumortragender Mäuse mit antagonistischen MIF-Antikörpern zu einem reduzierten Tumorwachstum [Meyer-Siegler, Leifheit et al. 2004]. Es bietet sich aber nicht nur eine Behandlung bezogen auf die Depletion von inhibitorischen Faktoren an, sondern auch das Einsetzen aktivierender Exosomen. Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass isolierte BAT3-positive Exosomen NK Zellen in ihrer Funktion keinesfalls inhibieren, sondern zu einer Aktivierung beitragen. Aktuelle Daten zeigten bereits, dass Exosomen mit einer hohen BAT3-Konzentration auf der Oberfläche eine NK Zell-Antwort verstärken können [Simhadri, Reiners et al. 2008; Simhadri 2008]. Hier könnte also die Zukunft einer neuen möglichen Therapieform liegen. Der therapeutische Einsatz von aktivierenden Exosomen in Kombination mit einer NK Zell-Therapie wird derzeit diskutiert [Terme, Ullrich et al. 2008].

### 6.3 Die NK Zell-spezifische Cre-Linie

Die Etablierung von Tiermodellen ist häufig von essentieller Bedeutung zur Darstellung und Visualisierung physiologischer Prozesse *in vivo* und *in situ*. In dieser Arbeit wurden Voraussetzungen zur Herstellung einer NK Zell-spezifische Cre-Maus geschaffen, um mittelfristig die Rolle der NK Zellen bei einer B-CLL näher zu untersuchen. Bisher gibt es keine hilfreichen Mausmodelle, die sich für die Bearbeitung dieser Fragestellung eignen. Ziel war es, Konstrukte herzustellen, die eine Expression von Cre unter der Kontrolle des NK Zell-spezifischen Promotors von NKp46 (NCR1) erlauben, der für die zur Herstellung entsprechender transgener Mauslinien geeignet ist.

Für die zellspezifische Cre-Expression wurde hier ein Minimal-Promotor bestehend aus 400 bp des humanen NKp46-Promotors verwendet. Walzer et al. [Walzer, Blerly

et al. 2007] zeigte, dass dieser Bereich innerhalb der Säuger stark konserviert ist. Um eine potentielle unspezifische Aktivierung in murinen Lymphozyten durch ähnliche Promotorsequenzen zu vermeiden, wurde deshalb für die Etablierung dieser Mauslinie die Sequenz des humanen NKp46-Promotors gewählt.

In *in vitro*-Vorversuchen konnte eine konstitutive Expression von Cre in humanen NK Zellen gezeigt werden. Eine unspezifische Aktivierung der Cre-Expression in anderen Lymphozyten (L428 und L540cy) konnte durch weitere Analysen ausgeschlossen werden.

Nach Mikroinjektion der Vektoren pNKp46Cre und pNKp46Cre-EBD in C57BL/6-Mausoozyten erfolgte die Identifizierung transgener Tiere über Schwanzbiopsie-Analysen. Die Häufigkeit und der Ort der Integration des Transgens ins Mausgenom wurden nicht ermittelt. Die Verpaarung von acht transgenen Mauslinien mit der Reporterline ROSA26-EYFP (R26R) sollten zur *in situ* Markierung von NK Zellen dienen, d.h. es wurde nur für NK Zellen eine YFP-Expression erwartet. Die mRNA-Analysen dieser acht Linien zeigten allerdings, dass Cre nicht exprimiert wurde. Bei einer RT-PCR konnte kein PCR-Produkt für Cre nachgewiesen werden.

Die Arbeiten von Walzer et al. und Gazit et al. [Walzer, Blery et al. 2007; Gazit, Gruda et al. 2006] basieren auf ähnlichen Ansätzen, wie sie in dieser Arbeit verfolgt wurden. In beiden Arbeiten wurde NKp46 als Marker für NK Zellen in genetisch veränderten Mauslinien verwendet. Gazit et al. etablierte eine „*knockin*“-Linie, bei der GFP in den Lokus von NKp46 integriert wurde. Damit war NKp46 zwar nicht mehr funktional, GFP konnte aber nun unter der Kontrolle des NKp46-Promotors exprimiert werden. Walzer et. al. verwendete genau wie in der hier vorliegenden Arbeit einen Minimal-Promotor von NKp46 für die spezifische Expression eines Diphtherietoxin-Rezeptor-IRES-GFP Fusionskonstrukts. Dabei konnte in nur einer von insgesamt sechs Cre-Linien eine erfolgreiche Cre-Expression nachgewiesen werden.

Eine Expression unter der Kontrolle des Minimal-Promotors von NKp46 hätte auch in dieser Arbeit funktionieren müssen. Auch die Vorarbeiten zeigten bereits die Expression von Cre *in vitro*. Möglicherweise wurden hier nicht genügend Cre-Linien getestet, so dass bei den acht hier untersuchten Linien noch nicht die Linie dabei war, die eine erfolgreiche Cre-Expression zeigen würde.

In neuen Ansätzen könnte man entweder den murinen Promotor und/oder eine verlängerte Promotorsequenz nutzen, obwohl der hier verwendete humane Minimal-Promotor bereits *in vitro* eine erfolgreiche Cre-Expression zeigen konnte und dies auch in der Arbeit von Walzer et al. erreicht worden ist. Eine weitere Maßnahme wäre das Einsetzen eines spezifischen BAC (*bacterial artificial chromosome*) mit einer anschließenden Integration des Transgens durch homologe Rekombination.

Mit der Etablierung einer NK Zell-spezifischen Cre-Linie könnte nicht nur die Rolle von NK Zellen bei einer B-CLL näher analysiert werden, sie würde auch allgemein zum besseren Verständnis der Biologie von NK Zellen beitragen. Es könnten Fragestellungen zur Unterscheidung bzw. Zuordnung verschiedenster Subpopulationen bearbeitet werden, wo die genaue Zuteilung bisher offen blieb (siehe *interferon-producing killer dendritic cell* (IKDC), *natural killer-like T cells* (NKT), *desidual NK* (dNK) *cells*).

## Literaturverzeichnis

- Ahmed, K. A., M. A. Munegowda, et al. (2008). "Intercellular trogocytosis plays an important role in modulation of immune responses." Cell Mol Immunol **5**(4): 261-9.
- Ashiru, O., P. Boutet, et al. (2010). "Natural killer cell cytotoxicity is suppressed by exposure to the human NKG2D ligand MICA\*008 that is shed by tumor cells in exosomes." Cancer Res **70**(2): 481-9.
- Banerji, J., J. Sands, et al. (1990). "A gene pair from the human major histocompatibility complex encodes large proline-rich proteins with multiple repeated motifs and a single ubiquitin-like domain." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(6): 2374-8.
- Binsky, I., M. Haran, et al. (2007). "IL-8 secreted in a macrophage migration-inhibitory factor- and CD74-dependent manner regulates B cell chronic lymphocytic leukemia survival." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(33): 13408-13.
- Biron, C., B. Mahieu, et al. (1999). "Preoperative screening for von Willebrand disease type 1: low yield and limited ability to predict bleeding." J Lab Clin Med **134**(6): 605-9.
- Biron, C. A., K. B. Nguyen, et al. (1999). "Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines." Annu Rev Immunol **17**: 189-220.
- Blanchard, N., D. Lankar, et al. (2002). "TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex." J Immunol **168**(7): 3235-41.
- Bozza, M., A. R. Satoskar, et al. (1999). "Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis." J Exp Med **189**(2): 341-6.
- Brandt, C. S., M. Baratin, et al. (2009). "The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans." J Exp Med **206**(7): 1495-503.
- Bryceson, Y. T., H. G. Ljunggren, et al. (2009). "Minimal requirement for induction of natural cytotoxicity and intersection of activation signals by inhibitory receptors." Blood **114**(13): 2657-66.

- Byrd, A., S. C. Hoffmann, et al. (2007). "Expression analysis of the ligands for the Natural Killer cell receptors NKp30 and NKp44." PLoS One **2**(12): e1339.
- Calderwood, S. K., J. R. Theriault, et al. (2005). "Message in a bottle: role of the 70-kDa heat shock protein family in anti-tumor immunity." Eur J Immunol **35**(9): 2518-27.
- Casanova, E., S. Fehsenfeld, et al. (2002). "ER-based double iCre fusion protein allows partial recombination in forebrain." Genesis **34**(3): 208-14.
- Cerwenka, A., J. L. Baron, et al. (2001). "Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(20): 11521-6.
- Clayton, A. and Z. Tabi (2005). "Exosomes and the MICA-NKG2D system in cancer." Blood Cells Mol Dis **34**(3): 206-13.
- Corduan, A., S. Lecomte, et al. (2009). "Sequential interplay between BAG6 and HSP70 upon heat shock." Cell Mol Life Sci **66**(11-12): 1998-2004.
- Desmots, F., H. R. Russell, et al. (2005). "The reaper-binding protein scythe modulates apoptosis and proliferation during mammalian development." Mol Cell Biol **25**(23): 10329-37.
- Falschlehner, C., U. Schaefer, et al. (2009). "Following TRAIL's path in the immune system." Immunology **127**(2): 145-54.
- Ferlazzo, G., M. L. Tsang, et al. (2002). "Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells." J Exp Med **195**(3): 343-51.
- Fernandez-Messina, L., O. Ashiru, et al. (2010). "Differential mechanisms of shedding of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored NKG2D ligands." J Biol Chem **285**(12): 8543-51.
- Garcia, E. L. and A. A. Mills (2002). "Getting around lethality with inducible Cre-mediated excision." Semin Cell Dev Biol **13**(2): 151-8.
- Garg, A., P. F. Barnes, et al. (2006). "Vimentin expressed on Mycobacterium tuberculosis-infected human monocytes is involved in binding to the NKp46 receptor." J Immunol **177**(9): 6192-8.
- Gastpar, R., M. Gehrman, et al. (2005). "Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells." Cancer Res **65**(12): 5238-47.

- Gazit, R., R. Gruda, et al. (2006). "Lethal influenza infection in the absence of the natural killer cell receptor gene Ncr1." Nat Immunol **7**(5): 517-23.
- Gehrmann, M., G. Liebisch, et al. (2008). "Tumor-specific Hsp70 plasma membrane localization is enabled by the glycosphingolipid Gb3." PLoS One **3**(4): e1925.
- Gehrmann, M., J. Marienhagen, et al. (2005). "Dual function of membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70), Bag-4, and Hsp40: protection against radiation-induced effects and target structure for natural killer cells." Cell Death Differ **12**(1): 38-51.
- Girart, M. V., M. B. Fuertes, et al. (2007). "Engagement of TLR3, TLR7, and NKG2D regulate IFN-gamma secretion but not NKG2D-mediated cytotoxicity by human NK cells stimulated with suboptimal doses of IL-12." J Immunol **179**(6): 3472-9.
- Grundy, M. A. and C. L. Sentman (2006). "Immunodeficient mice have elevated numbers of NK cells in non-lymphoid tissues." Exp Cell Res **312**(19): 3920-6.
- Güven, H., M. Gilljam, et al. (2003). "Expansion of natural killer (NK) and natural killer-like T (NKT)-cell populations derived from patients with B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL): a potential source for cellular immunotherapy." Leukemia **17**(10): 1973-80.
- Haigis, K. M., K. R. Kendall, et al. (2008). "Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon." Nat Genet **40**(5): 600-8.
- Hanna, J., T. Gonen-Gross, et al. (2004). "Novel APC-like properties of human NK cells directly regulate T cell activation." J Clin Invest **114**(11): 1612-23.
- Hatjiharissi, E., L. Xu, et al. (2007). "Increased natural killer cell expression of CD16, augmented binding and ADCC activity to rituximab among individuals expressing the Fc{gamma}RIIIa-158 V/V and V/F polymorphism." Blood **110**(7): 2561-4.
- Hayakawa, Y. and M. J. Smyth (2006). "Innate immune recognition and suppression of tumors." Adv Cancer Res **95**: 293-322.
- Herz, J., J. Pardo, et al. (2009). "Acid sphingomyelinase is a key regulator of cytotoxic granule secretion by primary T lymphocytes." Nat Immunol **10**(7): 761-8.
- Horvai, A., W. Palinski, et al. (1995). "Scavenger receptor A gene regulatory elements target gene expression to macrophages and to foam cells of atherosclerotic lesions." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(12): 5391-5.

- Hsieh, Y. Y., Y. J. Lin, et al. (2010). "Human lymphocyte antigen B-associated transcript 2, 3, and 5 polymorphisms and haplotypes are associated with susceptibility of Kawasaki disease and coronary artery aneurysm." J Clin Lab Anal **24**(4): 262-8.
- Ivanov, I., K. C. Lo, et al. (2007). "Identifying candidate colon cancer tumor suppressor genes using inhibition of nonsense-mediated mRNA decay in colon cancer cells." Oncogene **26**(20): 2873-84.
- Johnstone, R. M. (2006). "Exosomes biological significance: A concise review." Blood Cells Mol Dis **36**(2): 315-21.
- Kalinski, P., R. B. Mailliard, et al. (2005). "Natural killer-dendritic cell cross-talk in cancer immunotherapy." Expert Opin Biol Ther **5**(10): 1303-15.
- Kim, W. J., R. A. Okimoto, et al. (2008). "Mutations in the neutral sphingomyelinase gene SMPD3 implicate the ceramide pathway in human leukemias." Blood **111**(9): 4716-22.
- Klune, J. R., R. Dhupar, et al. (2008). "HMGB1: endogenous danger signaling." Mol Med **14**(7-8): 476-84.
- Kobayashi, H., N. Tanaka, et al. (2005). "Hrs, a Mammalian Master Molecule in Vesicular Transport and Protein Sorting, Suppresses the Degradation of ESCRT Proteins Signal Transducing Adaptor Molecule 1 and 2." Journal of Biological Chemistry **280**(11): 10468-10477.
- Konjevic, G., K. Mirjagic Martinovic, et al. (2009). "Distribution of several activating and inhibitory receptors on CD3-CD16+ NK cells and their correlation with NK cell function in healthy individuals." J Membr Biol **230**(3): 113-23.
- Kornacker, M., G. Moldenhauer, et al. (2006). "Cytokine-induced killer cells against autologous CLL: direct cytotoxic effects and induction of immune accessory molecules by interferon-gamma." Int J Cancer **119**(6): 1377-82.
- Krockenberger, M., Y. Dombrowski, et al. (2008). "Macrophage migration inhibitory factor contributes to the immune escape of ovarian cancer by down-regulating NKG2D." J Immunol **180**(11): 7338-48.
- Krockenberger, M., J. B. Engel, et al. (2010). "Macrophage migration inhibitory factor expression in cervical cancer." J Cancer Res Clin Oncol **136**(5): 651-7.
- Kwak, J. H., S. I. Kim, et al. (2008). "BAT3 interacts with transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptors and enhances TGF-beta1-induced type I collagen expression in mesangial cells." J Biol Chem **283**(28): 19816-25.

- Lancaster, G. I. and M. A. Febbraio (2005). "Exosome-dependent trafficking of HSP70: a novel secretory pathway for cellular stress proteins." J Biol Chem **280**(24): 23349-55.
- Lanier, L. L. (2008). "Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition." Nat Immunol **9**(5): 495-502.
- Lespagnol, A., D. Duflaut, et al. (2008). "Exosome secretion, including the DNA damage-induced p53-dependent secretory pathway, is severely compromised in TSAP6/Steap3-null mice." Cell Death Differ **15**(11): 1723-33.
- Lolis, E. (2001). "Glucocorticoid counter regulation: macrophage migration inhibitory factor as a target for drug discovery." Curr Opin Pharmacol **1**(6): 662-8.
- Lotze, M. T. and K. J. Tracey (2005). "High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal." Nat Rev Immunol **5**(4): 331-42.
- Lucas, M., W. Schachterle, et al. (2007). "Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15." Immunity **26**(4): 503-17.
- Luyet, P. P., T. Falguieres, et al. (2008). "The ESCRT-I subunit TSG101 controls endosome-to-cytosol release of viral RNA." Traffic **9**(12): 2279-90.
- Manchen, S. T. and A. V. Hubberstey (2001). "Human Scythe contains a functional nuclear localization sequence and remains in the nucleus during staurosporine-induced apoptosis." Biochem Biophys Res Commun **287**(5): 1075-82.
- Mandelboim, O. and A. Porgador (2001). "NKp46." Int J Biochem Cell Biol **33**(12): 1147-50.
- Mao, X., Y. Fujiwara, et al. (2001). "Activation of EGFP expression by Cre-mediated excision in a new ROSA26 reporter mouse strain." Blood **97**(1): 324-6.
- Marchesini, N., W. Osta, et al. (2004). "Role for mammalian neutral sphingomyelinase 2 in confluence-induced growth arrest of MCF7 cells." J Biol Chem **279**(24): 25101-11.
- Markel, G., R. Seidman, et al. (2009). "Natural killer lysis receptor (NKLR)/NKLR-ligand matching as a novel approach for enhancing anti-tumor activity of allogeneic NK cells." PLoS One **4**(5): e5597.
- Meyer-Siegler, K. L., E. C. Leifheit, et al. (2004). "Inhibition of macrophage migration inhibitory factor decreases proliferation and cytokine expression in bladder cancer cells." BMC Cancer **4**: 34.
- Michelet, X., A. Djeddi, et al. (2010). "Developmental and cellular functions of the ESCRT machinery in pluricellular organisms." Biol Cell **102**(3): 191-202.

- Moretta, A., C. Bottino, et al. (2002). "What is a natural killer cell?" Nat Immunol **3**(1): 6-8.
- Moretta, A., C. Bottino, et al. (2001). "Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity." Annu Rev Immunol **19**: 197-223.
- Moretta, A., E. Marcenaro, et al. (2008). "NK cells at the interface between innate and adaptive immunity." Cell Death Differ **15**(2): 226-33.
- Moretta, L., R. Biassoni, et al. (2002). "Human NK cells and their receptors." Microbes Infect **4**(15): 1539-44.
- Mukhopadhyay, D. and H. Riezman (2007). "Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling." Science **315**(5809): 201-5.
- Nuckel, H., M. Switala, et al. (2010). "The prognostic significance of soluble NKG2D ligands in B-cell chronic lymphocytic leukemia." Leukemia **24**(6): 1152-9.
- Pandey, R., C. M. DeStephan, et al. (2007). "NKp30 ligation induces rapid activation of the canonical NF-kappaB pathway in NK cells." J Immunol **179**(11): 7385-96.
- Pogge von Strandmann, E., V. R. Simhadri, et al. (2007). "Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells." Immunity **27**(6): 965-74.
- Poggeler, S., M. Nowrousian, et al. (2006). "Microarray and real-time PCR analyses reveal mating type-dependent gene expression in a homothallic fungus." Mol Genet Genomics **275**(5): 492-503.
- Porgador, A. (2005). "Natural cytotoxicity receptors: pattern recognition and involvement of carbohydrates." ScientificWorldJournal **5**: 151-4.
- Raiborg, C., K. G. Bache, et al. (2002). "Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes." Nat Cell Biol **4**(5): 394-398.
- Raulet, D. H. (2004). "Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response." Nat Immunol **5**(10): 996-1002.
- Raulet, D. H. (2006). "Missing self recognition and self tolerance of natural killer (NK) cells." Semin Immunol **18**(3): 145-50.
- Ruggeri, L., A. Mancusi, et al. (2006). "Natural killer cell recognition of missing self and haploidentical hematopoietic transplantation." Semin Cancer Biol **16**(5): 404-11.

- Santoro, A., S. Cannella, et al. (2006). "Novel Munc13-4 mutations in children and young adult patients with haemophagocytic lymphohistiocytosis." J Med Genet **43**(12): 953-60.
- Sasaki, T., E. C. Gan, et al. (2007). "HLA-B-associated transcript 3 (Bat3)/Scythe is essential for p300-mediated acetylation of p53." Genes Dev **21**(7): 848-61.
- Sasaki, T., E. Marcon, et al. (2008). "Bat3 deficiency accelerates the degradation of Hsp70-2/HspA2 during spermatogenesis." J Cell Biol **182**(3): 449-58.
- Schlundt, A., J. Sticht, et al. (2009). "Proline-rich sequence recognition: II. Proteomics analysis of Tsg101 ubiquitin-E2-like variant (UEV) interactions." Mol Cell Proteomics **8**(11): 2474-86.
- Scholten, J., K. Hartmann, et al. (2008). "Mast cell-specific Cre/loxP-mediated recombination in vivo." Transgenic Res **17**(2): 307-15.
- Shimshek, D. R., J. Kim, et al. (2002). "Codon-improved Cre recombinase (iCre) expression in the mouse." Genesis **32**(1): 19-26.
- Simhadri, V. R. (2008). Exosomal derived HLA-B-Associated Transcript-3 is a ligand for NKp30 and regulates Natural Killer Function in Innate and Adaptive Immune Responses. Labor für Immuntherapie. Köln, Universität zu Köln.
- Simhadri, V. R., K. S. Reiners, et al. (2008). "Dendritic cells release HLA-B-associated transcript-3 positive exosomes to regulate natural killer function." PLoS One **3**(10): e3377.
- Srinivas, S., T. Watanabe, et al. (2001). "Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus." BMC Dev Biol **1**: 4.
- Stuffers, S., C. Sem Wegner, et al. (2009). "Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs." Traffic **10**(7): 925-37.
- Terme, M., E. Ullrich, et al. (2008). "Natural killer cell-directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies." Nat Immunol **9**(5): 486-494.
- They, C., M. Ostrowski, et al. (2009). "Membrane vesicles as conveyors of immune responses." Nat Rev Immunol **9**(8): 581-93.
- They, C., L. Zitvogel, et al. (2002). "Exosomes: composition, biogenesis and function." Nat Rev Immunol **2**(8): 569-79.
- Thiele, M. and J. Bernhagen (2005). "Link between macrophage migration inhibitory factor and cellular redox regulation." Antioxid Redox Signal **7**(9-10): 1234-48.

- Thress, K., E. K. Evans, et al. (1999). "Reaper-induced dissociation of a Scythe-sequestered cytochrome c-releasing activity." EMBO J **18**(20): 5486-93.
- Tian, Y., S. James, et al. (2006). "Conditional and inducible gene recombineering in the mouse inner ear." Brain Res **1091**(1): 243-54.
- Trajkovic, K., C. Hsu, et al. (2008). "Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes." Science **319**(5867): 1244-7.
- Trotta, R., J. D. Col, et al. (2008). "TGF-beta utilizes SMAD3 to inhibit CD16-mediated IFN-gamma production and antibody-dependent cellular cytotoxicity in human NK cells." J Immunol **181**(6): 3784-92.
- van Kilsdonk, J. W., L. C. van Kempen, et al. (2010). "Soluble adhesion molecules in human cancers: sources and fates." Eur J Cell Biol **89**(6): 415-27.
- van Niel, G., I. Porto-Carreiro, et al. (2006). "Exosomes: a common pathway for a specialized function." J Biochem **140**(1): 13-21.
- Vitale, M., M. Della Chiesa, et al. (2005). "NK-dependent DC maturation is mediated by TNFalpha and IFNgamma released upon engagement of the NKp30 triggering receptor." Blood **106**(2): 566-71.
- Vivier, E. and F. Romagne (2007). "Good news, bad news for missing-self recognition by NK cells: autoimmune control but viral evasion." Immunity **26**(5): 549-51.
- Vivier, E., E. Tomasello, et al. (2008). "Functions of natural killer cells." Nat Immunol **9**(5): 503-510.
- von Strandmann, E. P., H. P. Hansen, et al. (2006). "A novel bispecific protein (ULBP2-BB4) targeting the NKG2D receptor on natural killer (NK) cells and CD138 activates NK cells and has potent antitumor activity against human multiple myeloma in vitro and in vivo." Blood **107**(5): 1955-62.
- Waldhauer, I. and A. Steinle (2008). "NK cells and cancer immunosurveillance." Oncogene **27**(45): 5932-43.
- Walzer, T., M. Blery, et al. (2007). "Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(9): 3384-9.
- Walzer, T., M. Dalod, et al. (2005). "Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force"." Blood **106**(7): 2252-8.
- Welchman, R. L., C. Gordon, et al. (2005). "Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(8): 599-609.

- Winner, M., J. Meier, et al. (2008). "A novel, macrophage migration inhibitory factor suicide substrate inhibits motility and growth of lung cancer cells." Cancer Res **68**(18): 7253-7.
- Wu, B. X., C. J. Clarke, et al. (2010). "Mammalian Neutral Sphingomyelinases: Regulation and Roles in Cell Signaling Responses." Neuromolecular Med.
- Wu, Y. H., S. F. Shih, et al. (2004). "Ricin triggers apoptotic morphological changes through caspase-3 cleavage of BAT3." J Biol Chem **279**(18): 19264-75.
- Yu, X., S. L. Harris, et al. (2006). "The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein." Cancer Res **66**(9): 4795-801.
- Zhan, R., X. Leng, et al. (2009). "Heat shock protein 70 is secreted from endothelial cells by a non-classical pathway involving exosomes." Biochem Biophys Res Commun **387**(2): 229-33.
- Zhang, L., L. Zhu, et al. (2009). "[Analysis of immunophenotype, lymphocytic subsets and NK cells in patients with B cell chronic lymphoid leukemia]." Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi **17**(1): 36-9.
- Ziegler, H. W., N. E. Kay, et al. (1981). "Deficiency of natural killer cell activity in patients with chronic lymphocytic leukemia." Int J Cancer **27**(3): 321-7.
- Zitvogel, L., A. Regnault, et al. (1998). "Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes." Nat Med **4**(5): 594-600.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich während dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Elke Pogge von Strandmann, die es mir ermöglichte, meine Arbeit in ihrer Gruppe anzufertigen und mich mit Rat und Ideen unterstützt hat.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Frau PD. Dr. R. Nischt für die Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit bedanken. Außerdem möchte ich Herrn Prof. Dr. T. Hoppe danken, der sich als Gutachter bereit erklärt hat, sowie Herrn Prof. Dr. Roth für die Übernahme des Prüfungsvorsitz. Frau Dr. N. Reinart möchte ich danken, dass sie sich als Prüfungsbeisitzerin bereit erklärt hat.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Hallek dafür, dass ich meine Promotionsarbeit am Uniklinikum zu Köln in der Medizinischen Klinik I anfertigen konnte. Außerdem danke ich allen, die mir im Rahmen einer Kooperation, Material für meine Arbeiten zur Verfügung gestellt haben.

Besonders möchte ich mich auch bei meiner gesamten Gruppe für die Unterstützung, den Spaß bei der Arbeit und das entspannte Arbeitsklima bedanken. Ganz herzlich möchte ich Venkat Simhadri, Katrin Reiners und Hinrich Hansen für gute Ideen und die tolle Unterstützung danken. Bei Jörg Keßler möchte ich mich für die lustigen Momente im Büro bedanken und Janine Kutzsche möchte für ihre motivierenden Worte und hilfreichen Korrekturen danken. Unseren Technischen Assistenten Anne Krüßmann, Gisela Schön, Hermann Straub, Martina Bessler und Raoul Michels danke ich herzlich für ihre tatkräftige Unterstützung im Labor und bei meiner Arbeit. Samir Tawadros danke ich für seine Hilfe im Tierstall und bei Mausearbeiten.

Ganz besonders möchte ich mich bei all meinen Freunden bedanken, die mich die ganze Zeit begleitet, motiviert und unterstützt haben und immer für mich da sind. Ich danke euch für ganz viel Spaß und Freude, die ihr mit mir teilt und die stets offenen Ohren, wenn ich euch brauche. Meinen Freund Matthias Kraft danke ich ganz besonders, dass er für mich da ist, mich immer wieder motiviert und mir viel Freude bringt.

Schließlich möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern und meinen Bruder bedanken. Ich danke euch, dass ihr mich all die Jahre unterstützt habt, mir das Studium ermöglicht habt und immer für mich da seid.

*...Danke*

## Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahren nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Frau PD. Dr. Roswitha Nischt betreut worden.

Teilveröffentlichungen: Simhadri, V.R., Reiners K.S. et al. (2008). „*Dendritic cells release HLA-B-associated transcript-3 positive exosomes to regulate natural killer function.*“ PLoS One **3**(10):e3377

Köln, den .....

.....

Daniela Topolar