INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen-Gesamtfakultät

der

Ruprecht–Karls–Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Humanbiologin Daniela Willen

aus Haselünne

Tag der mündlichen Prüfung:

Thema

Identifizierung, Charakterisierung und funktionelle Analyse der Bindungspartner von APRIL und TACI auf Monozyten und Dendritischen Zellen

Gutachter: Prof. Dr. Lutz Gissmann

Prof. Dr. Werner Buselmaier

Die vorliegende Arbeit wurde am Forschungsschwerpunkt Tumorimmunologie – Arbeitsgruppe Apoptoseregulation – des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) in Heidelberg von August 2001 bis März 2006 in der Arbeitsgruppe von Dr. Henning Walczak durchgeführt.

Die Betreuung an der Universität Heidelberg erfolgte durch Prof. Dr. Lutz Gissmann (DKFZ, Heidelberg) und Prof. Dr. Werner Buselmaier (Universität Heidelberg).

MEIN DANK GILT…

all den Freunden und Kollegen, die mich in den letzten zehn Jahren auf dem Weg in die Wissenschaft begleitet haben.

Ich möchte Mateusz Stachura danken für seine stetige Aufmunterung und seinen Ehrgeiz, neben der 'Deutung' des Politischen mich tatkräftig bei der 'Deutung' des Biologischen zu unterstützen und dafür, dass er mir gezeigt hat, dass es nicht nur die Lebenswelt des Labors gibt, sondern Kreativität nur entsteht, indem man sein Bewusstsein auch für andere Dinge öffnet.

Dr. Henning Walczak möchte ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Betreuung dieser Arbeit danken.

Prof. Dr. Lutz Gissmann danke ich für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit an der Universität Heidelberg sowie die Übernahme der Begutachtung.

Prof. Dr. Werner Buselmaier danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. Peter Altevogt danke ich für die Übernahme des Drittgutachtens und Prof. Dr. David Robinson für die Übernahme des Viertgutachtens.

Dr. Adelheid Czerwenka möchte ich für wertvolle Anregungen und Tipps danken. PD Dr. Reinhard Schwartz-Albiez und Prof. Dr. Guido David danke ich für ihre hilfreichen Ratschläge in der Glykobiologie.

Manuela Schader danke ich für ihre Freundschaft, ihr stetig offenes Ohr für viele meiner Fragen, ihre Aufmunterungen und ihre innere Stärke, die mir ein großes Vorbild ist. Mein Dank gilt Oksana Voloshanenko, Ronald Koschny, Tobias Haas, Daniel Aydin Jaromir Sykora, Astrid Winkler, Tom Ganten, Anne Große-Wilde, Carl Leonard, Martin Sprick, Denise Eberle, Uta Schaefer, Christina Falschlehner, Claudia Rappl, Sandra Prokosch, Andreea Czernok und Susanne Buschke für die gute Zusammenarbeit und die oftmals gewährte Hilfe im Laboralltag und ganz besonders Melanie Motsch und meinen ehemaligen Auszubildenden Nina Hörner, Petra Ludwig und Michael Schlampp, deren Geist und Fleiß zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Danke auch dem gesamten Labor von Prof. Peter Krammer und dem DC-Club für die fortwährende Inspiration und kreativen Gedanken, die unerforschten Tiefen der Immunologie zu ergründen.

Meinen Eltern danke ich ganz besonders für Ihre permanente Unterstützung – Ihnen und Oma Frieda möchte ich diese Arbeit widmen.

" The more you study a system
The more you realize that you
do not fully understand it."

Stohl W. 2004

ZUSAMMENFASSUNG

APRIL (engl.: a proliferation inducing ligand) und BAFF (engl.:B cell activating factor of the tumor necrosis factor (TNF) family) sind zwei eng verwandte Liganden innerhalb der TNF-Familie. Beide Liganden teilen sich zwei Rezeptoren, TACI (engl.: transmembrane activator and CAML interactor) und BCMA (engl.: B cell maturation antigen), die vor allem auf B-Zellen exprimiert werden und vor kurzem konnten Glykosaminoglykan (GAG)-Ketten von Proteoglykanen als dritter APRIL-spezifischer Bindungspartner auf Tumorzellen, B-Zellen und T-Zellen identifiziert werden. APRIL hat eine zweiseitige Rezeptorspezifität und kann daher gleichzeitig über seine Heparinbindedomäne mit negativ geladenen GAG-Ketten von Proteoglykanen und über seine TNF-Homologiedomäne (THD) mit den Rezeptoren TACI bzw. BCMA interagieren.

Unstimulierte Monozyten sterben via Apoptose, während Stimuli, die deren Differenzierung zu Makrophagen oder Dendritischen Zellen induzieren, die apoptotischen Prozesse inhibieren. Diese Arbeit zeigt erstmals eine kritische Rolle von APRIL für das Überleben und möglicherweise für die Differenzierung primärer humaner Monozyten.

Monozyten binden APRIL nach einem Tag in Kultur und *in vitro* aus Monozyten differenzierte DCs zeigen eine starke APRIL-Bindung, die nach Aktivierung der DCs mit LPS bzw. CD40L weiter ansteigt. Die Bindung korreliert mit der Expression von negativ geladenen GAG-Ketten, da Behandlung dieser Zellen mit Heparitinase oder Chlorat (ein genereller Inhibitor der Sulfatierung) die APRIL-Bindung stark reduziert. Sulfatierte Glykane (Heparin, Heparansulfat/HS) inhibieren die APRIL-Bindung, durch Kompetition mit der APRIL-Bindung an zelluläre HS-Ketten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass immobilisiertes APRIL, vor allem im Komplex mit BCMA Adhäsion von Monozyten auslöst. Dieses Adhäsionssignal wird durch Bindung von APRIL an GAG-Ketten auf der Oberfläche dieser Zellen induziert, da das Adhäsionssignal der Heparinbindedomän-Mutante von APRIL stark reduziert war. Die morphologischen Veränderungen implizieren eine Rolle von APRIL bei der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden GAG-Ketten von Proteoglykanen als ein weiterer Bindungspartner von TACI identifiziert. Durch Untersuchung der bekannten Kristallstruktur und der linearen Sequenz von TACI konnten basische Motive identifiziert werden, die möglicherweise die Bindung von TACI an GAG-Ketten von Proteoglykanen vermitteln. Die hier durchgeführte Studie zeigt erstmals, dass GAG-Ketten von Proteoglykanen einen Interaktionspartner von TACI auf Monozyten und Dendritischen Zellen darstellen. TACI induziert Adhäsion von Monozyten, allerdings führt das durch TACI vermittelte Adhäsionssignal interessanterweise zu deren Tod.

Proteoglykane werden von den meisten Zellen kontinuierlich in den Kulturüberstand sezerniert. Rekombinant hergestelltes TACI und aus Monozyten-Kulturüberstand aufgereinigtes APRIL haben Heparansulfat-Proteoglykane (HSPGs) gebunden und sind daher möglicherweise auch *in vivo* mit HSPGs komplexiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass APRIL über seine Heparinbindedomäne Proteoglykane auf extravasierten Monozyten bindet und dadurch Zell-Zell-Anlagerung von TACI- und/oder BCMA-exprimierenden Lymphozyten bewirken kann. APRIL induziert wesentliche Überlebens- und Differenzierungssignale sowohl in APRIL präsentierenden Monozyten als auch in TACI- bzw. BCMA-exprimierenden Zellen.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bedeuten, dass neben dem B-Zellsystem auch

die Funktion von Monozyten und Dendritischen Zellen entscheidend durch die Interaktionen von APRIL mit dessen Rezeptoren beeinflusst wird.

Abstract

APRIL (a proliferation inducing ligand) and BAFF (B cell activating factor of the tumor necrosis factor (TNF)-family) are two closely related members of the TNF-family. Both ligands share two receptors namely TACI (transmembrane activator and CAML interactor) and BCMA (B cell maturation antigen) which are predominantely expressed on B-cells. Recently glycosaminoglycan (GAG) side chains of proteoglycans have been identified as a third APRIL-specific binding partner on tumor cells, B-cells and T-cells. APRIL has a two-sided receptor specificity and can both interact with TACI and BCMA via its TNF-homology domain (THD) and bind negatively charged glycosaminoglycan chains of proteoglycans via its heparin-binding domain.

Unstimulated monocytes die *in vitro* via apoptosis unless their differentiation to macrophages and dendritic cells is induced by various known and yet to be identified factors. We show for the first time that APRIL has a critical role in inducing a survival and probably a differentiation signal in monocytes.

Monocytes start to bind APRIL after one day in culture and binding of APRIL increases in *in vitro* differentiated dendritic cells after stimulation with CD40L or LPS. This binding correlates with the appearance of negatively charged GAG-chains as treatment of these cells with heparitinase or chlorate (a general inhibitor of sulfation) strongly reduces APRIL binding. Sulfated glycans (heparin, heparansulfate/HS) inhibit binding of APRIL by competing with the binding of APRIL to cellular HS-chains. This thesis shows that immobilized APRIL, particularly when complexed with BCMA, induces adhesion of monocytes by binding to GAG-chains on the surface of these cells. The heparin-binding mutant of APRIL has a strongly reduced adhesion capacity. These morphological changes implicate a role for APRIL in the differentiation process of monocytes to macrophages.

In the second part of this work GAG-chains of proteoglycans could be identified as a binding-partner for TACI. Analysis of the known crystal-structure and the linear amino acid sequence of TACI revealed basic motifs that possibly mediate binding of TACI to negatively charged GAG-chains of proteoglycans. Our study shows for the first time, that GAG-chains of proteoglycans are a binding-partner of TACI on monocytes and dendritic cells. TACI induces adhesion of monocytes. However this adhesion signal mediates death.

Most cells constitutively shed proteoglycans into the culture medium. Recombinant TACI and APRIL that was purified from monocyte culture supernatant copurify with heparansulfate-proteoglycans (HSPGs). This implicates that APRIL and TACI may also be found complexed with HSPGs *in vivo*.

We propose that APRIL binds to proteoglycans on extravasated monocytes via its heparin-binding domain and selectively triggers cell-cell-adhesion of lymphocytes which express TACI and/or BCMA. APRIL possibly induces a survival- and differentiation-signal into both the APRIL presenting monocytes as well as into TACI and BCMA expressing cells. The results of this work show, that in addition to the B-cell system the function of monocytes and dendritic cells is critically affected by the interaction of the APRIL with its respective receptors.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung……...…….....I

Abstract…….....II

Inhaltsverzeichnis…….....……...…… III

I EINLEITUNG 1

1 Die TNF-Superfamilie..... 1

1.1 Geschichte der Identifikation des Tumor Nekrose Faktors..... 1
1.2 Die Liganden der TNF-Superfamilie..... 2
1.3 Die Rezeptoren der TNF-Superfamilie..... 4

2 Das APRIL/BAFF Zytokin System 5

2.1 Struktur von ARPIL und BAFF..... 6
2.2 Interaktion von APRIL und BAFF mit ihren Rezeptoren..... 9
2.3 Expression von APRIL und BAFF in Monozyten und Dendritischen Zellen..... 13
2.4 Physiologische Funktion von BAFF..... 14
2.5 Physiologische Funktion von APRIL..... 16
2.6 Von myeloiden Zellen produziertes APRIL und BAFF induziert Ig-Klassenwechsel in B-Zellen..... 18

3 Die extrazelluläre Matrix (EZM)..... 20

3.1 Aufbau der EZM..... 21
3.2 Struktur und Funktion von EZM-Proteoglykanen..... 21
3.3 Komposition und Funktion von Proteoglykanen in myeloiden Zellen..... 25
3.4 Syndekane als Vermittler von Zelladhäsion und Überleben..... 26
3.5 APRIL bindet Glykosaminoglykane der EZM über seine Heparinbindedomäne..... 27
3.6 Glykosaminoglykane als Oligomerisierungs-Motiv für APRIL..... 30
3.7 TACI interagiert mit Glykosaminoglykanen..... 31

4 Wissenschaftliche Fragestellung..... 32

II MATERIAL UND METHODEN 33

1 Material..... 33

1.1 Chemikalien..... 33
1.2 Häufig verwendete Puffer..... 33
1.3 Biologisches Material..... 35
1.4 Nährmedien..... 35
1.5 Antikörper und gekoppelte Proteine..... 36
1.6 Liganden und Rezeptoren der TNF-Superfamilie..... 37
1.7 Molekularbiologische Materialien..... 38
1.8 Geräte..... 41
1.9 Software..... 41

2 Methoden 42

2.1 Molekularbiologische Methoden..... 42
2.2 Zellbiologische Methoden..... 49

2.3 Methoden zur Untersuchung von Protein-GAG Interakionen 54
2.4 Herstellung rekombinanter Proteine 56
2.5 Proteinchemische Methoden 57

III ERGEBNISSE 62

1 Herstellung und Charakterisierung der rekombinanten Fusionsproteine 62

1.1 Biochemische Charakterisierung der rekombinanten Proteine 63
1.2 Rekombinantes APRIL und dessen Heparinbindedomän-Mutante haben eine zweiseitige Rezeptorspezifität und zeigen unterschiedliche Affinität gegenüber Heparin 67

2 APRIL bindet Monozyten und Dendritische Zellen und ist ein Überlebens- und Differenzierungsfaktor für Monozyten 69

2.1 Expression von APRIL und BAFF in primären Monozyten und Dendritischen Zellen 70
2.2 APRIL bindet Monozyten und Dendritische Zellen 76
2.3 APRIL bindet sulfatierte Glykosaminoglykan-Ketten von Proteoglykanen auf Monozyten und Dendritischen Zellen 78
2.4 Expression von Proteoglykanen auf Monozyten und Dendritischen Zellen 81
2.5 *In vitro* von Monozyten produziertes APRIL hat Proteoglykane gebunden 83
2.6 APRIL verhindert die spontane Apoptose primärer Monozyten 85
2.7 APRIL induziert Adhäsion von Monozyten und ist gleichzeitig ein Differenzierungsfaktor 87

3 TACI bindet Glykosaminoglykan-Ketten von Proteoglykanen auf Monozyten und Dendritischen Zellen 92

3.1 TACI enthält potentielle Heparin-Bindedomänen (HBD) 92
3.2 TACI bindet Heparin-Sepharose und interagiert gleichzeitig mit BAFF 95
3.3 TACI bindet sulfatierte Glykosaminoglykan-Ketten von Proteoglykanen auf Monozyten und Dendritischen Zellen 97
3.4 TACI induziert Adhäsion und Zelltod in IL-4/GM-CSF behandelten Monozyten 99

IV DISKUSSION 102

1 Untersuchung der Interaktion von APRIL und TACI mit Glykosaminoglykan-Ketten und der Expression von APRIL in Monozyten und Dendritischen Zellen 103

2 Glykosaminoglykane auf Monozyten und Dendritischen Zellen stellen einen weiteren Bindungspartner für APRIL und TACI dar. 113

3 APRIL und TACI vermitteln Adhäsion von Monozyten via Glykosaminoglykane und induzieren ein Überlebens- und Differenzierungssignal (APRIL) und ein Todessignal (TACI) in Monozyten 115

V ANHANG 123

1 Abkürzungen 123

2 Literaturverzeichnis..... 125

3 Publikation..... 149

4 Erklärung..... 149

I EINLEITUNG

Die Gewebshomöostase in einem mehrzelligen Organismus ist abhängig von der ausgeglichenen Bilanz zwischen Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Zelltod, die es ermöglicht unterschiedliche Gewebe aufzubauen und diese räumlich zu organisieren. Um diese Homöostase zu erreichen, übermitteln lösliche und zellgebundene Faktoren in unterschiedlichen Kombinationen und Konzentrationen, sowie zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Ontogenese eine Vielzahl von Anweisungen an eine Zelle.
Die Mitglieder der Tumor Nekrose Faktor (TNF)-/ TNF-Rezeptor (TNF-R)-Superfamilie spielen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Organen, der Homöostase, Genese und Funktion des Immunsystems. Sie übermitteln Signale, die sowohl das Überleben als auch die Apoptose von Immunzellen induzieren. Es ist daher nicht überraschend, dass Störungen der normalen Funktion der Mitglieder dieser Familie zu Krankheiten wie Krebs, Sepsis, Autoimmunerkrankungen und Immundefizienz führen. Daher ist es wichtig, die physiologische Rolle und die Signalwege, die von den Mitgliedern der TNF-Familie ausgelöst werden, zu verstehen. Mit diesem Verständnis wird es möglich Krankheiten zu heilen, die durch Defekte dieser Signalmoleküle entstehen.

1 Die TNF-Superfamilie

1.1 Geschichte der Identifikation des Tumor Nekrose Faktors

Der Chirurg William Coley erkannte Ende des 19. Jahrhunderts, dass sich bei einigen Patienten, die eine bakterielle Infektion entwickelten, die Tumore verkleinerten. In der Hoffnung Krebs heilen zu können, begann er, Krebspatienten Überstände verschiedener Bakterienkulturen zu injizieren. Diese Überstände, genannt „Coley`s toxins“ bewirkten zwar, dass die Tumoren nekrotisch wurden, hatten jedoch starke Nebenwirkungen (Coley, 1991). Erst 1975 konnte Lipopolysaccharid (LPS) als die aktive Komponente von „Coley’s toxins“ aus zellfreien Extrakten von gramnegativen Bakterien isoliert werden. LPS selbst bewirkt keine Tumornekrose, induziert jedoch mit TNF einen Faktor, der auch im Serum LPS-behandelter Tiere nachgewiesen werden konnte (Carswell et al., 1975).
Nach der Klonierung von humanem TNF (Pennica et al., 1984) und murinem TNF (Beutler et al., 1985) zeigte sich, dass TNF starke Sequenzhomologie zu Lymphotoxin (LT) aufwies, einem Faktor der Tod in Lymphozyten auslöst (Gray et al., 1984). Diese beiden Faktoren waren der erste Hinweis auf ein komplexes Netzwerk interagierender Liganden und Rezeptoren der TNF/TNF-Rezeptor-Superfamilie (TNF-SF/TNF-R-SF) (Locksley et al., 2001).

1.2 Die Liganden der TNF-Superfamilie

Die Liganden der TNF-Familie sind Typ-II-Transmembranproteine (C-Terminus extrazellulär), mit Ausnahme von APRIL und LTα, welche nur löslich, d.h. nicht membranassoziiert exprimiert werden. Bindung der Liganden an ihre Rezeptoren führt zu deren Oligomerisierung und zur Aktivierung verschiedener Signalwege, wie der Aktivierung von Caspasen oder des NF-κB-, JNK- oder MAPK-Signalweges, welche entweder Apoptose, Differenzierung oder Proliferation in der aktivierten Zelle auslösen. Einen Überblick über die bis heute bekannten Mitglieder der TNF/TNF-R Superfamilie und ihre Funktion im Immunsystem gibt **Tabelle 1**.

Liganden	Rezeptoren	Funktion im Immunsystem/in der Entwicklung
Ltα3= TNFβ (**TNFSF1**)	TNFR1 (**TNFRSF1A**) TNFR2 (**TNFRSF1B**) HVEM (**TNFRSF14**)	Inflammation, Entwicklung der Lymphknoten
TNFα (**TNFSF2**)	TNFR1 TNFR2	Inflammation, Milz-Gewebearchitektur
LTα1β2 (**TNFSF3**)	LTβR	T_H1 Antwort, Entwickung der Lymphknoten und Peyer'schen Plaque, Milz-Gewebearchitektur und Organisation
Ox40L (**TNFSF4**)	Ox40 (**TNFRSF4**)	Stimulation von T Zellen, Antigenpräsentation
CD40L (**TNFSF5**)	CD40 (**TNFRSF5**)	Überleben, Proliferation, Zytokinproduktion, Ig-Klassenwechsel und Differenzierung von B Zellen, Reifung von Dendritischen Zellen, Bildung von Keimzentren
FasL (**TNFSF6**)	FAS (**TNFRSF6B**) DcR3	Apoptose, Aktivierungsinduzierter Zelltod
CD27L (**TNFSF7**)	CD27 (**TNFRSF7**)	Stimuliert Proliferation von T Zellen,fördert Ig Produktion von B-Zellen und Bildung von Gedächtnis B-Zellen
CD30L (**TNFSF8**)	CD30(**TNFRSF8**)	Moduliert Funktion von T und B Zellen, Inhibition der Ig Produktion und des Ig-Klassenwechsels
4-1BBL (**TNFSF9**)	4-1BB (**TNFRSF9**)	Kostimulation und Regulation von T und B Zellen
TRAIL (**TNFSF10**)	TRAIL-R1 (**TNFRSF10A**) TRAIL-R2 (**TNFRSF10B**) TRAIL-R3 (**TNFRSF10C**) TRAIL-R4 (**TNFRSF10D**) OPG (**TNFRSF11B**)	Induziert Apoptose in Tumor- und virusinfizierten Zellen
RANKL (**TNFSF11**)	RANK (**TNFRSF11A**) OPG (**TNFRSF11B**)	Überlebenssignal für Dendritische Zellen, B Zellen, Reifung von Osteoklasten
TWEAK (**TNFSF12**)	Fn14 (**TNFRSF12A**)	Proliferation von Endothelzellen, Angiogenese, Induktion inflammatorischer Zytokine in T Zellen
APRIL (**TNFSF13A**)	BCMA (**TNFRSF17**) TACI (**TNFRSF13B**) GAGs	Ig-Klassenwechsel von B Zellen, Kostimulation von T-und B-Zellen
BAFF (**TNFSF13B**)	BAFF-R (**TNFRSF13C**) BCMA (**TNFRSF17**) TACI (**TNFRSF13B**)	Überleben und Reifung und Ig-Klassenwechsel von B Zellen, Kostimulation von T- und B-Zellen,
LIGHT (**TNFSF14**)	LTβR (**TNFRSF3**) HVEM (**TNFRSF14**) DcR3 (**TNFRSF6B**)	Aktivierung von T zellen, Überlebensignal für Thymozten
TL1A (**TNFSF15**)	DR3 (**TNFRSF12**)	Kostimulation von T- und NK-Zellen
NGF	NGFR (**TNFRSF16**)	Innervation von Neuronen
GITRL (**TNFSF18**)	GITR (**TNFRSF18**)	Aktivierung und Proliferation von T Zellen, verhindert Supressoraktivität von regulatorischen T zellen
EDA (isoform A1 / A2)	EDAR =EDA-A1R XEDAR=EDA-A2R	Entwicklung von Zähnen, Haaren und exokrinen Drüsen
BTLA	HVEM (**TNFRSF14**)	Inhibition der T Zell Aktivierung
NgR1	TROY (**TNFRSF19**)	Inhibition des Wachstums von Neuronen
-	RELT (**TNFRSF19L**)	
-	DR6 (**TNFRSF21**)	Unterdrückt T_H2 Immunantwort

Tabelle 1: Die Mitglieder der TNF-/TNF-R-SF, ihre Bezeichnungen und ihre Funktion im Immunsystem und in der Entwicklung. BTLA, NGF und NgR1 gehören nicht zur TNF-Familie, sind jedoch aufgeführt, da sie Rezeptoren der TNF-R-Familie binden. Ebenso sind Glykosaminoglykane (GAGs) keine Mitglieder der TNF-Familie, stellen jedoch Bindungspartner für TNF, APRIL, OPG, DcR3 und TACI dar.
(nach http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/tnftop.html und (Mackay and Kalled, 2002)

Einige dieser Liganden z.B. TNF sind sowohl membranintegriert als auch in löslicher Form aktiv. Membranintegrierte Formen können von den Zellen durch Metalloproteinasen abgespalten werden oder durch alternatives Spleißen der Liganden mRNA entstehen (Dhein et al., 1995; Gearing et al., 1994). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass lösliche und membrangebundene Liganden (z.B. CD95L) unterschiedliche Signale vermitteln. So hat CD95L, wenn er proteolytisch von der Zelloberfläche freigesetzt wird, ein stark reduziertes Apoptose-induzierendes Potential (Schneider et al., 1998). Ein weiteres Beispiel ist CD40L, welcher nur in membrangebundener Form seine Aktivität auf B-Zellen ausüben kann (Jumper et al., 1995). Im Gegensatz zu den löslichen, können die membrangebundenen Liganden nach Rezeptorbindung zum Teil selbst Signale in die Zelle weiterleiten, wodurch ein bi-direktionaler Informationsaustauch ermöglicht wird (Eissner et al., 2004).

Sowohl die membrangebundenen, als auch löslichen Liganden der TNF-Familie kommen als kompakte, nicht-kovalent verbundene Homotrimere vor, die die biologisch aktive Form darstellen. Die 20-30%ige Homologie zwischen den Liganden ist vor allem in den internen aromatischen Resten begründet, die die Ausbildung der Homotrimere ermöglichen. Die externen Oberflächen der Ligandentrimere sind reich an hydrophilen Resten und zeigen wenig Sequenzähnlichkeit, ein Hinweis auf die Rezeptorselektivität (Locksley et al., 2001). Informationen über die dreidimensionale Struktur der Liganden sind bekannt von TNF (Eck and Sprang, 1989; Jones et al., 1989), TRAIL (Cha et al., 1999; Hymowitz et al., 2000), CD40L (Karpusas et al., 1995), LT (Eck et al., 1992), BAFF (Karpusas et al., 2002; Liu et al., 2002; Oren et al., 2002), APRIL (Wallweber et al., 2004), RANKL (Lam et al., 2001) sowie EDA-A1 und EDA-A2 (Hymowitz et al., 2003). Zusätzlich zu diesen Daten bestätigen biochemische Analysen wie Gelfiltrationsexperimente die trimere Struktur der löslichen Liganden.

Die Interaktion zwischen den Liganden und Rezeptoren der TNF-Familie überschneiden sich teilweise. So interagieren viele Liganden mit mehreren Rezeptoren. Einen Überblick über Interaktionen zwischen den Mitgliedern der TNF-/TNF-R-SF gibt **Abbildung 1**.

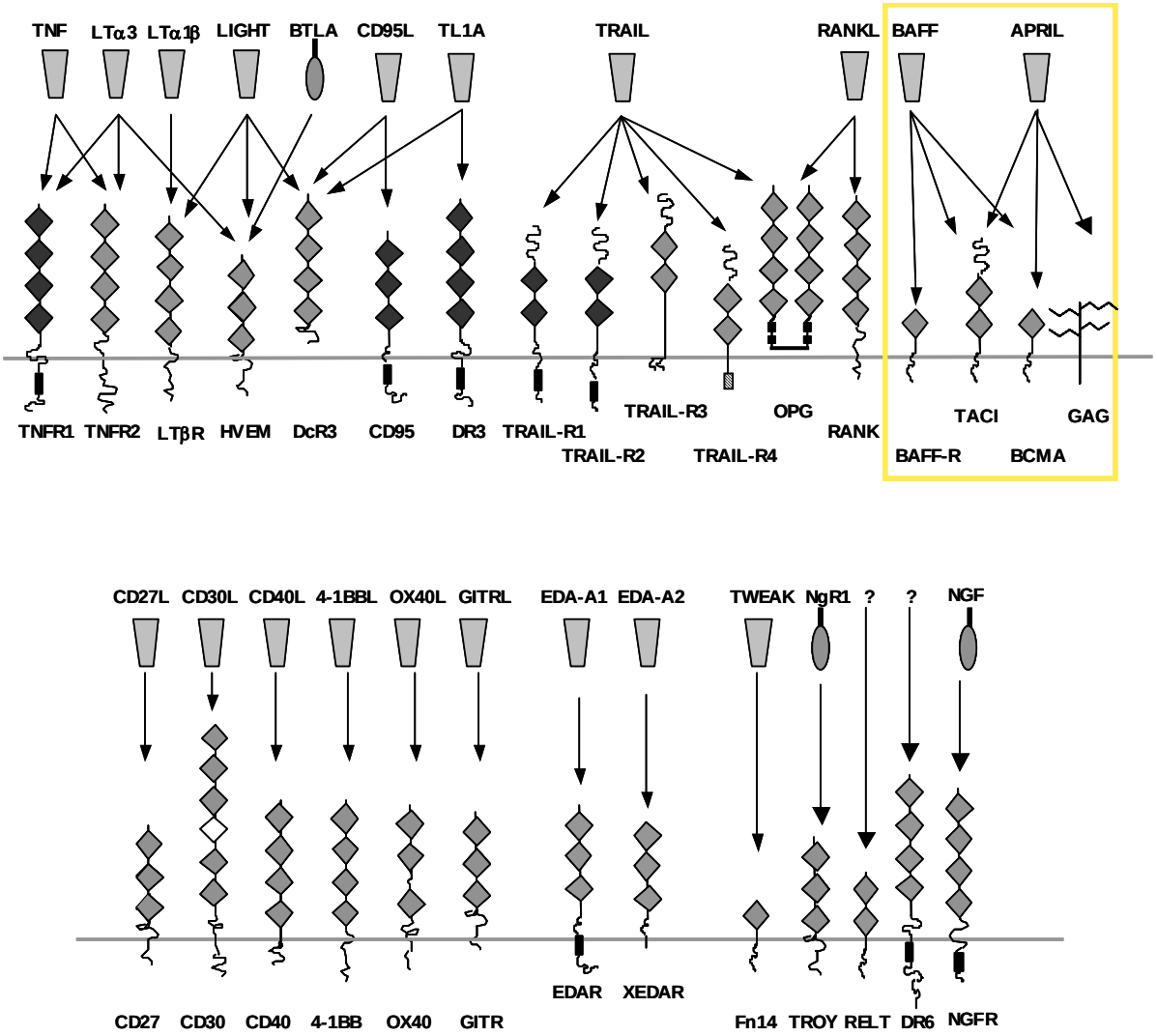


Abbildung 1: Die Interaktionen zwischen den Mitgliedern der TNF-/TNF-R-SF. Die Rezeptoren sind als Rauten dargestellt, die Liganden als konische Körper, die Trimere darstellen. BTLA, NgR1 und NGF sind aufgrund ihrer Struktur keine Mitglieder der TNF-Familie. Die Rauten stellen die cysteinreichen Domänen (CRD) dar. Die Pfeile zeigen die Liganden-Rezeptor-Paare an. Todesrezeptoren sind schwarz unterlegt, Rezeptoren, die keine Apoptose auslösen können, grau. Intrazelluläre Todesdomänen sind als schwarze Zylinder dargestellt. TRAIL-R4 besitzt eine inkomplette Todesdomäne. EDAR, NGFR und DR6 besitzten zwar jeweils eine intrazelluläre Domäne, die starke Homologie zur Todesdomäne aufweist, jedoch ist fraglich, ob über diese Rezeptoren Zelltod ausgelöst wird. Bislang unbekannte Interaktionspartner bekannter Rezeptoren sind als Fragezeichen angedeutet. OPG enthält zwei Todesdomänen. Da OPG sezerniert wird, kann über diese Todesdomänen kein Zelltod ausgelöst werden. Glykosaminoglykane (GAGs) gehören nicht zur TNF-R-Familie, wurden jedoch vor kurzem als "dritter APRIL-Rezeptor" identifiziert. Weiterhin interagieren GAGs mit TNF, OPG, DcR3 und TACI (nicht eingezeichnet) Die Liganden BAFF und APRIL und ihre Rezeptoren sind hervorgehoben (gelber Rahmen), da im Folgenden auf sie eingegangen wird (adaptiert von Hehlgans et al., 2005).

1.3 Die Rezeptoren der TNF-Superfamilie

Die meisten der 29 bisher bekannten Mitglieder der TNF-R-Familie sind Typ-I-Transmembranproteine (N-Terminus extrazellulär). BCMA, TACI, BAFF-R und

XEDAR besitzen jedoch kein Signalpeptid und werden daher als Typ-III-Transmembranproteine angesehen. OPG und DcR3 besitzten keine Transmembrandomäne und werden sezerniert. TRAIL-R3 ist über einen GPI-Rest in der Membran verankert. Einige der Transmembranrezeptoren (TNF-R1, TNF-R2, CD95, 4-1BB, CD40, CD30, CD27) liegen auch löslich vor, weshalb angenommen wird, dass diese als sogenannte Scheinrezeptoren fungieren und verhindern, das der jeweilige Ligand an den membranständigen Rezeptor binden kann (Mocellin et al., 2005).
Die extrazellulären Domänen enthalten bis zu sechs cysteinreiche Domänen (CRD), welche das Hauptmotiv dieser Familie sind. Hier besteht allerdings eine große Variation. So weist z.B. der BAFF-R nur eine partielle, TNF-R1 und TNF-R2 vier, und CD30 sechs cysteinreiche Domänen auf (Mocellin et al., 2005).
Abhängig von der Art der Signalweiterleitung, kann man die Rezeptoren in drei Gruppen einteilen.
Eine Untergruppe bilden die sogenannten Todesrezeptoren, die sich durch die gemeinsame Eigenschaft auszeichnen, Apoptose auslösen zu können (Peter et al. 1998). Derzeit sind fünf Todesrezeptoren bekannt: TNF-R1 (CD120a), CD95 (Fas/APO-1)), DR3 (TRAMP/LARD/WSL1/APO-3), TRAIL-R1 (DR4/APO-2) und TRAIL-R2 (DR5/KILLER/TRICK2) (DR = engl. death receptor). Strukturell zeichnen sie sich durch eine ungefähr 80 Aminosäure lange, homologe intrazelluläre Domäne aus, die als Todesdomäne bezeichnet wird und für die Apoptoseinduktion essentiell ist (Itoh and Nagata, 1993; Tartaglia et al., 1993).
Eine weitere Untergruppe bilden die Scheinrezeptoren (engl.: Decoy Receptor, DcR), die nicht in der Lage sind, nach Ligandenbindung ein Signal in die Zelle weiterzuleiten. Dazu gehören TRAIL-R3 (DcR1), TRAIL-R4 (DcR2), DcR3 und OPG. TRAF (engl.: TNF receptor-associated factor) -bindende Rezeptoren stellen die dritte Gruppe in der TNF-R-Familie dar. Dazu gehören TNF-R2, CD27, CD30, CD40, LTβR, OX40, 4-1BB, BAFF-R, BCMA, TACI, Fn14, HVEM, GITR, XEDAR und TROY. Bisher sind sechs humane TRAFs bekannt, die mit den 4-6 Aminosäure langen TRAF-Bindestellen im zytoplasmatischen Teil dieser Rezeptoren interagieren und dabei verschiedene Signalwege induzieren können, die für die Aktivierung, Proliferation und das Überleben von Zellen notwendig sind (Chung et al., 2002). Die Interaktionen von BAFF-R, BCMA und TACI mit TRAFs sind nur in Überexpressionsstudien beschrieben worden (Hatzoglou et al., 2000; Ni et al., 2004; Xia et al., 2000; Xu and Shu, 2002). Bisher konnte eine Interaktion von TRAFs mit diesen Rezeptoren in nativen Systemen nicht nachgewiesen werden.

2 Das APRIL/BAFF Zytokin System

APRIL (engl.: **a** **pr**oliferation-**i**nducing **l**igand) und BAFF (engl.: **B** cell **a**ctivation **f**actor of the TNF **f**amily) wurden vor sechs Jahren von verschiedenen Gruppen durch EST-Datenbank-Screening nach TNF-homologen DNA-Sequenzen identifiziert (Gross et al., 2000; Hahne et al., 1998; Kelly et al., 2000; Moore et al., 1999; Mukhopadhyay et al., 1999; Schneider et al., 1999; Shu et al., 1999). Sie stellen eine neue Subfamilie von

Liganden in der TNF-Familie mit 50%iger Sequenzähnlichkeit dar, deren Rezeptorinteraktionen sowohl redundant als auch spezifisch sind (Schneider, 2005). Es wurde schnell klar, dass APRIL und BAFF eine Rolle bei verschiedenen immunologischen Phänomenen spielen, die zuvor nicht zufriedenstellend beantwortet werden konnten. Dazu gehören z.B. das Überleben von B-Zellen in der Peripherie, der T-Zell-unabhängige, (= CD40L-unabhängige) Antikörper-Isotypenwechsel in B-Zellen und die Induktion autoreaktiver B-Zellen (Schneider, 2005).
BAFF bindet die TNF-R-Familienmitglieder BAFF-R, TACI (engl.: **T**ransmembrane **a**ctivator and **C**AML **i**nteractor) und mit geringerer Affinität BCMA (engl.: **B**-**c**ell **m**aturation **a**ntigen), wohingegen APRIL BCMA mit höherer Affinität als TACI bindet (Marsters et al., 2000).

Vor kurzem konnten extrazelluläre Matrix (EZM)-Proteoglykane, die strukturell keine Ähnlichkeit mit TNF-Rezeptoren haben, als dritter APRIL-"Rezeptor" und als Bindungspartner von TACI identifiziert werden (Bischof et al., 2005). Dass ein dritter APRIL-Rezeptor existieren musste, wurde schon vor einigen Jahren erkannt, da Tumorzellen und Fibroblasten APRIL, jedoch nicht BAFF binden und diese Zellen kein BCMA oder TACI exprimieren (Hahne et al., 1998; Rennert et al., 2000). In Abschnitt 3 wird auf diesen Interaktionspartner genauer eingegangen.

2.1 Struktur von ARPIL und BAFF

2.1.1 Die genomische Struktur von APRIL und BAFF

Sowohl APRIL als auch BAFF enthalten eine Furin-Schnittstelle, welche an der N-terminalen Seite der TNF-Homologiedomäne (THD) lokalisiert ist und eine spezifische Konsensus-Sequenz von vier Aminosäuren enthält (R-X-R/K-R). Im Gegensatz zu BAFF, welches an der Zellmembran durch Furin in die lösliche Form überführt wird, wird APRIL intrazellulär im Golgi durch die Protease Furin prozessiert und dann sezerniert, weshalb APRIL nur als lösliches Protein vorkommt (Lopez-Fraga et al., 2001). Aufgrund eines alternativen Spleissvorganges am TWEAK-APRIL-Lokus - das Gen für TWEAK liegt genau 878bp vor der Transkriptionsstartstelle von APRIL (Pradet-Balade et al., 2002) - kann APRIL auch als Transmembran-Hybridprotein, genannt TWE-PRIL, vorliegen (Chicheportiche et al., 1997; Pradet-Balade et al., 2002). Das TWE-PRIL-Protein konnte bisher in primären T-Zellen und Monozyten-Zelllinien detektiert werden (Pradet-Balade et al., 2002). Da die extrazelluläre Domäne dieses Fusionsproteins die komplette THD von APRIL beinhaltet, wird vermutet, dass TWE-PRIL dieselbe Rezeptor-Spezifität wie APRIL aufweist (Kalled et al., 2005). Die funktionelle Signifikanz dieses Fusionsproteins ist allerdings noch nicht erforscht (Kalled et al., 2005). Eine alternative Spleissform von BAFF, genannt delta-BAFF (Δ-BAFF) in welcher das Exon 3 fehlt, kommt nur membrangebunden vor und ist in der

Lage Heteromultimere mit BAFF zu bilden, wodurch die Freisetzung von löslichem BAFF von der Zelloberfläche verhindert und somit die Bioaktivität von BAFF lokal restringiert wird (Gavin et al., 2003). Von APRIL existieren drei Isoformen : Isoform-α, Isoform-β und Isoform-γ, wobei die Isoform-α den kompletten offenen Leserahmen von APRIL enthält. Analog zu Δ-BAFF fehlt der APRIL Isoform-β auch das Exon 3. Anstelle der fehlenden 17 Aminosäuren ist ein Asparagin (potentielle neue N-Glykosylierungsstelle) eingefügt, allerdings ist für diese Isoform und für die APRIL Isoform-γ, in welcher 3 Aminosäuren im Exon 6 am C-Terminus fehlen, die funktionelle Bedeutung bis heute unklar (Kelly et al., 2000). **Abbildung 2** zeigt die Übereinanderlagerung der Exon- und Protein-Struktur von APRIL, TWE-PRIL und BAFF.

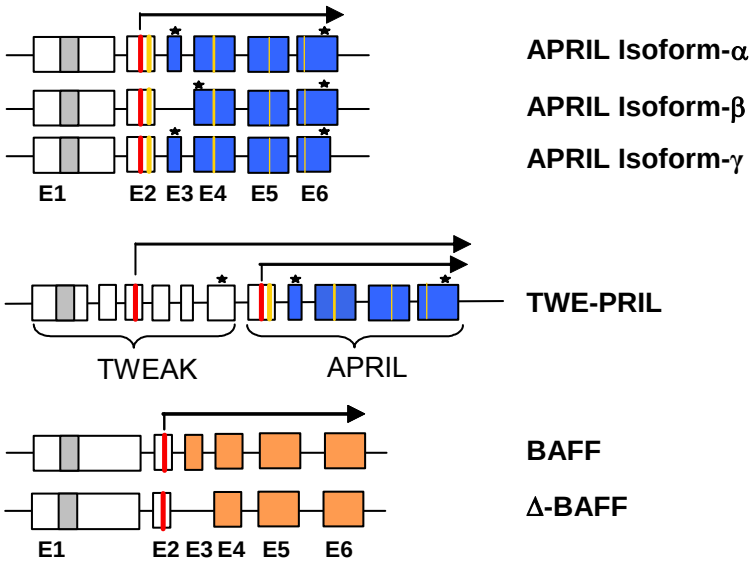


Abbildung 2: Übereinanderlagerung der Exon- und Protein-Struktur von APRIL, TWE-PRIL und BAFF. Die Exons (E1-E6) sind als Vierecke dargestellt. Die Exons, die die THD von APRIL und BAFF kodieren sind blau und orange und die Transmembrandomäne grau eingefärbt. Rote Balken stellen Furinschnittstellen und gelbe Balken basische, positiv geladene Heparinbindedomänen (HBD) bzw. einzelne basische Aminosäuren (dünne gelbe Balken) dar. Für APRIL sind 3 Isoformen bekannt. Isoform-α bezeichnet unverändertes APRIL, in Isofom-β ist Exon 3 deletiert und in Isoform-γ fehlen drei Aminosäurem am C-Terminus. TWE-PRIL entsteht durch alternatives Spleissen am TWEAK/APRIL Lokus, wodurch Exon 1-6 von TWEAK an Exon 2-6 von APRIL fusioniert werden und so ein neues Hybridmoleküle TWE-PRIL entsteht. Ebenso existiert eine alternative Spleissform von BAFF, delta-BAFF (Δ-BAFF), in welcher ebenso wie in APRIL Isofom-β das Exon-3 deletiert ist und welches trotz der Furin-Schnittstelle nicht von der Zelloberfläche abgespalten wird. Δ-BAFF interagiert mit BAFF und verhindert dessen Freisetzung von der Zelloberfläche. Durch Deletion von Exon 3 in APRIL entsteht jeweils eine neue N-Glykosylierungsstelle. Die Sterne bezeichnen mögliche N-Glykosylierungsstellen und die Pfeile markieren das lösliche Protein.

2.1.2 Die Kristallstrukturen von APRIL und BAFF

Die Kristallstrukturen von APRIL (PDB:1xu1) und BAFF (PDB:1OQD) zeigen sehr große Ähnlichkeit. APRIL und BAFF liegen als kompakte, nicht-kovalent verbundene Homotrimere vor, wobei jedes Protomer aus fünf antiparallelen β-Faltblattsträngen besteht (Oren et al., 2002; Wallweber et al., 2004). Eine Übereinanderlagerung eines

APRIL- und eines BAFF-Protomers zeigt **Abbildung 3**. In allen Kristallstrukturen der TNF-Familienmitglieder sind die β-Faltblattstränge in zwei Schichten organisiert: A'AHCF und B'BGDE. Über die A'AHCF-β-Faltblattstränge erfolgt die Bindung der Protomere untereinander. Die B'BGDE-β-Faltblattstränge bilden die externe Oberfläche. Die Schleifen, die die β-Faltblätter verbinden, wie die AA'-, CD-, EF- und GH-Schleife, variieren zwischen den Familienmitgliedern und sind verantwortlich für die Spezifität der Liganden-Rezeptor Bindung (Zhang, 2004).

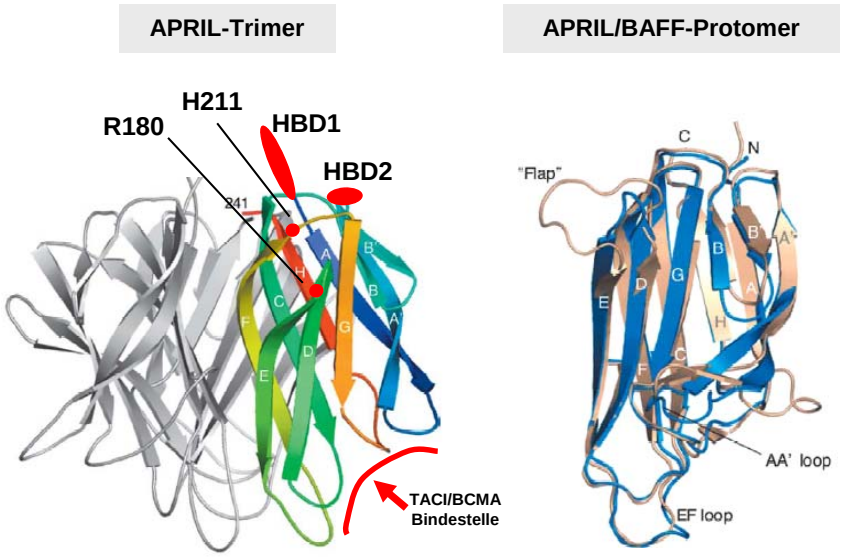


Abbildung 3: Die Kristallstruktur von murinem APRIL und Übereinanderlagerung der Kristallstruktur von APRIL und BAFF (nach Wallweber, 2004)
APRIL setzt sich zusammen aus drei Protomere, wovon eines farbig und die anderen zwei Protomere weiss dargestellt sind. Die β-Faltblätter sind mit Buchstaben gekennzeichnet und rote Ovale markieren positiv geladene basische Aminosäuren, die auch als Heparinbindedomäne (HBD) bezeichnet werden. Die Aminosäuren R180 und H211 sind vermutlich auch an der Ausbildung der HBD beteiligt. Ein roter Pfeil deutet die TACI/BCMA Bindestelle an.

Trotz der Sequenz- und Strukturähnlichkeit unterscheidet sich APRIL von BAFF in einigen Punkten. So hat BAFF im Gegensatz zu APRIL zwei Magnesiumionen gebunden, die für die optimale Aktivität von BAFF notwendig sind (Oren et al., 2002). APRIL und BAFF unterscheiden sich weiterhin in ihrer elektrostatischen Oberflächenladung. So ist der isoelektrische Punkt (pI) von APRIL pI=10, der von BAFF liegt bei pI=5, was zeigt, dass APRIL im Vergleich zu BAFF ein stark basisches Protein mit positiver Oberflächenladung ist (Wallweber et al., 2004). Der einzige signifikante Bereich gleicher Oberflächenladung liegt in der Rezeptorbindestelle und ist sowohl in APRIL als auch in BAFF positiv geladen (Hymowitz et al., 2005).

2.2 Interaktion von APRIL und BAFF mit ihren Rezeptoren

BAFF bindet verschiedene Rezeptoren. Dazu gehören BAFF-R, TACI und BCMA. Hingegen interagiert APRIL mit TACI, BCMA und über seine positiv geladenen basischen Aminosäuren, die ausserhalb und innerhalb der THD liegen mit sauren negativ geladenen sulfatierten Glykosaminoglykan (GAG)-Seitenketten von Proteoglykanen (Hendriks et al., 2005; Ingold et al., 2005). Im Gegensatz zu anderen TNF-Familienmitgliedern, bei welchen der jeweilige Rezeptor in dem Spalt zwischen den Liganden-Protomeren eines Trimers bindet, interagiert im APRIL- und BAFF-Trimer jeweils ein Protomer direkt mit den Rezeptoren TACI, BCMA und BAFF-R (nur für BAFF) (Liu et al., 2003).
Abbildung 4 gibt einen Überblick über die Interaktionen zwischen den Liganden und Rezeptoren und die Signale die nach Ligandenbindung über diese Rezeptoren in die Zelle weitergeleitet werden. Die Signalwege, die nach Ligandenbindung ausgelöst werden sind allerdings noch nicht vollständig charakterisiert.

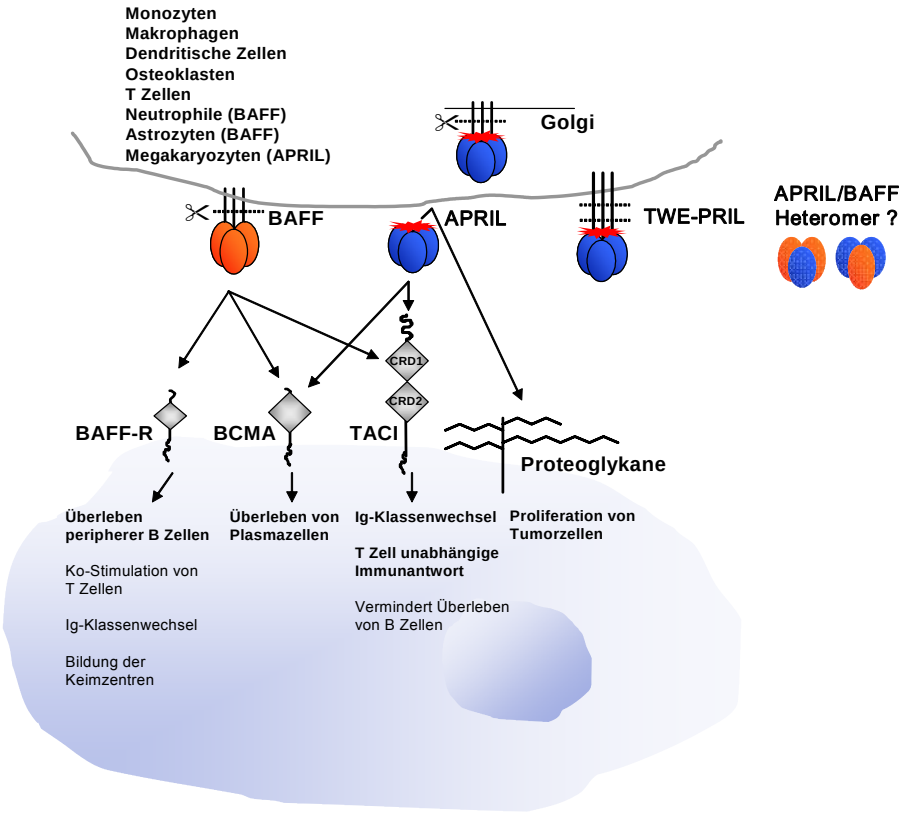


Abbildung 4: Die Interaktionen von APRIL und BAFF mit ihren Rezeptoren und Bindungspartnern und ihre Funktion im Immunsystem. Die Liganden APRIL und BAFF sind als homotrimere Proteine dargestellt, deren TNF-Homologiedomänen (THD) als oval gezeigt sind. APRIL wird im trans-Golgi durch die Protease Furin in die lösliche Form überführt und sekretiert, wohingegen BAFF als Transmembranprotein exprimiert und erst dort durch Furin in die lösliche From überführt wird. BAFF bindet BAFF-R, TACI und BCMA wohingegen APRIL mit BCMA, TACI und negativ geladenen Glykosaminoglykanen von Proteoglykanen interagiert. Durch alternatives Spleissen entsteht das Hybridprotein TWE-PRIL, welches aus der intrazellulären-, transmembran- und einem Teil der Rezeptorbindedomäne von TWEAK einschliesslich einer Furin-Schnittstelle, und der Rezeptorbindedomäne von APRIL mit einer zweiten Furin-Schnittstelle, besteht. APRIL/BAFF Heteromere sind beschrieben worden, allerdings ist nicht bekannt, welchen Rezeptor sie binden und an welchem Ort sie synthetisiert werden. Der rote Stern im APRIL Protein bezeichnet die positiv geladene Heparinbindedomäne (HBD), die mit negativ geladenen GAG-Ketten von Proteoglykanen interagiert.

TACI bindet BAFF mit einer ca. 10-20 fach höheren Affinität als APRIL (Marsters et al., 2000; Wu et al., 2000).
In APRIL wurde vor kurzem eine Abfolge basischer Aminosäuren identifiziert, die für die APRIL-Bindung an GAGs verantwortlich ist (Hendriks et al., 2005; Ingold et al., 2005). TACI weist ebenso eine Abfolge basischer Aminosäuren auf. Vor kurzem wurden GAG-Ketten von Proteoglykanen als weiterer Bindungspartner von TACI identifiziert (Bischof et al., 2005) (hier nicht eingezeichnet).

2.2.1 Die Rezeptoren von APRIL und BAFF

Der **BAFF-R** ist vor allem wichtig für das Überleben und die Reifung von B-Zellen in der Milz. Kurz nach dessen Entdeckung wurde ein Mausstamm (A/WySnJ) identifiziert in welchem eine Insertion am 3' Ende des BAFF-R-Gens zu einem annähernd vollständigen Verlust der Rezeptorfunktion führt (Hoag et al., 2000; Miller and Hayes, 1991). Diese und BAFF-R$^{-/-}$-Mäuse zeigen einen kompletten Verlust peripherer B2-B-Zellen aufgrund eines Blocks der B-Zell-Entwicklung im T1-Stadium (Shulga-Morskaya et al., 2004; Thompson et al., 2001). Der BAFF-R wird v.a. von unreifen T2-B-Zellen, reifen B-Zellen, Marginalzonen (MZ)-B-Zellen und aktivierten/Gedächtnis T-Zellen exprimiert (Gorelik et al., 2004; Yan et al., 2001a). Ligation des BCR und Aktivierung von T-Zellen führt zur Hochregulation der BAFF-R-Expression auf diesen Zellen (Smith and Cancro, 2003).

Die **BCMA**-Proteinexpression ist restringiert auf antikörperproduzierende Plasmazellen und B-Zellen in den Keimzentren der Tonsillen (Avery et al., 2003; Ng et al., 2004) und der Milz (eigene Beobachtung). Die BCMA mRNA Expression steigt während der Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen (Laabi et al., 1994). Allerdings ist das Protein als integrales Membranprotein im Golgi reifer B-Zellen lokalisiert und Zelloberflächenexpression wird nur auf Plasmazellen und bestimmten Myelomzelllinien detektiert (Avery et al., 2003; Gras et al., 1995; Novak et al., 2004). BCMA$^{-/-}$-Mäuse zeigen keinen ungewöhnlichen Phänotyp (Schiemann et al., 2001; Schneider et al., 2001; Xu and Lam, 2001), da möglicherweise BAFF über Bindung an den BAFF-R auf Plasmazellen und B-Zellen den Verlust von BCMA komplementieren kann (Ng et al., 2004). Allerdings ist ein Signal über BCMA wichtig für das Langzeit-Überleben von Plasmazellen, da in BCMA$^{-/-}$-Mäusen 6-8 Wochen nach Immunisierung im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen weniger als 20% antikörpersezernierende Plasmazellen nachgewiesen werden konnten (O'Connor et al., 2004). Möglicherweise überleben Plasmazellen, die in das Knochenmark (KM) migrieren, durch Signale von APRIL/BAFF welche von den Stromazellen des Knochenmarks (v.a. BAFF) (O'Connor et al., 2004) und Osteoklasten (v.a. APRIL) (Moreaux et al., 2005) produziert werden.

TACI wurde in einem ‚Yeast two Hybrid-Screen' gefunden, wo es mit CAML (engl.: calcium modulator and cyclophilin ligand) interagierte (von Bulow and Bram, 1997).

TACI wird in geringer Menge auf peripheren B-Zellen, B1-B-Zellen, vermehrt auf CD27+ B-Gedächtniszellen, MZ-B-Zellen (Batten et al., 2004), jedoch im Gegensatz zu BAFF-R und BCMA nicht auf B-Zellen der Keimzentren exprimiert (Ng et al., 2004; Novak et al., 2002; Novak et al., 2004). Obwohl frühere Untersuchungen TACI Expression auf aktivierten T-Zellen beschreiben (von Bulow and Bram, 1997; Wang et al., 2001), konnte in einer anderen Studien keine TACI Oberflächenexpression auf aktivierten T-Zellen nachgewiesen werden (Ng et al., 2004).

TACI defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte Anzahl an B-Zellen sowie eine erhöhte Anzahl Dendritischer Zellen (DCs) im PALS (engl.: periarteriolar lymphoid sheath) und der MZ der Keimzentren der Milz im nicht-immunisierten Zustand (Yan et al., 2001b), sichtbar an vergrösserter Milz, Lymphknoten und der Entwicklung von B-Zell-Lymphomen in 15% der Mäuse. Sie entwickeln Autoimmunerkrankungen mit hohen Titern an Autoantikörpern, Immunglobulinablagerungen in der Niere und daraus resultierender Nephritis (Seshasayee et al., 2003; Yan et al., 2001b). Allerdings ist die B-Zell Reifung in diesen Mäusen nicht gestört, so dass ausgeschlossen werden kann, das TACI eine Rolle bei der B-Zell-Differenzierung spielt. Da durch einen agonistischen TACI-Antikörper B-Zell-Proliferation inhibiert wird, scheint es, dass Signale über TACI die B-Zell-Aktivierung unterdrücken (Seshasayee et al., 2003; von Bulow et al., 2001; Yan et al., 2001b).

Hinweise auf einen noch unbekannten TACI-spezifischen Liganden gaben Versuche, in denen Mäuse nach Immunisierung (Immunogen: NP-chicken gamma globulin/ NP-CGG) mit BCMA-Fc oder TACI-Fc behandelt wurden. So bildeten BCMA-Fc-behandelte Mäuse der einen Studie (Vora et al., 2003) zwar Keimzentren und geringe Mengen hochaffiner anti-NP-CGG Antikörper, allerdings verschwanden die Keimzentren schneller und formten kein organisiertes bzw. reifes Netzwerk von follikulären dendritischen Zellen (FDCs), welches wichtig für die Retention und Präsentation von Antigen gegenüber B-Zellen ist. Im Gegensatz dazu wurden keine Keimzentren in TACI-Fc behandelten Mäusen detektiert (Yan et al., 2000), obwohl ebenso geringe Mengen hochaffiner Antikörper nachgewiesen werden konnten. Die Bildung der Antikörper wurde in der letzten Studie damit begründet, dass Affinitätsreifung auch unabhängig von Keimzentren stattfinden kann (Matsumoto et al., 1996). Desweiteren führt die Behandlung von chimären humanen RA (Rheumatoid Arthritis) synovium-SCID Mäusen mit TACI-Fc zur Zerstörung der FDCs in den ektopischen Keimzentren der Gelenke dieser Mäuse (Seyler et al., 2005).

Zwar ist es auf der einen Seite möglich, dass die durch TACI-Fc induzierte Zerstörung der Keimzentren alleinig durch die Neutralisation des B-Zell-Überlebensfaktors BAFF ausgelöst wird, welches eine Verminderung von B-Zellen, den Hauptproduzenten des für die FDC-Reifung notwendigen LT-α, zur Folge hat. Andererseits wäre auch denkbar, dass ein TACI spezifischer Ligand auf FDCs existiert, der in der Lage ist die FDC Reifung zu stoppen. Ein Indiz für diese Annahme könnte sein, dass in Keimzentren bisher keine TACI exprimierenden Zellen detektiert werden konnten, allerdings BCMA und BAFF-R auf B-Zellen der Keimzentren exprimiert werden (Ng et al., 2004).

Trotz der erhöhten Anzahl an B-Zellen und ihre Hyperreaktivität in $TACI^{-/-}$-Mäusen ist die Typ-II-T-Zell-unabhängige Immunantwort in diesen Mäusen stark reduziert. Die

starke Beeinträchtigung der Typ-II-T-Zell-unabhängigen Immunantwort auf Kapselpolysaccharide von Streptococcus pneumoniae in TACI$^{-/-}$ Mäusen, unterstreicht die Bedeutung eines APRIL bzw. BAFF Signals über TACI. Diese verminderte T-Zell-unabhängige Immunantwort könnte einen Defekt in B1-B- und MZ-B-Zellen widerspiegeln, da diese B-Zellen T-Zell-unabhängige Immunantworten vermitteln und normalerweise TACI exprimieren (von Bulow et al., 2001; Yan et al., 2001b).
Da TACI$^{-/-}$ Mäuse eine unveränderte Anzahl an B1- und MZ-B-Zellen haben, wird vermutet, dass der Defekt in der Signalweiterleitung über TACI in diesen Zellen liegen.

Eine Zusammenfassung der Proteinexpression der Liganden und Rezeptoren, sowie der in den verschiedenen 'knockout' bzw. transgenen Mäusen beobachteten Phänotypen gibt **Tabelle 2**.

Name	Protein Expression	Knockout Phänotyp	Transgener Phänotyp
TACI	B-Zellen (T2, MZ, follikuläre,naive, aktivierte, Gedächtnis), B1-B-Zellen, T-Zellen (fraglich), Plasmazellen (gering)	➢ Erhöhte Anzahl zirkulierender B-Zellen, B-Zell Hyperreaktivität, erhöhte Anzahl DCs in Keimzentren der Milz ➢ stark verminderte Typ-II T-Zell unabhängige Immunantwort ➢ autoimmune Nephritis ➢ 15% der Mäuse entwickeln Lymphome (Yan et al., 2001; von Bülow et al., 2001; Seshasayee et al., 2003)	**TACI-Fc transgen**: ➢ B-Zell Lymphopenie (reduzierte T2, MZ-B-Zellen), B1 = normal, T-Zellen in der Milz leicht reduziert (Schneider et al., 2001) ➢ Serum IgM, IgG reduziert, T-Zellen in Milz und Lyphknoten leicht reduziert, B1 = normal (Gross et al., 2001)
BCMA	B-Zellen der Keimzentren, Plasmazellen	➢ Keine Defekte im Immunsystem reduziert Fähigkeit langlebige Plasmazellen nach Immunisierung zu erhalten (Xu et al., 2002; O'Connor et al., 2004)	
BAFF-R	Alle B-Zellen, aktivierte/Gedächtnis T-Zellen	➢ Block der B-Zell Entwicklung im T1 Stadium, stark verminderte Ig Antwort gegenüber T-Zell abhängige/ unabhängige Antigene B1 = normal (Schiemann et al., 2001; Thompson et al., 2001; Amanna et al., 2003; Shulga-Morskaya et al., 2004; Sasakiy et al., 2004)	
APRIL	Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen, B-Zellen, aktivierte T-Zellen (gering), Tumorzellen, Neutrophile, Mastzellen, Megakaryozyten, Osteoklasten	➢ vermindeter IgA Klassenwechsel ➢ Erhöhte Anzahl an Keimzentren in der Milz (Castigli et al., 2004) ➢ normales Immunsystem (Varfolomeev et al., 2004)	➢ Erhöhtes Überleben tg T-Zellen *in vitro*, erhöhtes Überleben SEB reaktiver Vβ8⁺ CD4⁺ T-Zellen *in vivo*, erhöhte Typ-II T-Zell unabhängige Immunantwort. (Stein et al., 2002) ➢ B1-B Zell Tumoren im Alter von 9-12 Monaten (Planelles et al., 2005) ➢ Erhöhtes Serum IgM
BAFF	Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen, B-Zellen, aktivierte T-Zellen, Tumorzellen, Stromazellen des Knochenmarks, Neutrophile, Mastzellen, Osteoklasten	➢ Block der B-Zell Entwicklung im T1 Stadium, stark verminderte Ig Antwort gegenüber T-Zell abhängige/ unabhängige Antigene B1 = normal (Schiemann et al., 2001; Gross et al., 2001) ➢ gestörte Funktion der Keimzentren (Vora et al., 2003) ➢ starke Reduktion der B-Zell Differenzierungsmarker CD21/CD35 auf reifen-, T2- und MZ-B-Zellen (Gorelik et al., 2003)	➢ Expansion aller B-Zellen. Einige BAFF tg Mäuse zeigen erhöhte Anzahl an B1-B-Zellen Erhöhte Anzahl Keimzentren in der Milz (Mackay et al., 1999; Gross et al., 2001) ➢ Autoimmunerkrankungen ➢ Erhöhte Expression von CD21/35 auf B-Zellen ➢erhöhte Anzahl T-Effektor-/Gedächtniszellen ➢ Hyperglobulinämie (Mackay et al., 1999; Khare et al., 2000)

Tabelle 2: Proteinexpression und Phänotyp von TACI-/BCMA-/BAFF-R-/APRIL- und BAFF-defizienten Mäusen sowie einiger transgener Mäuse.

2.3 Expression von APRIL und BAFF in Monozyten und Dendritischen Zellen

Monozyten, Makrophagen (MΦ) und Dendritische Zellen (DCs) exprimieren mRNA für APRIL und BAFF (Craxton et al., 2003). Konnte die Expression des BAFF-Proteins sowohl auf der Zellmembran primärer Monozyten, als auch im Kulturüberstand detektiert werden, so ist BAFF kaum auf der Zelloberfläche von unreifen, aus

Monozyten *in vitro* generierten DCs und aus $CD34^+$ Vorläuferzellen generierten DCs detektierbar (Litinskiy et al., 2002; Nardelli et al., 2001). Erst nach Stimulation der DCs mit CD40L, IFN-γ und IFN-α kann lösliches und membrangebundenes BAFF verstärkt festgestellt werden (Litinskiy et al., 2002; Nardelli et al., 2001).
Obwohl in Kulturüberständen von Monozyten und unreifen DCs APRIL (~20 kDa) nachgewiesen werden konnte (Huard et al., 2004), war APRIL in Lysaten dieser Zellen nicht detektierbar (Craxton et al., 2003). Erst nach Stimulation von DCs mit LPS oder IFN-γ konnte eine kurze Form von APRIL im Lysat nachgewiesen werden (Craxton et al., 2003). In einer anderen Studie wurde die unprozessierte, 30 kDa Form von APRIL in Lysaten von mit CD40L, IFN-α und IFN-γ stimulierten DCs nachgewiesen (Litinskiy et al., 2002).
Im Gegensatz dazu exprimieren unstimulierte und mit LPS und IFN-γ aktivierte MΦ APRIL, dass im Lysat nachgewiesen werden kann (Craxton et al., 2003). Da die APRIL mRNA sowohl in Monozyten, MΦ und DCs exprimiert wird, allerdings nur in Lysaten von MΦ eine stimulationsunabhängige konstant hohe APRIL-Proteinexpression festgestellt werden konnte, wird angenommen, dass die APRIL-Expression in Monozyten und DCs posttranskriptionell reguliert wird (Craxton et al., 2003). Es kann jedoch auch sein, dass die unterschiedliche Proteinexpression durch unterschiedliche Prozessierung und Sekretion von APRIL in Monozyten und DCs bedingt ist (Craxton et al., 2003).

2.4 Physiologische Funktion von BAFF

BAFF existiert sowohl in membrangebundener als auch in löslicher Form, wobei beide Formen biologisch aktiv sind (Schneider et al., 1999). BAFF besitzt N-terminal zur THD ein polybasisches Motiv, das von Proteasen erkannt wird, so dass BAFF von der Zelloberfläche proteolytisch freigesetzt werden kann (Nardelli et al., 2001). BAFF wird in großen Mengen von myeloiden Zellen, die BAFF membrangebunden und löslich exprimieren, von Astrozyten (Krumbholz et al., 2005), in geringerer Menge von T-Zellen, Osteoklasten (Moreaux et al., 2005) und G-CSF-behandelten Neutrophilen, aber auch von strahlungsresistenten Stromazellen des Knochenmarks und der Milz exprimiert (Gorelik et al., 2004; O'Connor et al., 2004).
BAFF induziert Überleben (Batten et al., 2000) und Reifung von B-Zellen (Rolink et al., 2002), den Klassenswechsel von Immunglobulinen (Litinskiy et al., 2002), vermindert aktivierungsinduzierten Zelltod in anti-IgM stimulierten B-Zellen (Do et al., 2000) und erhöht die Proliferation von T-Zellen, die gleichzeitig mit anti-CD3 stimuliert wurden (Huard et al., 2004). Zytokine wie IL-10, IFN-γ und CD40L führen zu einer erhöhten BAFF-Proteinexpression in myeloiden Zellen (Craxton et al., 2003; Litinskiy et al., 2002; Nardelli et al., 2001; Scapini et al., 2003).

2.4.1 BAFF in der B-Zellentwicklung

Die B-Zell-Lymphopoese findet beim Menschen ausschließlich im Knochenmark statt. Dort generierte unreife B-Zellen wandern über das Blut zur weiteren Reifung in die Milz, wo sie in den B-Zellfollikeln zwei intermediäre Stadien (T1, T2) durchlaufen, bevor sie zu naiven B-Zellen reifen (Loder et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass BAFF das Überleben von T2-B-Zellen *in vitro* fördert (Batten et al., 2000). Die Analyse BAFF-defizienter Mäuse bestätigte, dass in ihnen der Übergang von T1- zu T2-B-Zellen blockiert ist. Sie haben daher eine stark verminderte Anzahl an MZ-B-Zellen und peripheren B-Zellen und zeigen außerdem Defekte in der T-Zell-abhängigen und unabhängigen Antikörperantwort (Gross et al., 2001; Schiemann et al., 2001; Shulga-Morskaya et al., 2004).

2.4.2 BAFF in der Immunantwort

Zur Aktivierung einer Immunantwort kommt es erst, wenn reife B-Zellen durch Kontakt mit dem für sie spezifischen Antigen aktiviert wurden und daraufhin beginnen, sich in den Keimzentren der Milz und Lymphknoten zu teilen.
Sowohl $BAFF^{-/-}$- als auch A/WySnJ (Defekt im BAFF-R)-Mäuse können Keimzentren bilden, die allerdings nicht aufrechterhalten werden (Rahman et al., 2003; Shulga-Morskaya et al., 2004; Vora et al., 2003). $BAFF^{-/-}$-Mäuse waren nicht in der Lage das Netzwerk von FDCs aufrecht zu erhalten (Vora et al., 2003), welche unabdingbar für die Stabilität der Keimzentren sind, da sie den B-Zellen Antigen präsentieren und so zu deren Affinitätsreifung beitragen. In A/WySnJ- und $BAFF\text{-}R^{-/-}$-Mäusen war dieses Netzwerk intakt, jedoch ist die Instabilität der Keimzentren darin begründet, dass B-Zellen in Abwesenheit vom BAFF-R nicht in der Lage sind zu proliferieren und so ein Keimzentrum aufzubauen (Rahman et al., 2003). Der genaue Mechanismus, wie BAFF die Aufrechterhaltung der Integrität der Keimzentren beeinflusst ist allerdings noch unklar.

2.4.3 BAFF und Autoimmunerkrankungen

In gesunden Individuen hat der Pool an peripheren B-Lymphozyten eine konstante Größe. Die Kontrolle der Homöostase ist das Ergebnis einer Balance zwischen Produktion, Überleben und Proliferation dieser Zellen. Die häufigste Manifestation erhöhten Überlebens von B-Lymphozyten ist das Auftreten von autoreaktiven Zellen, die nicht eliminiert werden können. Aktivierung dieser autoreaktiven Zellen durch Selbstantigen induziert deren Proliferation, Infiltration in das betroffene Gewebe, Produktion pathogener Autoantikörper und daraus resultierende Inflammation.
Um die Rolle von BAFF besser zu verstehen, wurden von verschiedenen Gruppen BAFF-transgene (tg) Mäuse generiert. Mit dem Alter entwickeln BAFF-tg-Mäuse systemischen lupus erythematodes (SLE)-ähnliche Symptome. Sie produzieren

Autoantikörper, haben vergrösserte Keimzentren und entwickeln eine Autoimmunerkrankung mit Immunglobulinablagerungen in den Nieren und daraus resultierender Nephritis sowie Infiltration von B-Zellen in den Speicheldrüsen ähnlich dem Sjögren`s Syndrom (SS). Dieser autoimmune Phänotyp veranschaulicht, dass BAFF die negative Selektion autoreaktiver B-Zellen verhindert und/oder autoreaktive B-Zellen in der Peripherie aktiviert.

2.5 Physiologische Funktion von APRIL

APRIL wurde als proliferationsinduzierender Ligand benannt, da es das Wachstum von Tumorzellen stimuliert (Hahne et al., 1998; Rennert et al., 2000). Jedoch ist die Rolle von APRIL im Immunsystem noch nicht so klar wie für BAFF. APRIL wird von Monozyten, MΦ, DCs, Osteoklasten, B-Zellen, *in-vitro*-differenzierten Megakaryozyten und möglicherweise Stromazellen des Knochenmarks exprimiert (Bonci et al., 2004; Craxton et al., 2003; Kern et al., 2004; Litinskiy et al., 2002; Moreaux et al., 2005; O'Connor et al., 2004; Pradet-Balade et al., 2002; Shu et al., 1999; Stein et al., 2002).

Um die biologische Funktion von APRIL besser zu verstehen, wurden von verschiedenen Gruppen APRIL-knockout (ko) Mäuse generiert. In einer Studie war der Verlust von APRIL letal, wie sich jedoch später herausstellte, lag dies an der Deletion eines Gens, das nahe am APRIL-Lokus liegt (Mackay et al., 2003). So wurden von zwei weiteren Gruppen lebensfähige $APRIL^{-/-}$-Mäuse publiziert. Zeigten die Mäuse einer Gruppe keinen Phänotyp und eine normale T- und B-Zell-Entwicklung sowie Funktion (Varfolomeev et al., 2004), so weisen die $APRIL^{-/-}$-Mäuse der zweiten Gruppe eine erhöhte Anzahl an Keimzentren in der Milz nach Immunisierung mit einem T-zell-abhängigem Antigen auf, sowie eine verminderte Serum IgA-Immunantwort nach Immunisierung der Darmmukosa mit einem T-zell-unabhängigem Antigen (Castigli et al., 2004). So schlussfolgert die letzte Gruppe, dass APRIL T-Zell-abhängige Immunantworten unterdrückt und den Ig-Klassenwechsel zu IgA fördert. Es sind jedoch zusätzliche Studien notwendig, um den unterschiedlichen Phänotyp der APRIL ko Mäuse zu erklären.

Es ist noch unklar, ob APRIL von T-Zellen exprimiert wird. Wurde in einer Studie APRIL mRNA-Expression in aktivierten murinen T_H1- und T_H2-Zellen festgestellt (Stein et al., 2002), so konnte in humanen T_H1- und T_H2-Zellen kein APRIL-Transkript detektiert werden (Ng et al., 2004). Nach Stimulation von MΦ und DCs mit IFN-γ, IFN-α, LPS und CD40L steigt die APRIL Expression in diesen Zellen (Craxton et al., 2003; Litinskiy et al., 2002).
Geringe Mengen an APRIL-Transkript konnte in den meisten gesunden Geweben nachgewiesen werden (Kelly et al., 2000). Im Gegensatz dazu wurden hohe APRIL mRNA-Mengen in Tumorzellen, primärem Tumorgewebe und in Osteoklasten im KM von Patienten mit Multiplem Myelom (MM) beschrieben (Kelly et al., 2000; Moreaux et al., 2005; Rennert et al., 2000; Roth et al., 2001; Stein et al., 2002).
Neben BAFF ist auch APRIL in der Gelenkflüssigkeit von Arthritis-Patienten (Tan et

al., 2003) und in Seren von Patienten mit MM (Moreaux et al., 2004) erhöht. Es konnte gezeigt werden, das eine hohe APRIL-Expression das Überleben und die Proliferation von Krebszellen *in vitro* und *in vivo* fördert (Hahne et al., 1998). So wurden Glioblastomzelllinien durch Transfektion mit APRIL resistent gegenüber CD95- bzw. TRAIL-induzierter Apoptose, möglicherweise durch Hochregulation des antiapoptotischen Moleküls XIAP (engl.: X-linked inhibitor of apoptosis), welches Aktivierung von Caspasen inhibiert (Roth et al., 2001). Außerdem zeigen Jurkat T-Zellen und primäre Maus T- und B-Zellen aus der Milz (Yu et al., 2000) nach Zugabe von APRIL eine erhöhte Proliferation (Hahne et al., 1998), APRIL-transfizierte NIH3T3 Mausfibroblasten habe eine erhöhte Wachstumsrate in Nacktmäusen (Hahne et al., 1998), was darauf hindeutet, das APRIL einen Proliferations- und/oder Überlebensfaktor für diese Tumorzellen darstellt. Um die Rolle von APRIL bei der Tumorgenese zu ermitteln, muss allerdings untersucht werden, ob spontan auftretende Tumoren in Mäusen mit intaktem Immunsystem abhängig vom APRIL-Signal sind (Medema et al., 2003).
Tatsächlich überleben APRIL-tg T-Zellen (das APRIL transgen wird unter dem lck Promotor exprimiert) *in vitro* nach Entzug von Wachstumsfaktoren länger und zeigen eine erhöhte Proliferation und IL-2-Produktion nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors mit anti-CD3/anti-CD28 Antikörpern. Auch steigt die Überlebensrate APRIL-tg $V\beta8^+$-T-Zellen nach Injektion des Superantigens *Staphylokokkus* enterotoxin B (SEB), da SEB-reaktive T-Zellen normalerweise nach initialer Proliferation durch Apoptose sterben (Stein et al., 2002). Das erhöhte Überleben der APRIL-tg T-Zellen korrelierte mit der erhöhten Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 (Stein et al., 2002).

2.5.1 APRIL und B-Zellen

Im Gegensatz zu BAFF-tg Mäusen, in welchen durch Akkumulation peripherer B-Zellen Milz, Peyer'sche Plaques und Lymphknoten stark vergrössert sind, wurden in 3-4 Wochen jungen APRIL-tg Mäusen weder eine Vergrösserung der sekundären lymphoiden Organe noch eine B-Zell-Anreicherung in diesen Organen detektiert (Stein et al., 2002). Erst im Alter von 9-12 Monaten entwickeln APRIL-tg Mäuse Tumoren, ausgehend von peritonealen B1-B-Zellen (Planelles et al., 2004).
Im Gegensatz zur transgenen Expression von APRIL führt die *in vivo* Gabe von rekombinantem APRIL zu einer erhöhten Zahl an T-und B-Zellen in der Milz (Yu et al., 2000). Möglicherweise verhindern hohe Mengen an APRIL die BAFF/TACI-Interaktion und lenken BAFF mehr in Richtung des BAFF-Rezeptors, was die erhöhte Anzahl an B-Zellen erklären könnte (Varfolomeev et al., 2004). Jedoch scheinen die Gabe großer Mengen an rekombinantem APRIL und die beobachtete B-Zell-Akkumulation physiologisch nicht relevant zu sein, da APRIL in $BAFF^{-/-}$-Mäusen den Verlust des B-Zell-Überlebenssignals nicht kompensieren kann (Gross et al., 2001; Schiemann et al., 2001) und APRIL-tg Mäuse keine Akkumulation von B-Zellen aufweisen (Stein et al., 2002).
Die in APRIL-tg Mäuse verdoppelten Serum-IgM-Mengen, möglicherweise produziert

von B1-B-Zellen, korrelieren mit der Beobachtung, dass in TACI-defizienten Mäusen Serum-IgM erniedrigt ist, was darauf hindeutet, dass die APRIL-TACI-Interaktion für die IgM-Freisetzung notwendig ist. Weiterhin ist in diesen Mäusen die Typ-II-T-Zell-unabhängige Antikörperantwort erhöht (Stein et al., 2002). Da MZ-B-Zellen und B1-B Zellen Typ-II-T-Zell-unabhängige Immunantworten vermitteln, wird angenommen, dass DCs und peritoneale MΦ in der MZ Typ-II-Antigen für B-Zellen zurückhalten und gleichzeitig APRIL und BAFF sezernieren, wodurch in den B-Zellen der Ig-Klassenwechsel ausgelöst wird (Balazs et al., 2002).
Die Entdeckung, dass humane Plasmazellen BCMA und kaum mRNA für BAFF-R und TACI exprimieren und diese *in vitro* sowohl mit APRIL als auch BAFF stärker überleben, sowie das Überleben von KM-Plasmazellen abhängig von BCMA ist (O'Connor et al., 2004), deutet darauf hin, dass in diesen Zellen das BAFF/BAFF-R-System durch die APRIL-BCMA-Überlebensachse komplementiert oder sogar ersetzt werden kann (Avery et al., 2003; O'Connor et al., 2004). Interessanterweise zeigen Plasmazellen auch eine starke Expression von Syndekan-1, einem Proteoglykan, welches über seine GAG-Seitenketten mit APRIL interagieren könnte und möglicherweise die Akkumulation von APRIL auf Plasmazellen fördert bzw. Syndekan-1 nach APRIL-Bindung selbst in der Lage ist, ein Überlebenssignal in die Zelle zu leiten (Ingold et al., 2005).

2.5.2 APRIL, ein autokriner Wachstumsfaktor für Megakaryozyten

Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die endogene APRIL-Expression sowie die Bindung von rekombinantem APRIL auf der Zelloberfläche während der Differenzierung von $CD34^+$-Vorläuferzellen zu Megakaryozyten (MK) in einem *in vitro* Kultursystem ansteigt. TACI und BCMA wurden von diesen Zellen nicht exprimiert, was auf den *bis dato* noch unbekannten dritten APRIL-Rezeptor hinwies. Zugabe von TACI-Fc reduzierte die Proliferation der MK, da keine erhöhte Apoptoserate festgestellt werden konnte. Mit APRIL transduzierte $CD34^+$-Vorläuferzellen zeigten eine erhöhte MK-Expansion *in vitro* (Bonci et al., 2004). Diese Daten weisen darauf hin, dass APRIL einen autokrinen Wachstumsfaktor für MK darstellt (Bonci et al., 2004).

2.6 Von myeloiden Zellen produziertes APRIL und BAFF induziert Ig-Klassenwechsel in B-Zellen

Die Antikörperantwort auf Antigene kann T-zell-abhängig oder T-zell-unabhängig erfolgen. T-zell abhängige Antikörperanworten benötigen Stimulation von CD40 auf B-Zellen und DCs durch CD40L auf aktivierten T-Zellen. In T-zell unabhängigen Immunanworten werden B-Zellen von in der bakteriellen Zellwand enthaltenen

Lipopolysacchariden (=Typ-I-Antigen) oder repetitiven bakteriellen Polysacchariden und viralen Glykoproteinen (= Typ-II-Antigen) unabhängig von CD40L aktiviert.
Der Klassenwechsel (KW) von humanen $IgM^{+}IgD^{+}$ naiven B-Zellen zu IgG, IgA und IgE benötigt zwei Signale: Ein wichtiges Signal für die Initiierung des Ig-KW wird von Zytokinen wie IL-4, IL-10 und TGF-β geliefert. Das zweite Signal kommt von Mitgliedern der TNF-R-Familie, die auf B-Zellen exprimiert sind, wozu CD40, TACI und BAFF-R gehören. T-Zellen vermitteln nach Aktivierung über die Bindung von CD40L an CD40 auf B-Zellen und Zytokinen einen CD40-abhängigen bzw. T-zell abhängigen Immunglobulin (Ig)-KW. Der Ig-KW ist stark abhängig von CD40L, da in Patienten mit Hyper-IgM-Syndrom aufgrund der fehlenden Expression von CD40L auf aktivierten T-Zellen, die Bildung von IgG, IgA und IgE stark vermindert ist (Durandy, 2001). Jedoch sind virale Glykoproteine und bakterielle Zellwand-Polysaccharide in der Lage auch in Abwesenheit von CD40L den Ig-KW zu stimulieren (Stavnezer, 1996). Dies implizierte die Existenz weiterer Moleküle, neben CD40L, welche den KW auslösen können. Dieser CD40-unabhängige Ig-KW wird über APRIL und BAFF vermittelt (Castigli et al., 2005; Litinskiy et al., 2002). MZ-B-Zellen und B1-B-Zellen sind die Zellen, über welche u.a. T-Zell-unabhängige Antikörperantworten vermittelt werden (Martin et al., 2001). DCs im Blut fangen intakte Bakterien ein und transportieren diese in die MZ der Milz, wo die Differenzierung von MZ-B-Zellen zu Plasmazellen stattfindet und ihnen die DCs wichtige Überlebenssignale und Signale für den Ig-KW in Form von APRIL und BAFF liefern (Balazs et al., 2002). **Abbildung 5** veranschaulicht den APRIL und BAFF vermittelten Ig-KW von B-Zellen.

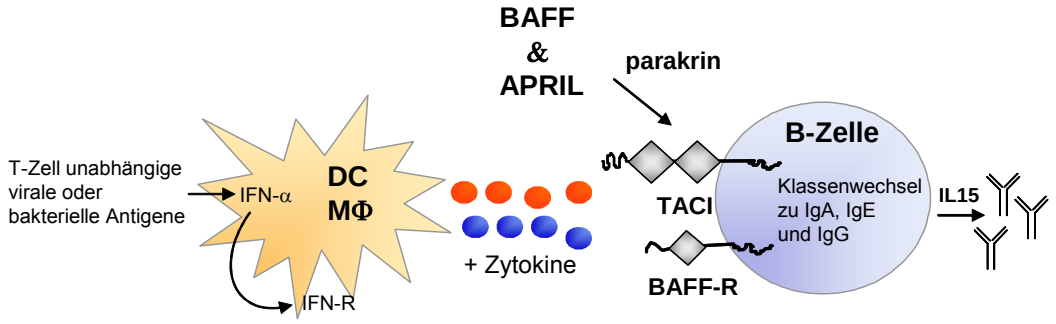


Abbildung 5: APRIL und BAFF vermitteln CD40 unabhängigen Immunglobulin-Klassenwechsel (nach Macpherson et al. 2002) Virale oder bakterielle Antigene, die von DCs oder MΦ aufgenommen werden, lösen die Bildung von IFN-α aus, wodurch die Expression von APRIL und BAFF verstärkt wird. APRIL und BAFF binden TACI. BAFF interagiert ausserdem noch mit dem BAFF-R auf B-Zellen. Sie lösen dadurch einen Ig-KW zu IgA oder IgG in Anwesenheit von TGF-β und IL-10 sowie mit Hilfe von IL4 zu IgE (nur über den BAFF-R in der Maus) aus. Der Ig-KW im Menschen wird möglicherweise nur über TACI induziert (Salzer U 2005). Über Signale vom BAFF-R werden nach BAFF Bindung neben dem Klassenwechsel auch Überlebensignale in die B-Zelle weitergeleitet. Sekretion der Antikörper benötigt zusätzlich Stimulation des B-Zell Rezeptors und von DCs produziertes IL-15.

So induzieren Kulturüberstände von mit Streptococcus pneumoniae behandelten DCs die Differenzierung von B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen, welche durch TACI-Fc blockiert wurde (Balazs et al., 2002). Ebenso induzieren

Kulturüberstände von mit IFN-γ stimulierten Monozyten und von mit IFN-α behandelten DCs den Ig-KW zu IgG und IgA, der durch BCMA-Fc und TACI-Fc blockiert werden konnte (Balazs et al., 2002). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass DCs wichtig für die Induktion T-Zell-unabhängiger Immunantworten sind, indem sie durch Freisetzung von APRIL und BAFF die Differenzierung von B-Zellen zu Ig-sezernierenden Plasmazellen fördern. Ob APRIL und/oder BAFF neben ihrer parakrinen Wirkung v.a. auf B-Zellen auch autokrin auf myeloide Zellen wirken, ist nicht bekannt.

Proteoglykane sind Bestandteil der extrazellulären Matrix (EZM) und sowohl TACI als auch APRIL binden GAG-Ketten von Proteoglykanen. Um die Wechselwirkung von TACI und APRIL mit Proteoglykanen der EZM zu verstehen, soll im Folgenden der Aufbau und die Funktion der EZM erläutert werden. Weiterhin wird näher auf die Zusammensetzung von Proteoglykanen auf myeloiden Zellen, die Rolle von Proteoglykanen bei der Zell-Matrix- bzw. Zell-Zell-Adhäsion eingegangen und die Interaktion von APRIL und TACI mit Proteoglykanen näher beschrieben.

3 Die extrazelluläre Matrix (EZM)

Die EZM stellt die Umgebung dar, in welcher eine Zelle lebt. Sie liefert das Substrat für die Verankerung und Interaktion von Zellen und hat somit Gerüstfunktion für ein Gewebe. Sie koordiniert Migration, Adhäsion und Invasion von Zellen während der Embryogenese, der Wundheilung, der Nidation des befruchteten Eies und der Einwanderung von Immunzellen in das Entzündungsgewebe. Neben diesen Gerüstfunktionen überträgt die EZM Signale aus der Umwelt in die Zelle und ist mitverantwortlich für die Proliferation, die Differenzierung und den Tod von Zellen (Zamir et al., 2000). Das Leben einer Zelle beruht daher auf einem intensiven Informationsaustausch mit der EZM. So unterstützt die EZM die Entwicklung von Immunzellen z.B. haftet sich die pro-B-Zelle über ihren CD44-Rezeptor (CD44v3), welcher eine HBD besitzt an Hyaluronat des Knochenmarkstromas und kann so mit anderen Faktoren im Stroma interagieren die eine weitere Differenzierung ermöglichen (Löffler Petrides 6.Aufl 1998). Das komplexe Netzwerk der von der Zelle sezernierten EZM-Komponenten variiert in der Komposition und Organisation abhängig von den Erfordernissen und der Funktion eines Gewebes. So verleiht die EZM Knochen, Bändern und Zähnen ihre starke Zugfestigkeit, ermöglicht die Abfederung von Kräften, die auf die Gelenke wirken und vermittelt Adhäsion von Zellen in den meisten Geweben (Lodish 5.Aufl 2004).

3.1 Aufbau der EZM

Auch wenn die EZM verschiedene Formen in unterschiedlichen Geweben annehmen kann, besteht sie nur aus drei Klassen von Makromolekülen. Dazu gehören erstens Glykosaminoglykane, welche Polysaccharidseitenketten sich wiederholender Disaccharid-Einheiten beinhalten, die normalerweise kovalent an ein Protein gebunden vorliegen und die Familie der Proteoglykane formen. Die zweite und dritte Klasse enthalten sowohl Bindestellen füreinander, als auch für spezielle Zelloberflächenrezeptoren, den Integrinen und verbinden so die EZM mit dem Zellinneren. Die zweite Klasse besteht aus Kollagenfasern, welche Geweben und Organen mechanische Stabilität verleihen und Elastin, welches die Elastizität verschiedener Gewebe vermittelt. Die dritte Klasse setzt sich aus multiadhäsiven Glykoproteinen wie Fibronektin und Laminin zusammen, die den Kontakt zu den im Bindegewebe eingelagerten Zellen vermitteln und an der gerichteten Zellbewegung (Chemotaxis) beteiligt sind.
Fibronektin und Laminin haben separate Domänen, die Kollagen, GAGs und Integrine binden können. So fördert Fibronektin in der Matrix vom Bindegewebe die Anlagerung von Fibroblasten, während Laminin in der Basalmembran die Anlagerung von Epithelzellen durch Bindung an die extrazellulären Domänen von Integrinen bewirkt (Löffler Petrides 6.Aufl 1998).

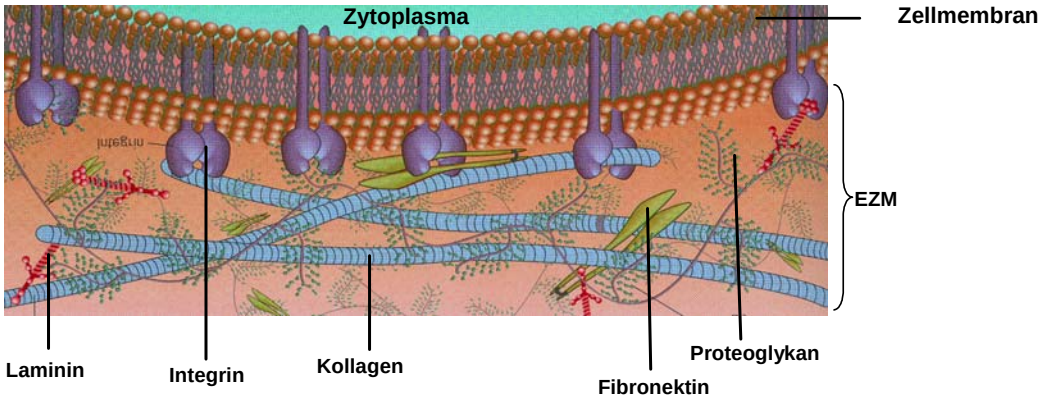


Abbildung 6: Struktur des Protein-Netzwerks der extrazellulären Matrix einer eukaryontischen Zellen

3.2 Struktur und Funktion von EZM-Proteoglykanen

Proteoglykane bestehen aus einem Anker-Protein, welches substituiert ist mit linearen polysulfatierten und daher stark negativ geladenen GAG-Seitenketten. Während der Proteinanteil die Lokalisation des Proteoglykane an der Zelloberfläche oder in der EZM bestimmt, vermittelt die GAG-Komponente Interaktionen mit einer Vielzahl

extrazellulärer Liganden wie Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmolekülen (Tumova et al., 2000). Diese polyanionischen Makromoleküle umgeben fast alle Zellen in Metazoen. Die spezifische Abfolge sufatierter und nicht-sulfatierter Zucker in den GAG-Seitenketten liefert die Erkennungssequenz für viele Proteine. Es können vier Klassen von GAGs unterschieden werden, die sich aufgrund ihrer Monosaccharidzusammensetzung, ihrer Sulfatierung und Epimerisierung voneinander unterscheiden. Dazu gehören: Chondroitinsulfat (CS), Heparansulfat (HS), Dermatansulfat (DS) und Keratansulfat (KS). Hyaluronsäure (HA) ist ebenfalls ein GAG, allerdings sind die Zucker nicht sulfatiert, weshalb HA eine verminderte negative Ladungsdichte aufweist.
Da die Biosynthese der GAG-Ketten nicht durch eine Vorlage gesteuert wird, die Reaktionen nicht komplett ausgeführt werden und Zellen ein unterschiedliches Repertoir GAG-Seitenketten modifizierender Enzyme besitzen, zeigen GAGs eine hohe Sequenzvariabilität. Diese Variabilität ist nicht zufällig, sondern ermöglicht den GAG-Ketten spezifisch unterschiedliche Liganden zu erkennen (Gallagher, 2001). In **Abbildung 7** ist Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) schematisch dargestellt.

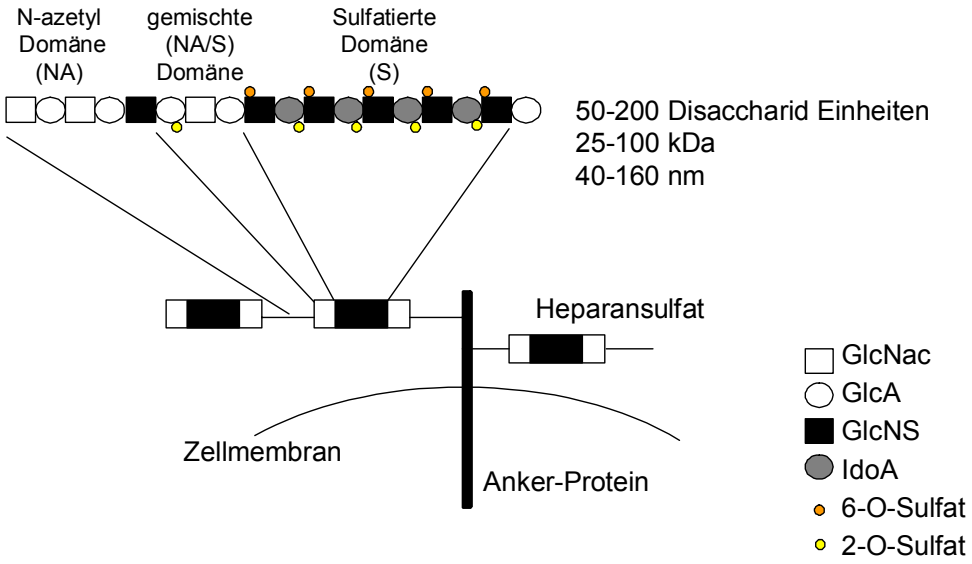


Abbildung 7: Schematische Darstellung von Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) (adaptiert von Tumova et al. 2000) An das Anker-Protein sind zwei oder mehr HS-Ketten kovalent gebunden. Diese GAG-Seitenketten bestehen aus Regionen, die stark sulfatiert (S-Domänen), aus Sequenzen, die N-Azetyliert und sulfatiert (NA/S-Domäne) oder nicht modifiert sind. Die GAG-Seitenketten werden als nicht-sulfatierte Disaccharid-Vorläufer synthetisiert und darauffolgend im Golgi durch N-Deazetylierung und Transfer von Sulfat modifiziert. Bestimmte Sulfatierungsmuster werden durch 2-O, 3-O und 6-O Sulfotransferasen eingefügt, wodurch eine Vielzahl von Bindestellen für EZM Proteine und lösliche Faktoren generiert werden. Die Biosynthese der GAG-Seitenketten kann in drei Phasen eingeteilt werden, hier dargestellt am Beispiel von Heparansulfat/HS: 1.) Ketteninitiierung: Hier wird das Tetrasaccharid Xylose-Galaktose-Galaktose-Glukuronsäure an die Aminosäure Serin im Anker-Protein kovalent angelagert. 2.) Polymerisation: Abwechselndes Anfügen von Glucuronsäure (GlcA) und N-Azetylglukosamin (GlcNac) an die terminale Glukuronsäure des Tetrasaccharides. 3.) Modifikationen: Während der Synthese der 50-200 Disaccharid Einheiten werden einige Bereiche durch Deazetylierung, Sulfatierung und Epimersierung von GlcA zu Iduronsäure (IdoA) modifiziert und dadurch stark negativ geladene sulfatierte S-Domänen generiert. Das Endprodukt ist eine HS-Seitenkette mit einer für die Zelle spezifischen Abfolge von N- und O-sulfatierten Zuckerresten, die durch nicht modifizierte Bereiche separiert sind. Diese Domänenorganisation ist unabhängig vom Anker-Protein (Park et al., 2000).

Die Menge der Zelloberflächen-Proteoglykane wird durch Synthese der Anker-Proteine kontrolliert. Membranassoziierte Proteoglykane haben zumeist HS-Seitenketten gebunden. Proteoglykane, deren Anker-Protein transmembranös vorliegt, gehören zur Familie der Syndekane (Syndekan 1-4), während Glypikan (Glypikan 1-6), ein weiteres Zelloberflächen-Proteoglykan über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker mit der Zelloberfläche verbunden ist (Esko et al., 2001). Syndekane und Glypikane sind die dominierenden Zelloberflächen-Proteoglykane. Drei weitere Multidomänen-Proteoglykane sind vor allem in der Basalmembran lokalisiert. Dazu gehören Perlekan, Agrin und Kollagen, welche vorwiegend als Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) exprimiert werden, aber auch als HSPG/Chondroitinsulfat-Proteoglykan (CSPG)- bzw. HSPG/Dermatansulfat-Proteoglykan (DSPG)-Hypridmoleküle vorliegen können (Couchman et al., 1996; Couchman and Woods, 1996).

Proteoglykan (PG)	Expression/Vorkommen	GAG-Seitenketten
Syndekan 1-4	Transmembran PG; Syndekan 1 (Epithelzellen, Endothelzellen); Syndekan 2 (Fibroblasten,Zellen mesodermalen und ektodermalen Ursprungs, kaum auf Epithelzellen); Syndekan 3 (neuronale Zellen) Syndekan 4 (ubiquitär). Die meisten Zellen exprimieren multiple Syndekane	3-6 GAG-Ketten HS und CS
Glypikan 1-6	GPI verankert, ubiquitäre Expression	3-6 GAG-Ketten HS
Perlekan	EZM PG; exprimiert in Basalmembran der meisten Gewebe; besteht aus 5 Domänen; interagiert mit Integrinen, Lamininen	3 GAG-Ketten HS und CS/DS
Agrin	EZM PG; besteht aus verschiedenen Domänen mit Bindestellen für Integrine, Laminine; exprimiert in Basalmembran der meisten Gewebe, im Gehirn und an Neuromuskulären Junktionen: Motorneuron, Skelettmuskel; Thymozyten, Splenozyten, Lunge, Niere.	3 GAG-Ketten HS und CS
Kollagen IX,XII,XIV,XVIII	EZM PG; besteht aus verschiedenen Domänen mit Bindestellen für Integrine, Laminine; v.a. exprimiert in der Basalmembran von Endothelzellen, Niere	HS
Weitere ~5% der GAG-Ketten enthaltenen PG: **- Spleissvariante von CD44 (CD44v3-10/epican)** **- TGF-ß-Rezeptor/betaglykan** **- testican** **- neuronale PG: neuroglykan, phosphacan, brevican**		

Tabelle 3: Überblick über Zelloberflächen-Proteoglykane, Expression/Vorkommen und Art sowie Anzahl der GAG-Seitenketten (Handel et al., 2005; Wegrowski and Maquart, 2004)

Abhängig von der Länge, Struktur und der Abfolge der S-Domänen binden eine Vielzahl löslicher (Wachstumsfaktoren, Zytokine, Chemokine) und unlöslicher (Komponenten der EZM wie Kollagen, Fibronektin, Laminin) extrazellulärer Liganden GAG-Seitenketten von Proteoglykanen (Esko and Selleck, 2002). Basierend auf einen Vergleich heparinbindender (HB) Sequenzen verschiedener Proteine wurden bestimmte HB-Konsensus-Sequenzen, bestehend aus einer linearen Abfolge basischer AS, vorgeschlagen: X**BBB**XX**B**X und X**BB**X**B**X (B= basische AS, wie Arginin oder Lysin und X= irgendeine AS) (Cardin and Weintraub, 1989). Allerdings kann das HB-Epitop auch durch die räumliche Anordnung basischer AS im gefalteten Protein gebildet werden (Hileman et al., 1998). Weiterhin wurde vorgeschlagen, dass zwei basische AS, die 20Å entfernt und sich in einer α-Helix oder einem β-Faltblatt gegenüberliegen, ein HB-Epitop darstellen (Margalit et al., 1993).

Die Bindung von Proteinen an Zelloberflächen-HSPGs reguliert die Aktivität von Wachstumsfaktoren, EZM-Komponenten, Zytokinen, Chemokinen und von Antikoagulationsfaktoren, beeinflusst die Interaktion Viren/Bakterien-Wirt und spielt eine Rolle im Lipoproteinmetabolismus. So ermöglichen HSPGs die biologische Aktivität gebundener Liganden, allerdings werden gebundene Liganden auch internalisiert, weshalb HSPGs auch am Abbau dieser Liganden beteiligt sind. So wird die Affinität von Proteoglykanen für einen Liganden durch die Feinstruktur der GAG-Seitenketten bestimmt, wohingegen das Anker-Protein die biologische Wirkung der Interaktion, wie die Freisetzung der HSPGs von der Plasmamembran (Syndekan, Glypikan, Perlekan), die intrazelluläre Signalweiterleitung (Syndekan), die lysosomale Degradation (Syndekan, Perlekan) oder das Recycling gebundener Liganden (Glypikan, Syndekan) reguliert (Belting, 2003). Im Folgenden sollen wichtige Funktionen von HSPGs aufgeführt werden:

- Die HS-Ketten liefern die Oberfläche an welcher Liganden und Rezeptoren mit erhöhter Häufigkeit interagieren als in Lösung, ein Effekt der auf die **Reduktion der Dimensionalität** zurückzuführen ist (Schlessinger et al., 1995), und sie fungieren als **Ko-Rezeptor** .
- Sie **erhöhen die Halbwertszeit** und damit die Stabilität von Liganden, indem sie diese vor Degradation durch proteolytische Enzyme schützen.
- Sie bewirken eine **Oligomerisierung** und **Veränderung der Konformation** gebunderner Liganden und erhöhen so deren Aktivität (so erkennt z.B. Antithrombin III eine spezifische Pentasaccharidsequenz. Diese Interaktion resultiert in einer Konformationsänderung im Antithrombin wodurch dessen Affinität für Thrombin steigt (Rosenberg et al., 1997).
- Während der Ontogenese ermöglichen HSPGs die **Formierung von Morphogen-Gradienten**, indem sie die Diffusion, Proteolyse und Endozytose gebundener Liganden beeinflussen (Lander et al., 2002). Eine ähnliche Funktion wird bei der Bildung von **Chemokin-Gradienten** in Entzündungsprozessen angenommen. So binden HSPGs auf der dem Lumen abgewandten Oberfläche des Endothels proinflammatorische Chemokine, transportieren diese auf die luminale Seite (Transzytose) und präsentieren sie den Leukozyten (Wang et al., 2005).
- HSPGs auf der Zelloberfläche und der Basalmembran werden mit einer Halbwertszeit von $t_{½}$=4-24 h internalisiert, degradiert und partiell wiederverwertet (Beavan et al., 1989). Es wird daher angenommen, dass ein großer Teil der an HSPGs gebundenen Liganden auf diesem Weg **degradiert** wird. So sind Perlekan und Syndekan an der **Internalisierung** von Lipoproteinen beteiligt (Fuki et al., 1997; Fuki et al., 2000b). Ebenso wird intravenös injiziertes bFGF HSPG-abhängig internalisiert (Colin et al., 1999). Auch nutzen Viren (HSV-glykoprotein-D, HIV-Tat) (Shukla and Spear, 2001; Tyagi et al., 2001) und Mikroben (Neisseria gonorrhoeae, Plasmodium falciparum) (Dehio et al., 1998; Schofield and Grau, 2005) HSPGs, um in die Wirtszellen einzudringen. Es wird angenommen, dass die Internalisierung von Syndekan durch Ligandenbindung um ein Vielfaches gesteigert werden kann

(Fuki et al., 1997).

- Oligomerisierung von Syndekanen auf der Zelloberfläche durch Antikörper, lösliche Liganden wie FGF-2 und EZM-Komponenten wie Fibronektin, Laminin und Kollagen führt zu deren Immobilisierung und bewirkt eine Interaktion der zytoplasmatischen Domäne der Syndekane via Adapterproteine mit dem Aktinzytoskelett und Mikrofilamenten. Die dadurch ausgelöste veränderte Organisation des Zytoskeletts verstärkt die Anlagerung von Zellen an die EZM (**Zell-Matrix Adhäsion**) und an benachbarte Zellen (**Zell-Zell Adhäsion**). So aggregieren Syndekan-1 oder -4 überexprimierende Zellen mit benachbarten Zellen, die HB-Liganden exprimieren. (Stanley et al., 1995; Woods et al., 1998).
- Die Ektodomänen der Zelloberflächen-HSPGs werden durch **Proteolyse** in die extrazelluläre Umgebung freigesetzt und sind sowohl in der Zellkultur als auch in Körperflüssigkeiten detektierbar (Bernfield et al., 1999). Das freigesetzte Proteoglykan erhält dabei die Bindungseigenschaften für die basischen Liganden und kann so als Agonist (indem der gebundene Ligand Rezeptoren auf benachbarten Zellen bindet) oder Antagonist (indem die Ligandenbindung an zelluläre Proteoglykane inhibiert wird) wirken.

3.3 Komposition und Funktion von Proteoglykanen in myeloiden Zellen

Humane Monozyten exprimieren nach Stimulation mit LPS sowohl HSPGs als auch CSPGs (Edwards et al., 1995a; Kolset et al., 1990; Uhlin-Hansen et al., 1989) und in der *in-vitro*-Kultur von Monozyten und MΦ sind Zelloberflächenproteoglykane im Kulturüberstand nachweisbar (Uhlin-Hansen and Kolset, 1988). Daten einer weiteren Studie zeigen, das Adhäsion und LPS-Stimulation von Monozyten und MΦ die Freisetzung von Proteoglykanen von der Zelloberfläche bewirken (Uhlin-Hansen et al., 1993).

Während der *in-vitro*-Differenzierung von humanen primären Monozyten zu MΦ wird die Zelloberflächenexpression von HS induziert und diese durch Zugabe von LPS oder des inflammatorischen Zytokins IL1-β noch gesteigert. Als Anker-Protein konnte Syndekan-2 identifiziert werden. So exprimieren direkt aus dem Blut isolierte humane Monozyten kein Syndekan, ein Hinweis auf die Induzierbarkeit dieses Proteoglykans im Entzündungsgewebe *in vivo* (Clasper et al., 1999). Monozyten exprimieren eine Vielzahl heparinbindender Proteine wie FGF-2, VEGF und HB-EGF. Interessanterweise konnte zwar eine Bindung von rekombinantem FGF-2, VEGF und HB-EGF auf *in-vitro*-generierten MΦ festgestellt werden, allerdings keine Interaktion mit den GAG-bindenden Proteinen FGF-1, IL-8 oder RANTES, ein Hinweis auf die Selektivität der an Syndekan gebundenen GAGs auf MΦ für bestimmte Wachstumsfaktoren (Clasper et al., 1999).

Es wird angenommen, dass von Monozyten, MΦ und DCs exprimierte Proteoglykane die Aktivität endogener Wachstumsfaktoren reguliert und nur an Proteoglykane gebundene Liganden eine produktive Bindung mit ihrem jeweiligen Rezeptor auf

benachbarten Zellen *in vivo* eingehen (Clasper et al., 1999).
Zelloberflächenproteoglykane partizipieren im Katabolismus vieler Liganden. So führt das durch Ligandenbindung an Syndekan vermittelte Clustering zur Internalisierung dieses Komplexes innerhalb von einer Stunde und zu einer fast kompletten Degradation innerhalb von vier Stunden (Fuki et al., 1997). Auch die Aufnahme von Lipoproteinen in MΦ scheint über deren Zelloberflächen-Proteoglykane vermittelt zu werden (Halvorsen et al., 1998). Dies deutet darauf hin, dass Proteoglykane in myeloiden Zellen die an sie gebundenen Liganden internalisieren können.
Im Gegensatz dazu wird das HSPG Perlekan, welches sezerniert wird und durch Bindung an Integrine an der Zelloberfläche adhäriert, konstitutiv internalisiert, ohne dass Ligandenbindung involviert ist. So ist die Halbwertszeit der Internalisierung eines an Perlekan gebundenen Liganden identisch mit der von Perlekan selbst ($t_{½}$=6 h) und die lysosmale Degradation eines gebundenen Liganden mit einer $t_{½}$=18 h im Vergleich zur vollständigen Degradation eines an Syndekan gebunden Liganden innerhalb von 4 h sehr langsam (Fuki et al., 2000a). Dies bedeutet, dass die Verfügbarkeit eines heparinbindenden Liganden auch durch das zelltypspezifische Repertoire an Proteoglykanen bedingt wird.

3.4 Syndekane als Vermittler von Zelladhäsion und Überleben

Lange Zeit galten Integrine als Haupvermittler von Zell-Zell- und Zell-EZM-Adhäsion. Heute ist allerdings klar, dass eine weitere Klasse von Zelloberflächen-Proteinen, die Proteoglykane, an der Vermittlung von Adhäsionsprozessen beteiligt ist. Adhäsive Interaktionen zwischen Zellen und Proteinen der EZM regulieren eine Vielzahl biologischer Prozesse, die assoziiert sind mit Veränderungen der Zellmorphologie, Proliferation, Differenzierung, Migration und dem Überleben von Zellen (Peterson et al., 2005).
Als integrale Membranproteine können Syndekane Adhäsionsprozesse an heparinbindende Proteine wie EZM-Proteine und heparinbindende Wachstumsfaktoren vermitteln (Makabe et al., 1990). So regulieren Syndekane die Anlagerung von Zellen an die EZM von Endothelzellen und ermöglichen dadurch die Transmigration und Invasion sowohl normaler als auch transformierter Zellen (Bernfield et al., 1999). Viele EZM-Proteine (Fibronektin, Kollagen, Laminin) enthalten multiple Bindemotive, die sowohl von Integrinen als auch von Proteoglykanen erkannt werden (Beauvais and Rapraeger, 2004). Es wird angenommen, dass Syndekane als Ko-Rezeptoren mit Integrinen und EZM-Proteinen wie Fibronektin (Fn) Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion vermitteln (Beauvais et al., 2004).
Ligandenbindung an Syndekane induziert deren Clustering, welches eine Signalkaskade einleitet, die zur Veränderung der zellulären Organisation der Mikrofilamente führt und Adhäsion sowie Migration auslösen kann (Woods et al., 1998). Die konservierten zytoplasmatischen Domänen der Syndekane enthalten Bindestellen für Proteine, die die Assoziation mit Mikrofilamenten und dem Aktinzytoskelett vermitteln und dadurch die Zellmorphologie regulieren, allerdings werden auch Überlebenssignale durch die

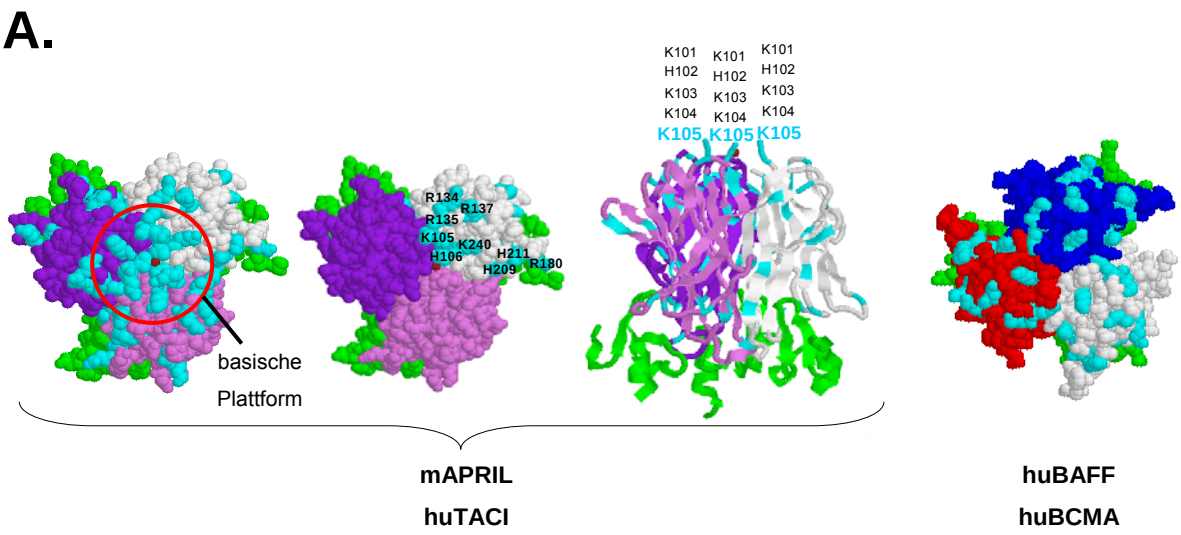
Bindung von Syndekanen vermittelt (Beauvais and Rapraeger, 2004; Greene et al., 2003; Zimmermann and David, 1999).

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass nicht nur die Integrinbindedomäne, sondern auch die Proteoglykan-/ bzw. Heparinbindedomäne (HBD) für die Anlagerung von Zellen an Fibronektin (Fn) notwendig ist (Woods and Couchman, 1994). Immobilisierte synthetische Peptide der HBD von Fn führen zur Anlagerung von neuronalen Zellen (Haugen et al., 1990), Lymphozyten (Jalkanen et al., 1992), humanen embyronalen Fibroblasten (Woods et al., 1993), Melanomzellen (Humphries et al., 1986) und Osteoblasten aus dem Knochenmark (Dalton et al., 1995). Basische Peptide ahmen HBD von Proteinen nach und fördern nach Immobilisierung ebenfalls die Zelladhäsion, allerdings sind sie nicht in der Lage fokale Kontakte in adhärierten Zellen zu formen (Massia and Hubbell, 1992). Um eine vollständige Adhäsion mit der Ausbildung von fokalen Kontakten zu erreichen sind sowohl die Integrinbindedomäne, als auch die HBD in Fn notwendig (Hall et al., 1988; Woods and Couchman, 1996), ein Hinweis auf die Notwendigkeit beider Signalwege für eine stabile Adhäsion. Interessanterweise konnte die Adhäsion von Monozyten auf Fn durch Zugabe von RGD-Peptid (bindet Integrin) nicht vollständig blockiert werden. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die HBD neben der Integrinbindedomäne für die Adhäsion von Monozyten auf Fn notwendig ist (Kreuzer et al., 1996).

3.5 APRIL bindet Glykosaminoglykane der EZM über seine Heparinbindedomäne

Rekombinantes APRIL, jedoch nicht BAFF, bindet verschiedene nicht-hämatopoietische Zelllinien, die keine detektierbare mRNA für TACI und BCMA exprimieren, was darauf hinweist, dass ein zusätzlicher APRIL-spezifischer Rezeptor existiert (Rennert et al., 2000). Die Bindung an diesen Rezeptor ist vermindert, wenn APRIL durch BCMA-Fc depletiert wird, allerdings wird die APRIL-Bindung im Komplex mit BCMA-Fc nicht inhibiert (Ingold et al., 2005). Dies zeigt, dass der APRIL- spezifische Rezeptor APRIL mit höherer Affinität oder an einer anderen Bindestelle bindet als BCMA (Rennert et al., 2000).
Sowohl APRIL als auch BAFF werden von der Zelle durch proteolytische Spaltung an einer Furin-Konsensus-Sequenz freigesetzt. Dadurch bleibt in der prozessierten Form von APRIL und BAFF eine kurze N-terminale Sequenz vor der TNF-Homologiedomäne (THD) bestehen. Im Fall von APRIL beinhaltet diese eine Abfolge basischer, positiv geladener AS ($\mathbf{K}^{110}Q^{111}\mathbf{K}^{112}\mathbf{K}^{113}Q^{114}\mathbf{H}^{115}$), die die APRIL Bindung an negativ geladene sulfatierte Glykosaminoglykane (GAGs) der extrazellulären Matrix (EZM) vermittelt (Hendriks et al., 2005; Ingold et al., 2005). Aufgrund der Fähigkeit dieser basischen Domäne negativ geladene Zucker zu binden, wird diese Domäne auch Heparinbindedomäne (HBD) genannt. Diese HBD tritt sowohl in humanem als auch in murinem APRIL auf. **Abbildung 8** veranschaulicht die Lage der basischen

Aminosäuren in der Kristallstruktur von murinem APRIL (da humanes im Gegensatz zu murinem APRIL dazu neigt Aggregate zu bilden wurde murines APRIL kristallisiert, Wallweber et al., 2004) komplexiert mit humanem TACI CRD2 (PDB:1xu1) und humanem BAFF komplexiert mit humanem BCMA (PDB:1OQD) und zeigt deutlich, das in APRIL im Gegensatz zu BAFF am N-Terminus eine Art Plattform basischer Aminosäuren lokalisiert ist, die ausserhalb der TACI-BCMA-Rezeptorbindedomäne liegt (siehe auch **Abbildung 3**).



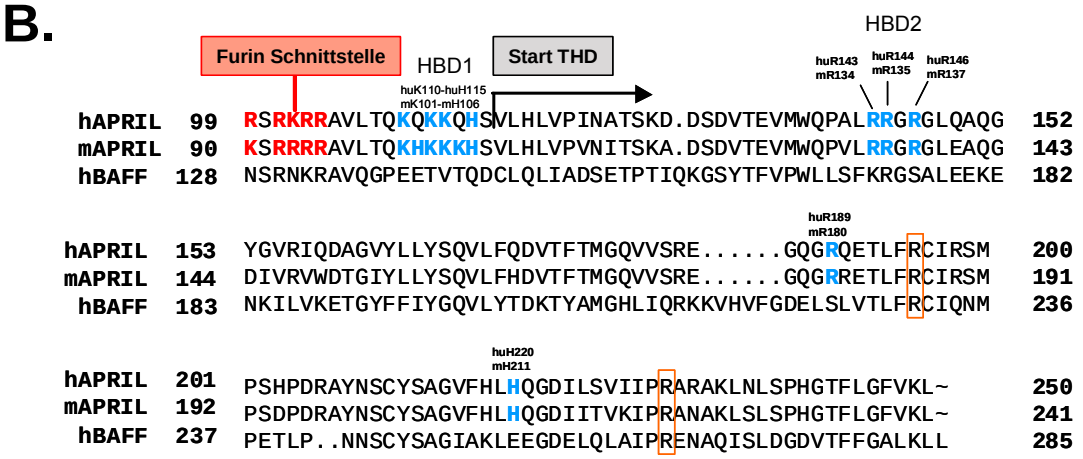


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Lokalisation basischer Heparinbindedomänen in APRIL im Vergleich zu BAFF (Kristallstrukturen aus der Protein Data Bank www.pdb.com verändert mit dem Programm CHIME).

(A) In der Kristallstruktur von mAPRIL komplexiert mit huTACI CRD2 (PDB:1xu1) ist APRIL als Trimer in den Farben weiss, lila und violett dargestellt und liegt in der Ebene vor dem Rezeptor TACI welcher grün eingefärbt ist. In der Kristallstruktur von huBAFF komplexiert mit huBCMA (PDB:1OQD) ist BAFF als Trimer in den Farben weiss, blau, und rot und BCMA in grün dargestellt. In hellblau sind sowohl in APRIL als auch in BAFF die positiv geladenen basischen Aminosäuren (Arg=R, Lysin=K, Histidin=H) veranschaulicht, wobei in der Kristallstrukur von mAPRIL am C-Terminus vier basische Aminosäuren (K101-K104) fehlen und daher zur Dokumentation dem Faltblattmodell von mAPRIL/huTACI hinzugefügt wurden. Es soll verdeutlicht werden, das nur in dem Kalottenmodell von APRIL jedoch nicht in dem von BAFF die positiv geladenen basischen Aminosäuren eine Art Plattform bilden, welche APRIL ermöglicht negativ geladene GAG Seitenketten von Proteoglykanen auf der Zelloberfläche zu binden und gleichzeitig den Rezeptor TACI an der gegenüberliegenden Seite der basischen Plattform.

(B) Vergleich der linearen Aminosäuresequenz von huAPRIL, mAPRIL und huBAFF. In rot ist die Furin-Schnittstelle gekennzeichnet und mit dem Pfeil der Beginn der TNF-Homologiedomäne (THD). Zwischen der Furin-Schnittstelle und der THD liegen nur in APRIL positiv geladene basische Aminosäuren welche blau unterlegt und hier als HBD1 bezeichnet sind. Weitere positiv geladene basische Aminosäuren in APRIL, die an der Oberfläche des APRIL-Proteins lokalisiert sind, innerhalb der THD liegen und möglicherweise auch zu Bindung an GAGs beitragen sind ebenfalls in blau hervorgehoben (HBD2 und R189, H220). In HBD1 und HBD2 sind die AS lokalisiert, die die basische Plattform in der Kristallstruktur von APRIL (siehe (A)) ausmachen. Die orangen Kästchen markieren die AS die in APRIL und BAFF die positive Oberflächenladung an der Rezeptorbindestelle bewirken.

So verhindern negativ geladene Zucker wie Heparin nach Präinkubation mit APRIL zwar die Bindung von APRIL auf Zellen, die kein TACI und/oder BCMA exprimieren, die Bindung von APRIL auf TACI- und/oder BCMA-exprimierenden Zellen wird durch diese Präinkubation jedoch nur minimal inhibiert (Hendriks et al., 2005; Ingold et al., 2005). Dies zeigt deutlich, dass APRIL eine zweiseitige Rezeptorspezifität hat, die unterschiedliche Regionen im APRIL-Protein einnehmen.
Neben der positiv geladenen basischen N-terminalen HBD gibt es noch weitere basische Aminosäuren im APRIL-Protein, die ebenfalls zur Bindung von APRIL an EZM-GAGs beitragen und deren Mutation die APRIL-Bindung an Heparin stark reduziert (Ingold et al., 2005). Zwar liegen diese basischen AS innerhalb der THD, jedoch ausserhalb der TACI- und BCMA-Bindestellen, so dass Mutationen dieser Aminosäuren nicht mit der Rezeptorbindung interferieren (Ingold et al., 2005).
Heparin besteht aus alternierenden Resten von Glucuronsäure (oder dessen 5'-Epimer Iduronsäure) und N-Azetylglukosamin, die mono- oder di-sulfatiert sein können und somit stark negativ geladen sind. Da Heparin im menschlichen Körper in Mastzellen lokalisiert ist und als lösliches Protein vorkommt, ist es unwahrscheinlich, dass es den Bindungspartner für endogenes APRIL darstellt. Allerdings stellen heparin-ähnliche GAGs (v.a. Heparansulfat) als Bestandteil von membrangebundenen Proteoglykanen mögliche Bindungspartner für APRIL dar. Hinweise darauf gaben Experimente, in welchen die Zelloberflächensulfatierung der GAGs auf HEK293T-Zellen inhibiert wurde (Ingold et al., 2005) und HSPGs durch das Enzym Heparitinase verdaut wurden (Hendriks et al., 2005). Diese Experimente machen auch deutlich, dass die APRIL-Bindung durch GAG-Seitenketten der Proteoglykane vermittelt wird, und APRIL nicht mit dem Polypeptid-Anteil der Proteoglykane wie z.B. Syndekan oder Glypikan direkt interagiert (Ingold et al., 2005).

3.6 Glykosaminoglykane als Oligomerisierungs-Motiv für APRIL

Die Mitglieder der TNF-Familie, auch APRIL und BAFF, liegen als Homotrimere vor, die in der Lage sind, ihren spezifischen Rezeptor zu binden. Allerdings reicht dieses oft nicht aus, um ein produktives Signal in die Zelle weiterzuleiten. Für verschiedene Liganden der TNF-Familie wie CD95L und CD40L ist beschrieben, dass Oligomerisierung für die Induktion einer biologischen Antwort notwendig ist (Holler et al., 2003; Schneider et al., 1998). Es wird außerdem angenommen, dass durch Kreuzvernetzung trimerer Liganden die membrangebundene Form des Liganden nachgeahmt wird. So ist für die Ko-stimulation von B-Zellen Kreuzvernetzung von APRIL notwendig (Ingold et al., 2005). Es ist daher möglich, dass von Zellen sezernierte APRIL, durch Bindung an Proteoglykane über seine HBD kreuzvernetzt wird und erst dadurch die volle Aktivität erhält. Allerdings konnte die Kreuzvernetzung von APRIL mit Heparin (welches die GAG-Seitenketten von Proteoglykanen nachahmen soll), die Proliferation von B-Zellen *in vitro* nicht erhöhen (Ingold et al., 2005). Dies könnte einerseits darauf zurückzuführen sein, dass Heparin eine andere Struktur als Zelloberflächen-GAGs hat und daher die Kreuzvernetzung nicht optimal ist

(Ingold et al., 2005) oder, dass das Signal von APRIL nicht über die Bindung an TACI oder BCMA, sondern direkt über die Bindung an GAG-Seitenketten von Proteoglykanen vermittelt wird, welches allerdings durch an APRIL gebundenes Heparin blockiert wäre.
Es ist daher noch unklar, ob die Proteoglykane APRIL auf der Zelloberfläche anreichern, dessen Konformation verändern und APRIL möglicherweise erst dadurch in der Lage ist, einen weiteren Rezeptor zu binden, oder ob die Proteoglykane nach APRIL-Bindung direkt ein Signal in die Zelle weiterleiten (Hendriks et al., 2005), da für andere heparinbindende Wachstumsfaktoren wie FGF-2 bekannt ist, dass sie auch direkt durch Bindung an das Transmembran-Proteoglykan Syndekan Signale in die Zellen weiterleiten können (Horowitz et al., 2002).

3.7 TACI interagiert mit Glykosaminoglykanen

Signale, die über TACI, BCMA und BAFF-R in die Zelle weitergeleitet werden unterscheiden sich. So scheint TACI die B-Zell-Aktivierung zu unterdrücken und BCMA sowie BAFF-R Überleben in Plasmazellen und B-Zellen auszulösen. Aufgrund dieser unterschiedlichen Signale wurde vermutet, dass ein weiterer TACI-spezifischer Ligand existiert (Bischof et al., 2005). Vor kurzem konnte Syndekan-2 mittels Expressionsklonierung aus einer HEK293T-cDNA-Bank als ein weiterer TACI-Ligand identifiziert werden (Bischof et al., 2005). Im Gegensatz zu $TACI^{-/-}$ murinen B-Zellen, zeigten wt B-Zellen nach Inkubation mit Syndekan-2-überexprimierenden Jurkat Zellen, in Anwesenheit von BAFF, IL-4 und anti-IgM eine verstärkte Proliferation, ein Hinweis auf eine mögliche Kooperation eines BAFF und Syndekan Signals für die B-Zell-Proliferation. Allerdings sind diese Daten durch Überexpression von Syndekan gewonnen. Da Proteoglykane wie Syndekane mit vielen Wachstumsfaktoren interagieren, müssen weitere Untersuchungen zeigen, ob die direkte Interaktion von Syndekan mit TACI auch *in vivo* eine Rolle spielt, oder die durch Syndekan-2 überexprimierende Jurkat-Zellen ausgelöste B-Zell-Proliferation von Wachstumsfaktoren vermittelt wurde, die auch an die GAG-Ketten von Syndekan-2 binden und das Signal beeinflussen. Weiterhin ist nicht geklärt, ob Syndekan direkt mit TACI interagiert oder eine gleichzeitige Interaktion mit APRIL bzw. BAFF stattfindet.

4 Wissenschaftliche Fragestellung

APRIL, ein Mitglied der TNF-Familie wird in großen Mengen von myeloiden Zellen und Tumorzellen exprimiert. APRIL bindet zwei Rezeptoren der TNF-R-Familie, TACI und BCMA und vor kurzem konnten GAG-Ketten von Proteoglykanen als dritter APRIL-spezifischer Bindungspartner identifiziert werden. APRIL interagiert mit GAG-Ketten über seine HBD, kann jedoch gleichzeitig mit den Rezeptoren TACI und BCMA interagieren und hat somit eine duale Rezeptorspezifität. Es konnte gezeigt werden, dass APRIL das Überleben von Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* fördert, dieses unabhängig von TACI und BCMA ist und durch die Bindung von APRIL an Proteoglykanen auf den Tumorzellen vermittelt wird. Allerdings wird angenommen, dass die Fähigkeit von APRIL als autokriner Wachstumsfaktor zu wirken nicht nur auf Tumorzellen beschränkt ist, da APRIL auch als autokriner Wachstumsfaktor für Megakaryozyten identifiziert werden konnte.

Die Differenzierung von Monozyten zu MΦ führt zur Expression von Proteoglykanen auf diesen Zellen. Diese ermöglichen den Zellen, die Aktivität endogen produzierter heparinbindener Wachstumsfaktoren zu kontrollieren.
Da bekannt ist, dass APRIL von Monozyten, MΦ und DCs exprimiert wird, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob von myeloiden Zellen produziertes APRIL möglicherweise einen Überlebensfaktor für Monozyten darstellt. Dazu werden primäre Monozyten aus dem Blut menschlicher Spender nach dem Protokoll von Romani *et al.* isoliert und *in vitro* zu DCs differenziert. Es soll bestimmt werden, zu welchen Zeitpunkten der Differenzierung APRIL exprimiert wird und welche Bedeutung APRIL für das Überleben von Monozyten *in vitro* hat.
Um die Wirkung von APRIL auf Monozyten und DCs zu studieren und den Bindungspartner von APRIL auf diesen Zellen zu identifizieren und zu charakterisieren sollen rekombinantes APRIL und dessen HBD-Mutante sowie die Rezeptoren TACI und BCMA rekombinant hergestellt werden. Die Rezeptoren dienen als Werkzeug, die Funktionalität der Liganden APRIL und BAFF zu überprüfen und die Identität des zu Beginn der Doktorarbeit noch unbekannten TACI-Liganden festzustellen.

II Material und Methoden

1 Material

1.1 Chemikalien

Sämtliche Chemikalien besaßen analytischen Reinheitsgrad und wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Serva (Heidelberg), Fluka (Neu-Ulm), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Amersham Biosciences (Freiburg), Roth (Karlsruhe), Gerbu (Gaiberg) und Merck (Darmstadt) bezogen.

1.2 Häufig verwendete Puffer

PBS	137 mM	NaCl
	8,1 mM	Na_2HPO_4
	2,7 mM	KCl
	1,5 mM	KH_2PO_4 pH = 7,4
TAE (50x)	2 M	Tris-Base
	2 M	Essigsäure
	50 mM	EDTA pH = 8
Laufpuffer (MOPS 20x)	2 M	MOPS
	2 M	Tris-Base
	138,6 mM	SDS
	41 mM	EDTA
		1x Puffer mit aq. bidest pH = 7,7
Laufpuffer (MES 20x)	2 M	MES
	2 M	Tris-Base
	138,6 mM	SDS
	41 mM	EDTA 1x Puffer mit aq. bidest pH = 7,3
Transferpuffer (20x)	4 M	Bicine
	4 M	Bis-Tris
	164 mM	EDTA
	8 mM	Chlorobutanol
		1x Puffer mit aq. bidest pH = 7,2
SDS-Probenpuffer (4x)	1170 mM	Sucrose

	560 mM	Tris-Base
	420 mM	Tris-HCl
	280 mM	SDS
	1,61 mM	EDTA
	0,75 mg	Serva Blau G250
	0,25 mg	Phenolrot
		in aq bidest pH = 8,5
		Für 1x reduzierenden Probenpuffer (RSB) Zugabe von 5% TCEP
Lysepuffer	30 mM	Tris-HCl pH = 7,4 bei 4°C
	150 mM	NaCl
	10% (v/v)	Glycerol
	1% (v/v)	Triton X-100
	2 mM	EDTA
	2 mM	KCl
	1x	Complete Protease Inhibitors
DNA-Probenpuffer (10x)	50% (v/v)	Glycerol
	0,42% (w/v)	Bromphenolblau
	0,42% (w/v)	Xylencyanol
Nicolettipuffer	0,1% (w/v)	Natriumcitrat
	0,1% (w/v)	Triton X-100
	50 µg/ml	Propidiumiodid
PI-Lösung	5µg/ml	Propidiumiodid
FACS-Puffer	5%	FCS
	0,05%	NaN_3 in 1x PBS
MTT Lösung	5 mg/ml	MTT in 1x PBS
MTT Stopplösung	5% (v/v)	Essigsäure in Isopropanol

Weitere Lösungen sind in den entsprechenden Abschnitten aufgeführt.

1.3 Biologisches Material

1.3.1 Bakterienstämme

E.coli Stamm	Verwendung	Bezugsquelle
TOP 10 F'	Vermehrung von Plasmiden	Invitrogen

1.3.2 Eukaryontische Zellen

Zelllinie	Beschreibung	Medium
SKW6.4	Humane B-lymphoblastoide Zellline	RPMI 1640 10% FCS
HEK293T	human embryonale Nierenzellen	DMEM 10% FCS

1.4 Nährmedien

1.4.1 Medien für die Zellkultur

Die meisten Zellkulturmedien wurden von der Firma Gibco/Invitrogen bezogen. RPMI 1640 enthält das stabilere Glutamax als Glutaminquelle. Vor der Verwendung wurden die Medien mit 10% (v/v) FCS (Gibco) und 10mM HEPES pH 7,4 supplementiert. MonoMac 6 und KG-1 Zellen sowie primären Zellen wurde hitzeinaktiviertes FCS (56°C, 20 min) zugesetzt. Alle Zellen wurden ohne Zusatz von Antibiotika kultiviert.
Für die Produktion löslicher Rezeptor-Fc Fusionsproteine in HEK293T Zellen wurde 5% FCS mit geringem Anteil an bovinen Immunglobulinen dem Medium zugegeben.
In einigen Experimenten wurde sulfatfreies RPMI 1640 (JRH Biosciences, UK) zusammen mit dialysiertem FCS (10000 MWCO; Sigma) eingesetzt. Magnesiumsulfat als eine Sulfatquelle in RPMI 1640 wurde in diesem Medium durch Magnesiumcarbonat ersetzt.
Einfriermedium: 10% DMSO (v/v), 30% FCS (v/v) in dem respektiven Kulturmedium.

1.4.2 Medien für Bakterien

Kulturmedium für Bakterien: 25g/l Luria Broth (LB) in aq. bidest, autoklaviert.
Herstellung von LB-Agarplatten: 37g/l Luria Agar in aq. bidest gelöst und autoklaviert. Luria Agar wurde in Petrischalten gegeben und diese bei 4°C gelagert.
Für die Herstellung von Selektionsmedien wurde Ampicillin (100µg/ml) zugegeben.
Einfriermedium: 40% Glycerol (v/v), 60% (v/v) LB

1.5 Antikörper und gekoppelte Proteine

Alle verwendeten Antikörper sind gegen menschliche Proteine gerichtet. Soweit nicht anders vermerkt, handelt es sich um monoklonale Antikörper aus der Maus.

Antikörper	Antigen	Herkunft, Referenz
Aprily-1 (IgG1)	APRIL (aa93-233)	Alexis/Axxora
Anti APRIL MAB884	APRIL (aa93-233)	R&D
Buffy-2 (Ratte, IgM)	BAFF (aa83-285)	Alexis/Axxora
Anti-TACI (Kaninchen, polyklonal)	TACI (aa1-151)	Proscience/Axxora
anti-BCMA (Kaninchen, polyklonal)	BCMA (C-Terminus)	Proscience/Axxora
anti-BR3 (Kaninchen, polyklonal)	BAFF-R (C-Terminus)	Proscience/Axxora
M2 (IgG1)	FLAG Epitop	Sigma-Aldrich
anti-CD14 FITC [1]	CD14	Immunotools, Friesoythe
anti-CD83 FITC [1]	CD83	Immunotools, Friesoythe
anti-CD86 PE [1]	CD86	Merck, Darmstadt
anti-HLA-DR FITC [1]	HLA-DR	Immunotools, Friesoythe
3G10 (IgG2b)	Mit Heparitinase verdautes Heparansulfat	United States Biological Massachusetts, USA
anti-IgG1 HRP (Ziege, polyklonal)	Maus IgG1	Southern Biotechnology, Birmingham, USA
anti-IgG2b HRP (Ziege, polyklonal)	Maus IgG2b	Southern Biotechnology, Birmingham, USA
anti-IgG (H+L) HRP (Ziege, polyklonal)	Maus IgG	Southern Biotechnology, Birmingham, USA
anti-Kaninchen HRP (Ziege, polyklonal)	Kaninchen IgG	Southern Biotechnology, Birmingham, USA
anti-Ratte HRP (Ziege, polyklonal)	Ratte IgG	Southern Biotechnology, Birmingham, USA
anti- IgG1 biotin	Maus IgG1	Southern Biotechnology,

		Birmingham, USA
anti-IgG (H+L) biotin	Maus IgG	Southern Biotechnology, Birmingham, USA
anti-huIgG F(ab')$_2$ biotin (Ziege,polyklonal)	Human IgG	Southern Biotechnology, Birmingham, USA

Gekoppelte Proteine	Zielstruktur	Herkunft, Referenz
Streptavidin HRP	Biotin	BD PharMingen
Streptavidin PE [1]	Biotin	BD PharMingen

[1]Konjugiert mit FITC (Fluorescein-Isothiocyanat $\lambda_{Ex/Em}$/max 488/514 nm), PE (Phycoerythrin $\lambda_{Ex/Em}$/max 488/575 nm)

1.6 Liganden und Rezeptoren der TNF-Superfamilie

Ligand	Referenz
FLAG-TRAIL	(Keogh et al., 2000)
Rezeptor	
BR3-Fc (aa 2-71)	Axxora
TRAIL-R2-Fc	(Walczak et al., 1997)

1.7 Molekularbiologische Materialien

1.7.1 Vektoren

Name	Referenz/ Herkunft
pcDNA3.1-pCMV (eukaryontischer Expressionsvektor) mit Cytomegalievirus Promotor	Invitrogen
pcDNA3.1-pEF1 (eukaryontischer Expressionsvektor) mit Elongationsfaktor 1 Promotor	Leonard (nicht publiziert)
pcDNA3.1-pEF1-FLAG-IZ-CD95L	Leonard
pcDNA3.1-pEF1-FLAG-IZ-APRIL	D. Willen
pcDNA3.1-pEF1-FLAG-IZ-APRIL 3K→A	D. Willen
pcDNA3.1-pEF1-FLAG-IZ-BAFF	D. Willen
pcDNA3.1-pEF1-APRIL Isoform α	D. Willen
pcDNA3.1-pEF1-APRIL Isoform β	D. Willen
pcDNA3.1-pEF1-BAFF	D. Willen
pcDNA3.1-pCMV-TACI-Fc	D. Willen
pcDNA3.1-pCMV-TACI-Fc 3R→A	D. Willen
pcDNA3.1-pCMV-BCMA-Fc	D. Willen
pcDNA3.1-pCMV-Fn14-Fc	D. Willen
pcDNA3.1-pCMV-DR6-Fc	D. Willen

1.7.2 Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech AG (Ebersberg) bezogen.

Name	Sequenz (5'-3')
Klonierungs-Primer	
S1 TR2SP HindIII	tata aagctt gccaccatggaacaacggggacag
S1 APRIL HindIII	tata aagctt gccaccatgccagcctcatctcctttc
S328 APRIL BglII	tata agatct aaacagaagaagcagcactctg
AS753 APRIL NotI	tata gcggccgc tcacagtttcacaaaccccagg
S438 APRIL StuI	tata aggcct acaggcccaaggatatgg
S1 BAFF HindIII	tata aagctt gccaccatggatgactccacagaaagg
S406 BAFF BglII	tata agatct cagggtccagaagaaacagc
AS858 BAFF NotI	tata gcggccg ctcacagcagtttcaatgcacc
S1 TACI HindIII	tata aagctt gccaccatgagtggcctgggccgg
S4 TACI_EC BglII	tata agatct agtggcctgggccggagcaggc
AS354 TACI_EC EcoRV	tata gatatc gagctctggtggaaggttcactgg
AS882 TACI NotI	tata gcggccgc ttatgcacctgggccccc

S1 BCMA HindIII	tata aagctt gccaccatgttgcagatggctgggc
S4 BCMA_EC BamHI	tata ggatcc ttgcagatggctgggcagtgctc
AS162 BCMA_EC EcoRV	tata gatatc cgcattcgttcctttcactgaattg
AS555 BCMA NotI	tata gcggccgc ttacctagcagaaattgatttc
S82 Fn14_EC BamHI	tata ggatcc gagcaagcgccaggcaccgcc
AS223 Fn14_EC EcoRV	tata gatatc gaaggggcaggaggtgctgc
S-Fc-EcoRV	tata gatatc actcacacatgcccaccgtgcc
AS-Fc-XhoI	tata ctcgag tcatttacccggagacagggagag
Mutagenese-Primer	
APRIL 3(K→A) $K^{110}A$, $K^{112}A$, $K^{113}A$	gaaaaaaaaattgaagcgagatctGCacagGCgGCgcagcactc tgtcctgcacc
TACIfull 3(R→A) $R^{6}A$, $R^{8}A$, $R^{9}A$	cttaagcttatgagtggcctgggcGCgagcGCgGCaggtggccg gagccgtgtg
TACI_EC 2(R→A) BglII $R^{6}A$, $R^{8}A$	tata agatct agtggcctgggcGCgagcGCg
Weitere Primer	
β-Aktin for	gcgacgaggcccagagca
β-Aktin rev	cccggccagccaggtccag
S286_TACI	caccctaagcaatgtgc
AS478_TACI	cctgatctgcactcagc

1.7.3 Enzyme und Kits

Es wurden folgende Enzyme bzw. Kits verwendet

Enzym/Kit	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase , Shrimp (SAP)	Roche, Mannheim
Expand High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim
Superscript™ III Reverse Transkriptase	Invitrogen
Taq DNA Polymerase	Sigma, Taufkirchen
N-Glycosidase F	Roche, Mannheim
Restriktionsenzyme	NEB, Schwalbach
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Heparitinase (EC4.2.2.8;*F.heparinum*; heparinaseIII; heparitin-sulfat lyase)	Sigma, Taufkirchen
Chondroitinase ABC (EC 4.2.2.4; *Proteus vulgaris*)	Sigma, Taufkirchen

Trypsin EDTA Lösung	Gibco BRL, Eggenstein
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAgen Plasmid Midi + Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Rneasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Chemolumineszenz-Kit SuperSignal West Dura	Perbio Science, Bonn

1.7.4 Sonstiges

Material	Bezugsquelle
huIgG1 Lambda	Sigma, Taufkirchen
dNTP-Mix	MBI Fermentas
Oligo(dT)$_{15}$ Primer	Promega, Madison, USA
Proteasen-Inhibitor-Cocktail EDTA frei	Roche, Mannheim
Bond-Breaker™ TCEP	Pierce
Röntgenfilme Hyperfilm™ ECL	Amersham, Freiburg
Hybond ECL Nitrocellulose-Membran	Amersham, Freiburg
Gel-Blottingpapier	Schleicher & Schuell
Indikatorsticks pH-Fix	KMF, Sankt Augustin
PCR Reaktionsgefäße Gene AMP®	Roche, Mannheim
Zellkulturflaschen 25cm^2, 75 cm^2, 150 cm^2	Renner
6-, 24-, 48-, 96-Loch Platten	Renner
Video-Printer-Papier K65 HM	MS Laborgeräte, Wiesloch
Hamilton-Spritze	Hamilton Bonaduz AG
Kanüle Microlance™ 3/ 30G ½/ 0,3 x 13mm	Beckton Dickinson
Dialyseschläuche:	
MWCO 8000-10000	Roth
MWCO 12000-14000	Roth
Sterilfilter für Spritzen: Millex®-MC 0,22 µm	Millipore
Vivaspin 0,5 und 20ml Concentrator MWCO 10000	Sartorius
Protein-G Beads	Roche, Mannheim
M2 Sepharose	Sigma, Taufkirchen
Heparin Sepharose	Amersham, Freiburg
Heparin Natrium	Braun, Melsungen
Heparansulfat aus bovine kidney	Sigma, Taufkirchen
Proteinmarker SeeBlue™	Invitrogen
DNA Marker Smart Ladder (200bp-10kB)	Eurogentec

1.8 Geräte

Gerät	Hersteller
Durchflußzytometer FACSCalibur	Becton Dickinson
Smart Gelfiltrationssystem	Amersham, Freiburg
Blotapparatur X Cell II™, Novex	Invitrogen
Netzgeräte:	
PowerEASE, Novex	Invitrogen
PowerPac 300	BioRad
Brutschrank Stericult 200 Inkubator	Forma Scientific
Steril Zellkultur Hood	Hereaus
Gefrierschränke -20°C	Liebherr
Gefrierschränke -80°C	Forma Scientific
Heizbad Thermomix® BU	Braun
Heizblock Thermomixer compact	Eppendorf
Magnetrüher MR 3000	Heidolph, Hanau
pH Meter MP225	Mettler
Photometer Ultrospec 3100 pro	Amersham, Freiburg
Röntgenfilmentwicklungsgerät	Agfa
PCR Gerät: Gene Amp PCR System 9700	Applied Biosystems
Mikroskope:	
Lichtmikroskop	Zeiss
Phasenkontrastmikroskop	Zeiss
Mikrowellengerät HMG730B	Bosch, Stuttgart
Schüttelinkubator Polymax 1040	Heidolph, Hanau
Vortex	Heidolph, Hanau
Waagen:	
Analysenwaage PM 3000	Mettler
Präzisionswaage HM-202	Mettler
Neubauer Zählkammer	HBG
Zentrifugen:	
Biofuge Fresco	Hereaus
Biofuge Pico	Hereaus
Biofuge Stratos	Hereaus
Varifuge 3.OR	Hereaus
Multifuge 3S-R	Hereaus
Quarzküvette, 10mm Schichtdicke	Hellma, München

1.9 Software

Für die Datenbank- und Literaturrechereche wurde das National Center of Biotechnology Information http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ das Husar-Paket vom Deutschen Krebsforschungszentrum, Heidelberg und die Proteindatenbank (PDB) http://www.pdb.com verwendet. Folgende Computersoftware wurde verwendet: Microsoft Office, SigmaPlot, VectorNTI, CellQuest (Becton Dickinson), CHIME.

2 Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 RNA-Isolierung und Reverse Transkription

Die Isolierung von RNA aus primären Monozyten, DCs, KG-1 und SKW6.4 Zellen erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit nach Anweisung des Herstellers. Die RNA wurde in DEPC behandeltem Wasser (1:1000) aufgenommen. Die reverse Transkription wurde mit der Superscript III Reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe) in einem Gesamtvolumen von 20 µl nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Die synthetisierte einzelsträngige cDNA wurde bei -80°C aufbewahrt. Für die sich anschließende PCR wurden jeweils 5 µl eingesetzt.

2.1.2 DNA-Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) lässt sich ein definierter Nukleinsäureabschnitt selektiv vervielfältigen. Für analytische PCRs wurde die Taq-Polymerase und für präparative PCRs die Expand High Fidelity ein Gemisch aus Taq und Pfu wegen der 3'-5'-Korrekturlesefähigkeit der Pfu-Polymerase verwendet. Dazu wurde je Reaktion folgender Ansatz benutzt:

5 µl	10x-Polymerase-Puffer
1 µl	dNTP-Mix (je 10 mM)
1 µl	Primer 1 (10 pmol/µl)
1 µl	Primer 2 (10 pmol/µl)
10-100ng oder	Template DNA (Plasmid)
5 µl	Template DNA (RT)
2,5 U	Polymerase
ad 50 µl	H_2O

Die Programmparameter für die unterschiedlichen PCRs sind in den Abschnitten in welchen die Klonierung der rekombinanten Proteine dargestellt wird, aufgeführt.

2.1.3 Restriktionsspaltung von DNA

Es wurden 0,5-1 µg Plasmid-DNA oder DNA Fragmente mit jeweils 2 U zweier Restriktionsendonukleasen in enzymspezifischen Puffer für mindestens 1 h bei 37°C inkubiert und darauffolgend die Enzyme bei 65°C für 15 min hitzeinaktiviert. Die verdaute Plasmid-DNA wurde anschließend in einem Agarosegel aufgetrennt. Die DNA-Fragmente für die weitere Klonierung wurden mittels eines PCR-Aufreinigungskits (Qiagen) gereinigt.

2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren

Für die Analyse von Plasmiden, die Überprüfung von Restriktionsreaktionen und die Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurden TAE Agarosegele benutzt. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurde eine Agarosekonzentration von 1-1,5 % (w/v) gewählt. Die DNA Proben wurden mit 1 x DNA-Probenpuffer versetzt und in Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 10V/cm in TAE-Puffer. Zur Kalibrierung des Gels wurde neben die zu untersuchenden Proben ein DNA-Molekulargewichtsmarker mit definiertem Fragmentgemisch aufgetragen. Nach der Auftrennung wurde das Gel in einer 0,5 µg/ml Ethidiumbromidlösung für 30 min angefärbt und nach 10 min Entfärben in VE-H_2O unter UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 254$ nm visualisiert und photographiert. Ethidiumbromid interkaliert sequenzunspezifisch in doppelsträngige DNA und führt so durch Anregung mit UV-Licht zu orangefarbener Fluoreszenz.

2.1.5 Isolierung von DNA Fragmenten aus einem Agarosegel

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Gel zum Zwecke der weiteren Klonierung wurde das QIAquick Gel Extraction Kit entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

2.1.6 Dephosphorylierung und Ligation von DNA

Für die Verwendung geschnittener Vektor-DNA für eine Ligation kann diese mit einer Phosphatase behandelt werden, um die endständigen Phosphatgruppen abzuspalten und so eine intramolekulare Religation des Vektors zu verhindern. Dazu wurde zu einem Restriktionsverdau 5 U alkalische Phosphatase SAP (Shrimp alkaline phosphatase) und 1x SAP Puffer zugegeben und dieser für weitere 30 min bei 37°C inkubiert und danach für 15 min bei 65 °C hitzeinaktiviert. Der linearisierte und dephosphorylierte Vektor wurde durch Agarosegelelektrophorese und anschließende Gelextraktion aufgereinigt.
Die Ligationsreaktion ist am effizientesten bei einem molaren Verhältnis des Vektors zum Insert von 1:3-1:5. Die Konzentration der Vektor- und der zu inserierenden DNA wurde nach deren Auftrag auf ein Agarosegel und Anfärben in einem Ethidiumbromidfärbebad anhand der Bandenstärke, durch Vergleich mit einem für

Quantifizierungen geeigneten Molekulargewichtsmarker (Smart Ladder), bestimmt. Für die Konversion von µg zu pmol wurde folgende Formel verwendet: µg (dsDNA) x $1515/N_{bp}$ = pmol dsDNA. Für eine Ligationsreaktion wurde folgender Ansatz gewählt: Vektor- und Insert-DNA wurden in einem molaren Verhältnis von 1:5 in einen Ansatz gegeben. Es erfolgte die Zugabe von 2 µl 10x Ligationspuffer (mit ATP) und 2 U T4-DNA-Ligase. Der Ansatz wurde mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt für 1-2 h bei RT oder bei 16°C über Nacht inkubiert.

2.1.7 Transformation von Bakterien

Durch Transformation wurde Plasmid-DNA zur Amplifikation in Bakterien eingebracht. Zur Vermehrung der hier verwendeten Vektoren, dienten chemokompetente Bakterien des *E.coli*-Stammes Top10. Für die Transfomation wurden jeweils 50 µl kompetente Bakteriensuspension aufgetaut und 1-10 ng der zu transformierenden DNA oder die Hälfte des Ligationsansatzes zugefügt, gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Kurzes Erhitzen auf 42°C für 90 s und zweiminütiges Abkühlen auf Eis führen zur Permeabilisierung der Bakterienzellwand für DNA. Den Reaktionsansätzen wurde anschließend 950 µl antibiotikafreies SOC-Medium zugegeben und diese für 1 h bei 37°C, 300 rpm zur Induktion der Antibiotikaresistenzen inkubiert. Die Selektion auf plasmidtragende Bakterien erfolgte in Petrischalen mit antibiotikahaltigem LB-Agar über Nacht bei 37°C. Die DNA mehrerer makroskopisch sichtbarer Kolonien wurde am darauffolgenden Tag mittels Plasmid-Minipräp (Qiagen) nach Anweisung des Herstellers gewonnen und zur Kontrolle des enthaltenen Plasmids einer Restriktionsanalyse unterworfen. Die Plasmid-DNA eines positiven Klons wurde schließlich in größerem Maßstab mittels Plasmid-Maxipräp (Qiagen) nach Anweisung des Herstellers, gewonnen und in sterilem pyrogenfreiem Wasser aufgenommen.

2.1.8 Klonierung von TACI-Fc, TACI-Fc 3R→A, BCMA-Fc, Fn14-Fc, DR6-Fc

Die Rezeptor-Fc-Fusionsproteine setzen sich aus dem für das Signalpeptid von humanem TRAIL-R2 kodierenden Anteil aa 1-55 (TR2SP), aus einem für die extrazelluläre Domäne des jeweiligen Rezeptors kodierenden Anteil, und einem weiteren, für den Fc-Teil eines humanen Antikörpers (Hinge, C_H2-, C_H3-Region vom humanen IgG1 Isotyp) kodierenden Anteil aa 106-330 zusammen. Der eukaryontische Expressionsvektor pcDNA3.1-pCMV-TR2SP-DR6_EC-Fc war im Labor vorhanden. In diesem Vektor waren die einzelnen Fragmente über die Restriktionsschnittstellen HindIII-TR2SP-BamHI-DR6_EC-NotI-Fc-XhoI verbunden. Das Fc-Fragment enthält drei Mutationen ($L^{117}A$, $L^{118}E$, $G^{120}A$) an der Grenze Hinge-C_H2, die die Bindung der Rezeptor-Fc-Fusionsproteine an Fc-Rezeptoren stark reduzieren (Canfield and Morrison, 1991). Ausserdem enthält das huIgG1 Fc-Fragment zwei Polymorphismen $D^{239}E$ und $L^{241}M$ in der C_H3 Domäne. Im ersten Schritt der Klonierung der Rezeptor-Fc-Fusionsproteine wurde das Fc-Fragment aus dem Vektor

pcDNA3.1-pCMV-TR2SP-DR6_EC-Fc mit Hilfe der Primer S-Fc-EcoRV und AS-Fc-XhoI amplifiziert (PCR-Bedingungen s.u.). Dann erfolgte die Amplifikation der extrazellulären Domänen von TACI (aa 2-118), BCMA (aa 2-54) und Fn14 (aa 28-75) mit den in der Tabelle angegebenen Primern und cDNA. Die PCR Bedingungen waren wie folgt:

Start		5 min	95°C
28 Zyklen		30 sek	94°C
	Denaturierung	30 sek	55°C
	Annealing	1'30''(Fc)	72°C
	Elongation	40''(TACI, Fn14)	
		20''(BCMA)	
Termination		7 min	72°C
		∞	4°C

Name	Acc.No.	Primer	Herkunft cDNA
TACI-Fc	O14836	S4 TACI_EC BglII	SKW6.4 Zellen
		AS354 TACI_EC EcoRV	
BCMA-Fc	Q02223	S4 BCMA_EC BamHI	SKW6.4 Zellen
		AS162 BCMA_EC EcoRV	
Fn14-Fc	Q9NP84	S82 Fn14_EC BamHI	A549 Zellen
		AS223 Fn14_EC EcoRV	
Fc	P01857	S-Fc-EcoRV	pcDNA3.1-pCMV
		AS-Fc-XhoI	TR2SP-DR6_EC-Fc
TACI-Fc		TACI_EC 2(R→A) BglII	SKW6.4
3R→A		AS354 TACI_EC EcoRV	

Die PCR-Fragmente wurden nach Agarosegelelektrophorese aus dem Gel extrahiert und mit den angegebenen Restriktionsenzymen für 1 h bei 37°C verdaut und wiederum mit einem PCR Aufreinigungskit (Qiagen) gereinigt. Der mit BamHI und XhoI verdaute, anschließend dephosphorylierte linearisierte Vektor HindIII-TR2SP-BamHI-DR6_EC-NotI-Fc-XhoI wurde nach Gelextraktion mit jeweils einem Rezeptor-EC Fragment und dem Fc-Fragment über Nacht bei 16°C ligiert.
Die Mutation der N-terminalen basischen Sequenz $\mathbf{R}^6X^7\mathbf{R}^8\mathbf{R}^9$ zu $\mathbf{A}^6X^7\mathbf{A}^8\mathbf{A}^9$ in humanem TACI wurde mit dem Mutagenese Primer TACIfull 3 (R→A) eingeführt. Als antisense Primer diente AS882 TACI NotI. Als Vorlage für die PCR diente der Vektor pcDNA3.1-pEF1, welcher den kompletten offenen Leserahmen von humanem TACI enthielt. Diese Mutante wurde für die Amplifikation der extrazellulären Domäne von TACI mittels der Primer TACI_EC 2(R→A) und AS354 TACI_EC EcoRV verwendet.
Die das cDNA Fragment enthaltenen Vektoren wurden sequenziert (MWG-Biotech AG) und enthielten das gewünschte Produkt ohne Mutationen.

2.1.9 Klonierung von APRIL Isoform-α und -β und BAFF

Plasmide, die für die APRIL Isoform-α, APRIL Isoform-β und BAFF kodieren wurden durch Amplifikation der offenen Leserahmen von APRIL und BAFF durch PCR mit dem High Fidelity Polymerasemix (Pfu und Taq) erhalten. Die Primer und die cDNA, die für die Amplifikation benutzt wurden waren:

Name	Acc. No.	Primer	Herkunft cDNA
April Isoform-α	O75888-1	S1 APRIL HindIII	Donor 11 Tag 0 Monozyten
April Isoform-β	O75888-2	AS753 APRIL NotI	Donor 5 Tag 1 Monozyten
BAFF	Q9Y275	S1 BAFF HindIII AS858 BAFF NotI	Donor 11 Tag 2 Monozyten

Die PCR wurde wie folgt durchgeführt:

Start		5 min	95°C
28 Zyklen	Denaturierung	30 sek	94°C
	Annealing	30 sek	56°C
	Elongation	1 min 45 sek	72°C
Termination		7 min	72°C
		∞	4°C

Die PCR Fragmente wurden in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1-pEF1 über die Schnittstellen HindIII und NotI ligiert. Start- und Stopp-Codon waren jeweils auf der BAFF- und APRIL cDNA enthalten. Die das cDNA Fragment enthaltenen Vektoren wurden sequenziert (MWG-Biotech AG) und enthielten das gewünschte Produkt ohne Mutationen.

2.1.10 Klonierung von Flag-IZ-APRIL, Flag-IZ-APRIL 3K→A und Flag-IZ-BAFF

Die Mitglieder der TNF-Familie liegen als Trimere vor. Um ein rekombinantes trimeres APRIL- und BAFF-Protein herzustellen, wurden die extrazellulären Domänen von APRIL und BAFF an die Trimersierungsdomäne des **I**soleuzin-**Z**ippers (IZ) fusioniert (Suzuki et al., 1998). Als Ausgangsvektor für die Herstellung der Flag-IZ-APRIL und Flag-IZ-BAFF Fusionsproteine wurde der die Flag-IZ Sequenz enthaltene Vektor pcDNA3.1-pEF1-FLAG-IZ-CD95L benutzt. Dieser Vektor enthält das Signalpeptid von TRAIL-Rezeptor 2 und eine Flag-IZ Sequenz. Das Flag-Tag dient der späteren Detektion des Proteins mittels des M2 Antikörpers sowie der Aufreinigung der

rekombinanten Proteine mittels M2 Sepharose. Das Isoleuzin-Zipper-Peptid $(IEKKIEA)_4$ bildet in Lösung eine parallel trimerisierte *coiled-coil*-Struktur, wodurch eine Trimerisierung von APRIL und BAFF bewirkt wird. Durch Verdau des Vektors mit den Restriktionsenzymen BglII und NotI wurde die CD95L Sequenz entfernt. Durch anschließende Dephosphorylierung und Gelextraktion wurde der Vektor für die Ligation mit den durch PCR (High Fidelity Polymerase) erhaltenen APRIL und BAFF Fragmenten vorbereitet.

Name	Primer	PCR-Vorlage
Flag-IZ-APRIL	S328 APRIL BglII AS753 APRIL NotI	pcDNA3.1-pEF1-APRIL
Flag-IZ-BAFF	S406 BAFF BglII AS858 BAFF NotI	pcDNA3.1-pEF1-BAFF
Flag-IZ-APRIL 3K→A	APRIL 3(K→A) $K^{110}A$, $K^{112}A$, $K^{113}A$ AS753 APRIL NotI	pcDNA3.1-pEF1-FLAG-IZ-APRIL

Die PCRs für APRIL, BAFF und APRIL 3K→A und das Fragment 2 wurden wie folgt durchgeführt:

Start		5 min	95°C
30 Zyklen	Denaturierung	30 sek	94°C
	Annealing	30 sek	56°C
	Elongation	1 min 15 sek	72°C
Termination		7 min	72°C
		∞	4°C

Die PCR für das Fragment 1 wurde wie folgt durchgeführt:

Start		5 min	95°C
28 Zyklen	Denaturierung	30sek	94°C
	Annealing	30 sek	60°C
	Elongation	1’30 sek	72°C
Termination		7 min	72°C
		∞	4°C

Nach Fertigstellung des eukaryontischen Vektors pcDNA3.1-pEF1-FLAG-IZ-APRIL wurde dieser als PCR-Vorlage für die Generierung der Heparinbindedomän (HBD)

($Q^{109}\mathbf{K}^{110}Q^{111}\mathbf{K}^{112}\mathbf{K}^{113}Q^{114}$) Mutanten von APRIL durch ortsgerichtet Mutagenese benutzt. Ortsgerichtete Mutagenese bedeutet das spezifische Einbringen einer oder mehrer Mutationen in eine Nukleinsäuresequenz. Dazu wurden Primer benutzt, die die einzuführenden Mutationen etwa in der Mitte beinhalteten. Mittels PCR wurden in der Flag-IZ-APRIL kodierenden cDNA drei Lysin zu Alanin Mutationen eingeführt. Dazu wurde mit den Primern APRIL 3(K→A) $K^{110}A$, $K^{112}A$, $K^{113}A$ und AS753 APRIL NotI ein PCR Fragment erzeugt, welches die mutierte APRIL Sequenz enthielt und dieses nach BglII/ NotI Verdau in den durch BglII/ NotI verdauten (s.o.) und dephosphorylierten Vektor pcDNA3.1-Flag-IZ ligiert.
Alle erhaltenen Vektoren wurden sequenziert (MWG-Biotech AG) und enthielten die gewünschten Produkte.

2.1.11 PCR zur Überprüfung der Expression von APRIL/BAFF/TACI/ BCMA mRNA in Monozyten und Dendritischen Zellen

Um festzustellen, ob die hier verwendeten Monozyten und *in vitro* generierten DCs APRIL und BAFF sowie TACI und BCMA exprimieren, wurde nach mRNA Isolation und reverser Transkription eine PCR mittels spezifischer Primer durchgeführt. Der PCR Ansatz wurde wie in 2.1.2 beschrieben angesetzt. Dazu wurden folgende Primer und folgende PCR-Zyklen verwendet:

Name	Primer	PCR-Vorlage
APRIL	S328 APRIL AS753 APRIL	RT Donor 5 und 11
BAFF	S406 BAFF AS858 BAFF	RT Donor 5 und 11
TACI	S286_TACI AS478_TACI	RT Donor 3
BCMA	S4 BCMA_EC AS162 BCMA_EC	RT Donor 3

Start		5 min	95°C
35 Zyklen	Denaturierung	30 sek	94°C
	Annealing	30 sek	59°C (APRIL + BAFF) 55°C (TACI + BCMA)
	Elongation	30 sek	72°C
Termination		7 min	72°C
		∞	4°C

2.2 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten mit eukaryontischen Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in Zellkulturlabors an speziellen Sterilarbeitsplätzen durchgeführt, um Kontamination mit Bakterien, Hefen oder Pilzen zu vermeiden. Darüber hinaus wurden ausschließlich gammabestrahlte Zellkulturmaterialien sowie sterilfiltrierte Lösungen verwendet.
Die Zellkulturbedingungen für Zellen die in RPMI 1640 kultiviert wurden waren 37°C/ 96% Humidität und 5% CO_2. Die Zellkulturbedingungen für Zellen die in DMEM kultiviert wurden waren 37°C/ 96% Humidität und 10% CO_2.

2.2.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Die Suspensionszellen wurden alle drei bis vier Tage mit einer Zellzahl von 1-5x10^5 Zellen/ml umgesetzt, so dass die Dichte 1x10^6 Zellen/ml Kulturmedium nicht überschritt. Adhärente Zellen wurden vor dem Ablösen mit 1x PBS gewaschen, bevor sie zwei bis fünf Minuten mit 1x Trypsin/EDTA oder 2 mM EDTA/PBS im Brutschrank inkubiert wurden. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von mindestens einem Volumen an respektivem Medium mit 10% FCS abgestoppt. Die Zellen wurden für 5 min bei 1200 rpm (Varifuge 3.OR) abzentrifugiert und in der erforderlichen Menge frischen Mediums resuspendiert. Dabei wurden alle verwendeten adhärenten Zelllinien nach Konfluenz im Verhältnis 1:10-1:20 gesplittet.

2.2.2 Präparation primärer humaner Monozyten

Periphere Blut Monozyten (PBMC) wurden aus Buffycoats (Blutbank, Heidelberg), hergestellt aus 500 ml Vollblut gesunder erwachsener Spender, isoliert. Die Gerinnung des Blutes wurde durch CPD (Citrat-Phosphat-Dextrose) verhindert. Der Buffycoat wurde mit PBS auf 400 ml aufgefüllt. Je 15 ml Ficoll-Trennlösung (Biochrom AG, Berlin) wurden mit 30 ml Blut langsam überschichtet und zentrifugiert (2420 rpm, 20 min, 20°C, ohne Bremse). Die Leukozyten wurden vorsichtig abgenommen, zweimal gewaschen (1000 rpm, 10 min, 20°C), auf 8x10^6 Zellen/ml eingestellt und 1:1 mit AET-Erthrozyten (s.u.) gemischt (Rosettierung). Das Gemisch wurde zentrifugiert (1000 rpm, 10 min, 20°C, Bremse Stufe 2), der Überstand (Leukozyten ohne T-Zellen) abgenommen zweimal mit PBS gewaschen und die Monozyten mit Hilfe magnetischer MACS® CD14 Beads separiert. Das Prinzip beruht auf der Inkubation der Zellsuspension mit CD14-Antikörpern, welche an super-paramagnetische Microbeads gekoppelt sind. Dazu wurde das MACS System von Milteny nach Angaben des Herstellers verwendet. Es konnte ca. 0,7-1x10^8 Monozyten aus einem Buffycoat aufgereinigt werden. Die Reinheit der Monozyten wurde per anti-CD14 FITC Antikörperfärbung im FACScan überprüft und betrug ≥ 98%.

AET-Erythrozyten
Ein großer Anteil an T-Zellen wurde vor der Monozyten Aufreinigung aus dem

Buffycoat mit Hilfe von Schaferythrozyten entfernt, um die Gesamtzellzahl für die Monozytenaufreinigung zu reduzieren. T-Zellen exprimieren LFA-3 (Leukocyte function associated antigen-3), das von CD2 auf Schaferythrozyten gebunden wird. Durch die vorherige Aktivierung der Oberflächenmoleküle der Erythrozyten durch 2-**A**mino**e**thylisot**h**iouroniumbromid (AET, Sigma) kommte es zur zusätzlichen Bindungsverstärkung durch AET vermittelte, kovalent Quervernetzung. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 1200 rpm für 10 min bei 20°C durchgeführt. 0,5 g AET wurden in 12,5 ml pyrogenfreiem Wasser bei pH 9 (mit 2N NaOH eingestellt) gelöst und sterilfiltriert. 25 ml eines 1:1 Gemisches aus Schafsblut und Alsever-Lösung (GibcoBRL) wurden dreimal mit sterilem PBS gewaschen, zur AET-Lösung gegeben und für 15 min bei 37°C auf einem Rotator inkubiert. Anschließend wurde viermal mit sterilem PBS gewaschen und schließlich eine 2%ige Suspension in RPMI/FCS hergestellt, die bis zu drei Tagen haltbar war.

2.2.3 *In-vitro*-Differenzierung von Monozyten zu Dendritischen Zellen

Die *in-vitro*-Differenzierung der primären humanen Monozyten erfolgte nach dem Protokoll von Romani *et al*. Die aufgereingten Monozyten wurden nach einem Waschschritt mit einer Dichte von $1x10^6$ Zellen/ml in Monozyten-Medium: RPMI 1640, 10% hitzeinaktiviertes FCS, 1000U/ml rhGM-CSF (Leukine, Martin Leverkus), 160U/ml rhIL4 (Immunotools), aufgenommen und waren nach sieben Tagen zu unreifen Dendritischen Zellen (DCs) differenziert. An Tag sieben wurden die unreifen DCs zweimal mit Medium gewaschen und wiederum in Monozyten-Medium mit einer Dichte von $1x10^6$ Zellen/ml aufgenommen. Zugabe von 1µg/ml LPS (Serotyp 055:B5, Sigma) oder 1µg/ml LZ-CD40L (Leuzin-zipper CD40L, Immunex) führte innerhalb von drei Tagen zur Reifung der DCs. Die Reifung der DCs war sichtbar an charakteristischen morphologischen Veränderungen (zytoplasmatische Ausläufer) und wurde durch Antikörperfärbung (Expression von CD83, CD86, HLA-DR stark erhöht, kein CD14) im FACScan überprüft.

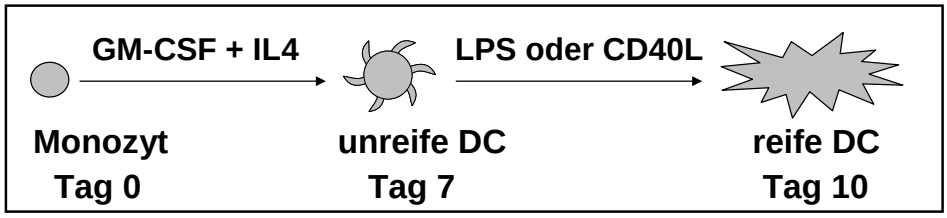


Abbildung 9: Schema der Kultivierung von Monozyten und deren Reifung zu Dendritischen Zellen.

2.2.4 Zelltodnachweise

Mit Hilfe zahlreicher Methoden, lassen sich verschiedene Veränderungen während des Zelltodes detektieren. Angesichts unterschiedlicher Arten des Zelltodes finden sich nicht in jeder toten oder sterbenden Zelle alle untersuchten Merkmale. Vor allem das sequentielle Auftreten verschiedener, charakteristischer Merkmale des Zelltodes gibt Hinweise auf den bestehenden Mechanismus des beobachteten Apoptoseprozesses. Im Folgenden sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden zur Bestimmung von apoptotischen und nekrotischen Mechanismen aufgeführt:

Apoptosemessung aufgrund morphologischer Veränderungen

Bestimmte morphologische Veränderungen sind ein Charakteristikum des apoptotischen Zelltodes. So schrumpfen Zellen im Verlauf der Apoptose aufgrund verändeter Membranorganisation, Zerstörung von Komponenten des Zytoskeletts und aufgrund von Zellmasseverlust durch Abschnürung von apoptotischen Körperchen. Von lebenden und den an Größe zunehmende nekrotischen Zellen lassen sich apoptotische Zellen daher im Durchflusszytometer aufgrund ihres geringen "forward scatter" (FSC)- Signals unterscheiden. Darüber Hinaus weisen apoptotische Zellen eine modifizierte Organisation von Kern und Zytoplasma auf. Kondensiertes Zytoplasma wird aufgrund der erhöhten Granularität als vergrößertes "side scatter" (SSC)-Signal im Durchflusszytometer sichtbar. Der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen in einer Zellpopulation lässt sich daher mittels FACScan bestimmen: das FSC-Signal wird gegen das SSC-Signal aufgetragen (FSC/SSC) wodurch lebende und tote Zellen voneinander abgegrenzt werden können.

Bestimmung von Zellkernen mit subdiploidem DNA-Gehalt

Mit Hilfe einer von Nicoletti (Nicoletti et al., 1991) etablierten Methode lassen sich apoptotische Zellkerne aufgrund ihres geringeren DNA-Gehaltes von Zellkernen lebender Zellen unterscheiden. Dazu wurden jeweils $5x10^5$ Zellen in 100 µl Nicoletti-Puffer über Nacht bei 4°C unter Lichtabschluss lysiert. Der Fluoreszenzfarbstoff dringt dabei in die Zellkerne ein und interkaliert in die DNA, so dass die Kerne ihrem DNA Gehalt entsprechend fluoreszieren. Neben den vitalen diploiden und sich gerade teilenden tetraploiden Zellkernen lassen sich daher im FL2-Detektor des Durchflusszytometers die apoptotischen Zellkerne als subdiploide DNA quantifizieren (sub-G1-peak). Da es nur im Verlauf der Apoptose zur Fragmentierung von DNA kommt, lassen sich mit dieser Methode apoptotische von nekrotischen Zellen unterscheiden. Die spezifische Apoptose wurde wie folgt berechnet: % spezifische Apoptose = 100 x (% experimenteller Zelltod - % spontaner Zelltod) / (100 - % spontaner Zelltod).

Vitalitäts-Test (MTT-Test)

Die Vitalität der Zellen wurde photometrisch mit dem MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid]-Test bestimmt. Die Bestimmung lebendiger Zellen im MTT-Test beruht auf den Zellzahl-abhängigen Umsatz des gelben wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes, das durch die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen der Atmungskette zu blauen Formazankristallen reduziert wird. In toten Zellen erfolgt kein Umsatz des Farbstoffes (Mosmann, 1983). Jeweils $1x10^5$ primäre Monozyten wurden in 100 µl RPMI/10% hitzeinaktiviertes FCS in einer 96-Loch-Flachbodenplatte ausgesät, die zuvor mit Flag-IZ-APRIL/-BAFF oder TACI-/BCMA-/FN14-/DR6-Fc beschichtet worden war. Dazu wurden die rekombinanten Proteine in 50 µl PBS auf die 96-Loch-Flachbodenblatte gegeben und für 4 h bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Platte 1x mit PBS gewaschen und die primären Monozyten ausgesät. In einigen Versuchen wurde auch lösliches rekombinantes Protein zugegeben. Die Inkubation der primären Monozyten erfolgte für 3 Tage bei 37°C im Zellkulturbrutschrank. Nach drei Tagen erfolgte die Zugabe von 20 µl MTT-Reaktionslösung. 3-4 Stunden nach der Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurden die Zellen bei 2000 rpm für 5 min abzentrifugiert, das die MTT-Lösung enthaltene Medium abgesaugt und 100µl MTT-Stopplösung dazugegeben, um die entstandenen Formazankristalle zu lösen. Die Absorption der gelösten blauen Formazankristalle wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm bestimmt.

2.2.5 Adhäsions-Assay

Primäre humane Monozyten wurden in 96- oder 24-Loch Zellkulturplatten (Polystyren) ausgesät die zuvor mit Flag-IZ-APRIL, TACI-Fc oder Kontrollproteinen beschichtet worden waren. Es wurden 10-20 µg Protein in 1 ml PBS angesetzt, die 96-Loch Platte mit 100 µl und die 24-Loch Platte mit 300 µl für 4 h bei 37°C im Brutschrank beschichtet. Nach zweimaligem Waschen mit PBS waren die Zellkulturplatten für den Assay einsetzbar. Die Monozyten wurden in einer Zelldichte von $1x10^6$ Zellen/ml in RPMI/10% hitzeinaktiviertem FCS ausgesät (100 µl in die 96-Loch Platte und 300 µl in die 24-Loch Platte). Nach unterschiedlichen Inkubationszeitpunkten wurden die nicht-adhärenten Zellen durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die adhärenten Zellen durch ein Phasenkontrastmikroskop dokumentiert bzw. die Anzahl der adhärenten Zellen mittels des MTT-Assays (siehe 2.2.4) quantifiziert.

2.2.6 FACScan-Analyse von Oberflächenmolekülen

Die Expression von Zelloberflächenproteinen wird durch Färbung mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Proteinen und anschließender Messung im Durchflußzytometer bestimmt. Dazu wurden $1-3x10^5$ Zellen durch Zentrifugation (5 min, 1200 rpm, 4°C) in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit U-förmigem Boden in FACS-Puffer (PBS/5% FCS/ 0,05% NaN_3) pelletiert. Die Überstände wurden verworfen und die in 100 µl FACS-Puffer resuspendierten Zellen mit monoklonalem Antikörper [5µg/ml], FLAG-IZ-

APRIL/Flag-IZ-BAFF Protein [1µg/ml], TACI-/BCMA-/BR3-Fc Protein [5µg/ml] bzw. Kontrollantikörper/Kontroll-FLAG-Protein/Kontroll-Fc-Protein inkubiert. Im Folgenden wurden alle Inkubationsschritte für 20 min auf Eis in einem Gesamtvolumen von 100 µl durchgeführt. Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Zellen dreimal mit 200 µl kaltem FACS-Puffer gewaschen und abzentrifugiert (5 min, 1200 rpm, 4°C). Danach erfolgte eine Inkubation entweder mit einem biotinyliertem Zweitantikörper [5 µg/ml] (Ziege anti Maus/Human Ig $(Fab')_2$ biotin) oder einerm Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Zweitantikörper [5 µg/ml]. Alternativ wurde ein direkt fluoreszenzmarkierter Erstantikörper verwendet. Bei Verwendung des biotinylierten Zweitantikörpers wurden die Zellen in einem dritten Färbeschritt mit Streptavidin-PE (1:200) im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Nach Abschluss der Färbereaktion wurden die Zellen in 200 µl FACS-Puffer mit 1 µg/ml Propidiumiodid (PI) resuspendiert, um tote und lebende Zellen zu unterscheiden. Nur lebende Zellen (PI-negativ) wurden ausgewertet. Die immunfluorszenz gefärbten Zellen werden duch eine Kapillare in das Durchflußzytomter FACScan eingesogen und dort von einem Argonlaser mit der Anregungswellenlänge λ = 488 nm bestrahlt. Die Wellenlänge des von den angeregten Elektronen emittierten Lichts ist dann jeweils vom verwendeten Fluoreszenzfarbstoff abhängig. Das Licht wird von Sammellinsen eingefangen und über verschiedene Spiegel und Filter an Detektoren weitergeleitet, die Auskunft über Größe (**f**orward **sc**atter, FSC), Granularität (**s**ide **sc**atter, SSC) oder Fluoreszenz (**fl**uorescence detector, FL) gaben. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit dem CellQuest Programm von Becton Dickinson.

2.2.7 Phasenkontrast-Mikroskopie und Imageanalyse

Die Phasenkontrast Mikroskopie wird genutzt, um kontrastreiche Bilder lebender Zellen zu generieren. Die Optik basiert auf der Übertragung der Phasenunterschiede in eine veränderte Amplitude, die als Unterschied im Bildkontrast visualisiert wird. Die Phasenunterschiede werden durch einen leicht veränderten Refraktionsindex zwischen Zellkulturmedium und der Zelle oder zwischen Zytoplasma und Zellkern bewirkt.
Die Phasenkontrast Bilder wurden mit einem Axiovert 25 Mikroskop (Zeiss, Göttingen) mit einem A-Plan 5x/0,12 Ph0, CP-ACHROMAT 10x/0,25 Ph1, LD A-Plan 20x/0,3 Ph1 oder LD A-Plan 32x/0,4 Ph1 Objektiv (Zeiss) aufgenommen. Dazu wurde die ProgResC10 Kamera (Jenoptik, Jena) mit der ProgresC10 Software genutzt und die erhaltenen Bilder mit dem Adobe ImageReader ausgewertet

2.3 Methoden zur Untersuchung von Protein-GAG Interakionen

Die Anwendung verschiedener Methoden zur Untersuchung von Protein-GAG Interaktionen ist notwendig, da jede von ihnen sowohl Vorteile als auch Nachteile hat. Da die Protein-GAG Interaktion durch starke elektrostatische Wechselwirkungen bedingt ist, kann durch die Menge an Salz (NaCl), die benötigt wird, um das an Heparin-Sepharose gebundene Protein zu eluieren, dessen Affinität für GAGs bestimmt werden (siehe 2.5.4). Enzymatische Degradation mit Heparitinase bzw. Chondroitin-ABC Lyase entfernt extrazellulärer Heparansulfat- bzw. Chondroitinsulfat/Dermatansulfat-Seitenketten von Proteoglykanen (siehe 2.3.1). Chlorat Behandlung inhibiert die Sulfatierung der GAG-Seitenketten von Proteoglykanen, allerdings ist die Inhibition der Sulfatierung anderer zellulärer Proteine auch betroffen (siehe 2.3.2). Weiterhin kann die Bindung eines putativen GAG-Liganden durch Kompetition mit exogenen GAG Ketten definierter Struktur (Heparin, Heparansulfat) bezogen auf die Saccharidzusammensetzung und Sulfatierung charakterisiert werden (siehe 2.3.3).

2.3.1 Heparitinase- und Chondroitin-ABC Lyase-Behandlung von Zellen und rekombinanten Proteinen

Heparitinase- und Chondroitin-ABC Lyase-Behandlung von Zellen

Heparitinase (E.C. 4.2.2.8) ist in der Lage Heparansulfat-Seitenketten von Proteoglykanen in der EZM zu entfernen. Chondroitin-ABC Lyase (E.C. 4.2.2.4) entfernt sowohl Chondroitinsulfat, als auch Dermatansulfat und Hyaluronat von EZM-Proteoglykanen. Die Entfernung dieser sulfatierten, stark negativ geladenen Seitenketten verringert die Bindung von Proteinen, die in Abhängigkeit dieser Zucker mit den Zellen interagieren. Tag 2 Monozyten und Tag 10 reife/unreife DCs werden in einer Dichte von $3x10^6$/500 µl in Eppendorf Reaktionsgefäßen resuspendiert. 60 mM/ml Heparitinase oder 100 mM/ ml Chondroitin-ABC Lyase werden hinzugegeben und die Zellen auf einem Überkopfschüttler bei 37°C für 60-90 min inkubiert. Kontrollinkubationen werden identisch behandelt, jedoch ohne Zusatz von Enzymen. Nach der Behandlung werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und die APRIL bzw. TACI Bindung mittels FACS analysiert (siehe 2.2.6). In einigen Experimenten wird ein Teil der Zellen lysiert und die Proteinkomponente der Proteoglykane im Western Blot mittels spezifischer AK nachgewiesen.

Heparitinase-Behandlung von rekombinanten Proteinen

Um festzustellen, ob die rekombinanten Proteine nach Aufreinigung noch HSPGs gebunden hatten, wurden diese über Nacht (üN) mit Heparitinase behandelt. Dazu wurde das Protein in 10 µl Heparitinase Puffer (100 mM Natriumazetat, 10 mM Kalziumazetat pH 7) aufgenommen und 50 mU Heparitinase zugegeben. Kontrollinkubationen wurde kein Enzym zugefügt. Nach üN Inkubation bei 37° im Brutschrank wurde der Verdau durch Zugabe von 10 µl 4x RSB (engl.: reducing sample buffer) und 10 min Inkubation bei 70°C gestoppt. Die Proteine wurden au einem SDS-PA-Gel separiert und die verdauten Heparansulfat-Seitenketten (ΔHS) der Proteoglykane mit dem 3G10 Antikörper im Western-Blot detektiert.

Heparitinase-Behandlung nach Immunpräzipitation
(siehe 2.4.4).

2.3.2 Chlorat-Behandlung von Zellen

Natriumchlorat wird dazu verwendet, die Sulfatierung von GAG-Ketten auf Monozyten und DCs zu verhindern. Das Chlorat Ion kompetitiert mit Sulfat um die Erkennung durch die ATP-Sulfurylase (Rapraeger et al., 1991). Dadurch wird verhindert, dass Sulfat mit ATP im Zytosol Adenosin 5'-phosphosulfat formt und durch nachfolgende Phosphorylierung 3'-phosphoadenosin 5'-phosphosulfat (PAPS) bildet (Farley et al., 1978). Chlorat inhibiert daher die Formierung des Haupt-Sulfatgebers PAPS für zelluläre Sulfatierungsreaktionen im Golgi (Hirschberg et al., 1998). Der Effekt von Chlorat auf die Sulfatierung kann erhöht werden, indem sulfatfreies Medium während der Behandlung eingesetzt wird. In dem hier benutzten Medium wurde 0,407 mM Magnesiumsulfat als eine Sulfatquelle durch 0,407 mM Magnesiumcarbonat ersetzt. Allerdings wurde die Konzentration von Cystein (0,208 mM) im Medium beibehalten, weshalb die Sulfhydrylgruppe (-SH) im Cystein als Sulfatquelle in Frage kommt. Desweiteren wird dialysiertes FCS (MWCO 10000) verwendet um eine weitere Sulfatquelle auszuschließen.
Monozyten und DCs werden für 48h in sulfatfreiem Medium in Abwesenheit oder Anwesenheit von 50 mM Natriumchlorat kultiviert. Kontrollinkubationen wird nach 24h 20 mM Natriumsulfat zugefügt, welches als externe Sulfatquellen für die ATP-Sulfurylase diente.

2.3.3 Kompetition mit exogenen Glykosaminoglykan-Ketten

GAGs definierter Zusammensetzung bezogen auf ihre Disaccharide und Abfolge der Sulfate wurden mit rekombinantem APRIL für 30 min bei 4°C präinkubiert, bevor APRIL für die Oberflächenfärbung (siehe 2.2.6) von Monozyten und DCs eingesetzt wurde. GAGs die verwendet wurden waren: Heparin und Heparansulfat

2.4 Herstellung rekombinanter Proteine

2.4.1 Verwendete Konstrukte

Es wurden folgende Fusionsproteine mittels PCR und den oben beschriebenen Klonierungstechniken hergestellt:

Name	Bereich (aa)	Vektor
Flag-IZ-APRIL	110-250	pcDNA3.1-pEF1
Flag-IZ-APRIL 3K→A	110-250	pcDNA3.1-pEF1
Flag-IZ-BAFF	136-285	pcDNA3.1-pEF1
TACI-Fc	2-118	pcDNA3.1-pCMV
TACI-Fc 3R→A	2-118	pcDNA3.1-pCMV
BCMA-Fc	2-54	pcDNA3.1-pCMV
Fn14-Fc	28-75	pcDNA3.1-pCMV
DR6-Fc	42-335	pcDNA3.1-pCMV

Alle Fusionsproteine enthalten das Signalpeptid von TRAIL-Rezeptor-2 (aa 1-55). Bei APRIL handelt es sich um Isoform-α.

2.4.2 Expression der Proteine in HEK293T-Zellen

Für die transiente Transfektion der Flag-IZ-APRIL/-BAFF, TACI-/BCMA-/Fn14-/DR6-Fc, APRIL Isoform-α, APRIL Isoform-β und BAFF kodierenden Plasmide wurde die Calcium-Phosphat Methode verwendet. Einen Tag vor der Transfektion wurden $6x10^6$ HEK293T Zellen pro 150 cm^2 Flasche ausgesät. Hatten die Zellen eine Konfluenz von 80-85% erreicht wurde die Transfektion durchgeführt. Eine Stunde vor der Transfektion wurde das Kulturmedium abgenommen und durch 18 ml DMEM/10% FCS/25mM Chloroquin ersetzt. Das Chloroquin erhöht die Transfektionseffizienz durch Bindung an die DNA (Cohen et al., 1965) und verhindert ihre Degradation in Lysosomen. 80 µg Plasmid-DNA wurden mit 100 µl 2,5 M $CaCl_2$, 1 ml pyrogenfreiem Wasser und 1 ml 2x HBS (280 mM NaCl, 100 mM Hepes, 1,5 mM Na_2HPO_4, pH 7,12) gemischt. Dabei wurde das 2xHBS tropfenweise unter ständigem Mischen der DNA-Lösung zugefügt, um sehr kleine DNA-Calcium-Phosphat Kristalle zu erhalten. Die DNA-Lösung wurde zu den Zellen gegeben und diese für 16-20 h im Brutschrank inkubiert. Am Tag nach der Transfektion wurde das Medium entfernt und die Zellen, die mit Flag-Konstrukten transfiziert wurden, in DMEM/10% hitzeinaktiviertem FCS kultiviert. Die Zellen, die mit Fc-Konstrukten transfiziert wurden erhielten DMEM/5% FCS mit geringem Anteil an bovinen Immunglobulinen, um eine Kontamination der mittels Protein-G aufgereinigten Fc-Proteine mit Rinder Immunglobulin zu vermeiden. Zur Gewinnung der rekombinanten Proteine wurden die transfizierten Zellen 4 Tage kultiviert, der Überstand gesammelt und die Zellen weitere 3 Tage kultiviert.

2.4.3 Reinigung der Fusionsproteine

Alle Puffer zur Reinigung von rekombinanten Proteinen wurden entgast (Vakuum-Kammer, Nalgene™, Rochester, USA) und gefiltert (0,22µm Filter, Millipore). Die Aufreinigung der rekombinanten Proteine erfolgte im Batch-Verfahren. Jeweils 100 µl Protein-G Beads (für die Aufreinigung der Fc-Proteine) bzw. 100 µl M2 Sepharose (für die Aufreinigung der Flag-Proteine) wurden zu 50 ml HEK293T Überstand gegeben und dieser über Nacht bei 4°C rotiert. Am nächsten Tag wurden die Beads 5x mit TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 4°C, pH 7,4) gewaschen, in 1 ml 0,1 M Glycin pH 3 (Flag-IZ-Proteine) und 1 ml 0,1 M Glycin pH 2,5 (Fc-Proteine) eluiert und sofort mit 1 M Tris pH 9 neutralisiert. Alle Proteine außer Flag-IZ-BAFF wurden gegen PBS pH 7,5 bei 4°C dialysiert. Dem Dialysepuffer von Flag-IZ-BAFF wurde 5 mM $MgCl_2$ hinzugefügt, welches zur Stabilisierung der dreidimensionalen Struktur von BAFF notwendig ist. Die Dialyse der Flag-IZ-Proteine erfolgte in einem Dialyseschlauch mit einem MWCO von 8000-10000 Dalton, die der Fc-Proteine in einem Dialyseschlauch mit einem MWCO von 12000-14000 Dalton. Nach der Dialyse wurden die rekombinanten Proteine mit Hilfe eines Vivaspin Concentrators bei 3000 rpm/ 4°C/ Varifuge 3.OR auf 0,5-1 ml eingeengt, danach sterilfiltriert und der Proteingehalt photometrisch mit dem Bradford Reagenz (Pierce) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Die Proteine wurden in silikonisierten Eppendorfgefäßen (Costar) aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1 Herstellung von Zelllysaten

Monozyten, unreife und reife DCs sowie mit APRIL und BAFF transfizierte HEK293T-Zellen wurden geerntet und dreimal mit eiskaltem PBS bei 1000 rpm/ 5 min/ 4°C/ Varifuge 3.OR gewaschen. Die Zelllysate wurden hergestellt, indem das Zellpellet in 100 µl Lysepuffer pro $1x10^7$ Zellen resuspendiert wurde. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Lysate bei 23300 rpm/ 15 min/ 4°C/ Biofuge Stratos zentrifugiert, um die Zellkerne zu entfernen. Die Proteinkonzentration in den Lysaten wurde mittels der BCA-Methode (Pierce) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Die Lysate wurden bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen durch Gelelektrophorese erfolgte modifiziert nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970). Es wurden 4-12% NuPAGE Bis-Tris Gradientengele (Novex, Invitrogen) verwendet. Diese wurden aus der Schutzfolie entnommen, der 10-/12- Loch-Kamm wurde entfernt und die Taschen vor dem Einspannen in die Gelkammer mit VE-Wasser ausgespült. Die im SDS-Probenpuffer

gelösten rekombinanten Proteine bzw. Zelllysate wurden nach Hitzedenaturierung (10 min bei 70°C) auf das Gel aufgetragen. Der Lauf der Gele erfolgte in MES- oder MOPS-Puffer bei 120 mA für 1h in Novex-Mini-Gelkammern.

2.5.3 Western-Blot, Coomassie-Färbung

Der Transfer von Proteinen aus Acrylamidgelen auf Membranen erfolgte nach dem Elektrotransfer nach Towbin (Towbin et al., 1979) in Form eines Nasstransfers im Novex-Gelsystem. Dazu wurden die Graphitelektroden der Blotkammer mit Transferpuffer befeuchtet und nacheinander drei in Transferpuffer getränkte Schwämme, drei Filterpapiere (Whatman), die mit Transferpuffer befeuchtete Nitrozellulosemembran (Amersham, Freiburg), das Polyacrylamidgel, wieder drei Filterpapiere und abschließend erneut drei getränkte Schwämme gelegt. Der Aufbau wurde in die Apparatur eingehängt. Der Transfer erfolgte bei 28 V für 1 h 30 min. Danach wurde die Membran kurz in Wasser gespült und durch eine Ponceau Färbung die erfolgreiche Übertragung der Proteine überprüft. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation für 1 h mit 5% (w/v) Milchpulver in PBS/Tween (0,05% Tween-20 in PBS) bei Raumtemperatur abgesättigt. Der Blot wurde mit PBS/Tween gewaschen und mit den Erstantikörpern (in PBS/Tween, 3% Milchpulver, 0,05% Natriumazid) über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde fünfmal je 3 min mit PBS/Tween gewaschen. Anschließend wurde der Blot mit einem Peroxidase konjugierten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:20000 in PBS/Tween und 1% Milchpulver) für 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert und der Blot fünfmal je 3 min mit PBS/Tween gewaschen. Die Detektion erfolgte mit dem Chemolumineszenzsubstrat durch 1:1-Mischen des ECL-Reagenz A und ECL-Reagenz B (Perbio Science, Bonn). Der Blot wurde darin fünf Minuten inkubiert und auf Röntgenfilmen exponiert. Für das mehrfache Verwenden eines Blots, wird die Membran für 20 min bei Raumtemperatur in 50 mM Glycin pH 2,3 inkubiert, wodurch die Antikörperkomplexe entfernt werden. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS/Tween und Inkubation in 5% (w/v) Milchpulver/PBS/Tween ist der Blot mit neuem Antikörper analysierbar.

Coomassie-Färbung

Durch die Coomassie Färbung können Proteine direkt im SDS-Polyacrylamidgel sichtbar gemacht werden. Der Farbstoff bindet an kationische und nichtpolare hydrophobe Seitenketten der Proteine und wird dadurch stabilisiert. Dieses Bindungsverhalten bedingt eine proteinabhängige Anfärbbarkeit von Proteinen. Das Gel mit den elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen wird 3x für 5 min in 100 ml VE-Wasser gewaschen. Dann wird die Färbelösung (s.u.) zugegeben und das Gel für 1-3 h darin inkubiert. Das Gel wird mit VE-Wasser über Nacht entfärbt und anschließend für die Analyse gescannt und getrocknet.

Färbelösung
Lösung 1: 150 mM Zitronensäure in 1L Millipore Wasser pH 2,1 lösen
Lösung 2: 60 mg Coomassie G250 in 25 ml Ethanol lösen und zu Lösung 1 geben

2.5.4 Immunpräzipitation (IP)

IP rekombinanter Proteine mit Protein-G Beads

Um festzustellen, ob die affinitätsgereinigten rekombinanten Fc- und Flag-Fusionsproteine funktionell aktiv sind, wurden sie hinsichtlich Ihrer Fähigkeit überprüft ihren respektiven rekombinanten Rezeptor bzw. Liganden zu binden. Dazu wurden jeweils das Rezeptor-Fc-Fusionsprotein und der Flag-Ligand zusammengegeben und der entstehende Komplex aus Rezeptor und Ligand mittels Protein-G Beads immunpräzipitiert. Dafür wurden pro Ansatz 5 µl Protein-G Beads, 0,5-1 µg TACI-Fc bzw. BCMA-Fc und 0,2-0,5 µg Flag-IZ-APRIL bzw. Flag-IZ-BAFF in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß üN in 1,5 ml Lyspuffer (0,01% Triton-X 100) bei 4°C auf einem Überkopfschüttler (Neolab, Heidelberg) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Beads für 1 min bei 2000 rpm / 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Beads mindestens 5 x in Lysepuffer (0,01% Triton-X 100) gewaschen und zuletzt trocken gesaugt. Die Proteinkomplexe wurden anschließend durch Zugabe von 50 µl 2 x SDS-Probenpuffer und Inkubation bei 70°C/10 min eluiert, denaturiert und auf ein SDS-PA-Gel aufgetragen.

IP aus Zellkulturüberständen primärer Monozyten und Dendritischer Zellen

Zellkulturüberstände (je 3 ml/ IP) von Monozyten ($1x10^6$/ml) die für 1, 3, 5 und 7 Tage in IL4 (160U/ml) + GM-CSF (1000U/ml) kultiviert wurden, um unreife DCs zu generieren, sowie Überstände von Tag 10 reifen und unreifen DCs wurden mit an 20 µl Protein-G Beads vorgekoppelten rekombinanten 1 µg TACI-Fc, 1 µg BCMA-Fc und 1 µg BR3-Fc Proteinen über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Rezeptor-Immunpräzipitate fünfmal mit PBS/0,01% Triton-X gewaschen bevor sie von den Beads durch Zugabe von 60 µl 2x RSB und 10 min Inkubation bei 70°C eluiert wurden.
In einigen Experimenten wurde das Immunpräzipitat mit Heparitinase verdaut, um festzustellen, ob das von Monozyten produzierte und immunpräzipitierte APRIL HSPGs gebunden hat. Das Immunpräzipitat wurde dazu fünfmal mit PBS/0,01% Triton-X 100 und darauffolgend zweimal mit Heparitinase Puffer (100 mM Natriumazetat, 10 mM Kalziumazetat pH 7) gewaschen bevor 100 µl Heparitinase Puffer und 20 mU Heparitinase zugegeben wurden. In Kontrollinkubationen wurden die TACI-/BCMA-/BR3-Fc Proteine ebenso mit Heparitinase behandelt. Nach Inkubation bei 37°C üN auf einem Schüttelinkubator (800 rpm) wurde der Verdau durch Zugabe von 25 µl 4x RSB

und 10 min Inkubation bei 70°C gestoppt. Die Proteine wurden auf einem SDS-PA-Gel separiert und die verdauten Heparansulfat-Seitenketten (ΔHS) der Proteoglykane mit dem 3G10 Antikörper im Western-Blot detektiert.

IP mit Heparin-Sepharose und NaCl-Elution

Die IP der rekombinanten Fusionsproteine mit Heparin-Sepharose wurde zum einen dazu genutzt, die duale Rezeptorspezifität von APRIL und TACI nachzuweisen und zum anderen dazu, deren Heparin-Bindungsstärke durch Elution mittels eines aufsteigenden NaCl Gradienten zu quantifizieren. Dafür wurde 20 µl Heparin-Sepharose üN mit 0,5 µg Flag-IZ-APRIL bzw. 1 µg TACI-Fc und Kontrollproteinen in 1 ml Heparin-Bead- (HB) Puffer (20 mM Tris-HCl/ 10 mM NaCl/ 0,005% Triton-X 100 pH 7.4) bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Beads mit HB-Puffer 5 x gewaschen.
Um die duale Rezeptorspezifität nachzuweisen wurden an Heparin-Beads gebundenes Flag-IZ-APRIL mit 1 µg BCMA-Fc und an Heparin-Beads gebundenes TACI-Fc mit 0,3 µg Flag-IZ-BAFF üN in HB-Puffer bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Beads 5 x mit HB-Puffer gewaschen, mit einer Kanüle trocken gesaugt und nach Zugabe von 50 µl 2 x RSB bei 70°C für 5 min eluiert.

Um die Heparin-Bindungsstärke zu quantifizieren wurden die gewaschenen Beads mittels eines aufsteigenden NaCl Gradienten in HB-Puffer eluiert. Dazu wurden diese mit 1 ml NaCl enthaltenen HB-Puffer für 2 min beginnend mit der niedrigsten NaCl Konzentration unter Rotation bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, dann bei 2000 rpm abzentrifugiert und das Eluat mittels Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Dafür wurden 12% (v/v) TCA (100%) zum Eluat gegeben und resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde das Präzipitat bei 23300 rpm/ 30 min/ 4°C abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Pellet 2 x mit 500 µl 100% Azeton (-20°C) gewaschen (13000 rpm/ 10 min/ 4°C). Das Pellet wurde kurz bei 60°C in einem Heizblock getrocknet, dann in 50 µl 1 x RSB resupendiert, bei 70°C für 10 min aufgekocht und nach erneuter Zentrifugation auf ein SDS-PA-Gel aufgetragen.

2.5.5 Gelfiltration

Das Prinzip der Gelfiltration beruht auf der Trennung von Proteinen aufgrund ihrer Größe. Das totale Volumen an Puffer, welches benötigt wird, um das Protein von der Gelfiltrationssäule zu eluieren, bestimmt dessen Masse. Kleine Proteine penetrieren leichter in die Hohlräume des globulären Säulenmaterials, weshalb sie langsamer als große Proteine durch die Säule wandern. Je kleiner die Proteinmasse, desto größer ist das benötigte Elutionsvolumen. Durch Nutzung von Proteinen bekannter Masse, kann deren Elutionsvolumen benutzt werden, um die Masse der zu untersuchenden Proteine zu bestimmen. Das Vorliegen von Monomeren, Multimeren oder Aggregaten in den

Flag-Protein und Fc-Protein Präparationen wurde durch Gelfiltration mit einer Superdex 200 HR 10/30 Säule (Amersham, Freiburg) und anschließender Bestimmung des Molekulargewichts der Proteine analysiert. Die Säule hat ein Gesamtvolumen von 2,4 ml und ein Ausschlussvolumen von 800 µl. Je ca. 20-50 µg Protein wurden in einem Volumen von 20 µl mit einer Hamilton-Spritze auf die Säule aufgetragen und in PBS bei 12°C aufgetrennt. Folgende Proteine wurden als Molekulargewichtsstandards (Amersham, Freiburg) verwendet:

Protein	**Molekulargewicht**
Bovine Katalase	240 kDa
β-Amylase	200 kDa
Alkohol-Dehydrogenase	150 kDa
Bovines Serum Albumin	67 kDa
Egg Albumin	45 kDa

III Ergebnisse

Schon kurz nach der Entdeckung von APRIL wurde klar, dass neben den schon bekannten Rezeptoren TACI und BCMA ein weiterer abundanter Rezeptor für APRIL, vor allem auf Tumorzellen, existieren mußte (Rennert et al., 2000). Erst vor kurzem konnten Glykosaminoglykane (GAGs) als dritter APRIL-Rezeptor identifiziert werden (Hendriks et al., 2005; Ingold et al., 2005).
Auf der Suche nach dem zu Beginn der Arbeit noch unbekannten dritten APRIL-Rezeptor führte die Analyse verschiedener Immunzellen des peripheren Blutes zur Identifikation von Monozyten, die für einen Tag in Kultur gehalten wurden, als diejenigen Zellen mit der stärksten APRIL-Bindung. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der APRIL-Rezeptor auf Monozyten und auf aus diesen generierten Dendritischen Zellen (DCs) identifiziert und die Wirkung von APRIL auf diesen Zellen untersucht. Im zweiten Teil der Arbeit konnten GAG-Ketten von Proteoglykanen als dritter Bindungspartner von TACI auf Monozyten und DCs identifiziert werden.

1 Herstellung und Charakterisierung der rekombinanten Fusionsproteine

Um den noch unbekannten Rezeptor von APRIL auf Monozyten und DCs zu identifizieren, sollten im ersten Schritt APRIL und BAFF sowie die Rezeptoren TACI und BCMA rekombinant hergestellt und charakterisiert werden.
Die Liganden der TNF-Familie liegen in Lösung als Trimere vor. Es ist bekannt, dass die Aktivität der TNF-Liganden TRAIL, CD95L und CD40L durch Anfügen eines Isoleuzin-zipper (IZ)-Trimerisierungsmotivs signifikant gesteigert werden kann (Armitage, 1994; Morris et al., 1999). Das IZ-Peptid bildet eine stabile trimerisierte, nicht-kovalent verbundene *coiled-coil*-Struktur in Lösung (Suzuki et al., 1998). Daher wurden APRIL und BAFF N-terminal mit einer stabilisierenden IZ-Trimerisierungsdomäne fusioniert (**Abb.10B**). Das Anfügen eines Flag-Tag N-terminal zum IZ dient der Reinigung und späteren Detektion von rekombinantem APRIL und BAFF.
An den C-Terminus der Rezeptoren TACI und BCMA wurde die Fc-Domäne von huIgG1 fusioniert (**Abb.10A**). Durch die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den Fc-Monomeren liegt das Rezeptor-Fc-Fusionsprotein als Dimer vor. In **Abbildung 10** sind die Plasmide und die Fusionsproteine schematisch dargestellt. Die Klonierung ist unter Material und Methoden 2.1.8 und 2.1.10 beschrieben.

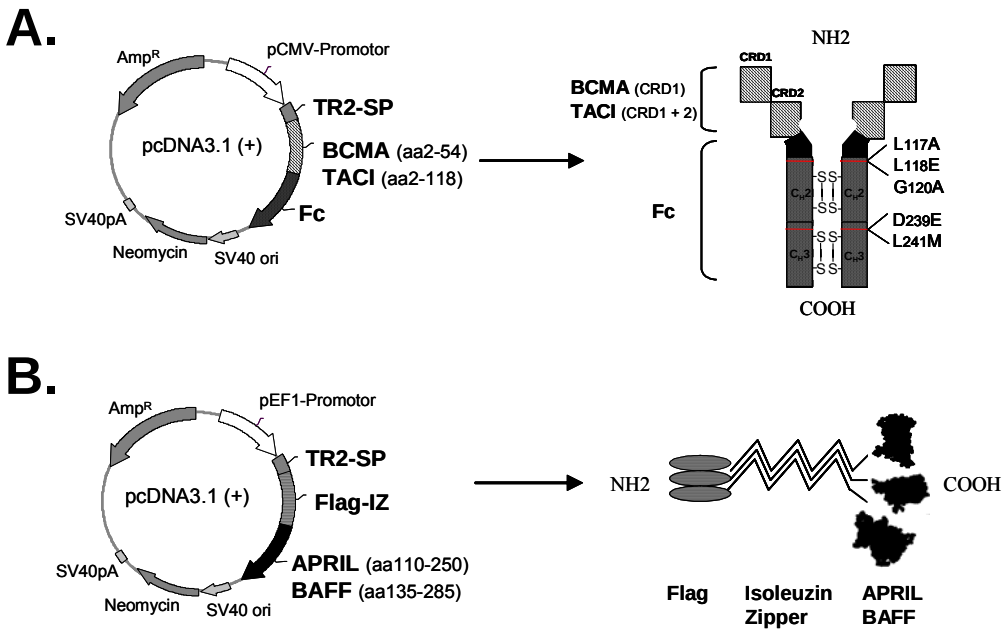


Abbildung 10: Schematische Darstellung der TACI-Fc, BCMA-Fc, Flag-IZ-APRIL und Flag-IZ-BAFF kodierenden Plasmide und der Struktur der produzierten Proteine.
(A) Die DNA-Konstrukte für die humanen TACI- und BCMA-Rezeptor-Fc-Fusionsproteine setzen sich aus dem für das Signalpeptid (SP) kodierenden Anteil des TRAIL-R2, aus einem für die extrazelluläre Domäne des jeweiligen Rezeptors kodierenden Anteil (CRD1,CRD2) und einem für das Fc-Teil von huIgG1 kodierenden Anteil zusammen. Das Fc-Teil enthält drei Mutationen am Übergang Hinge-C_H2 (L117A/ L118E/ G120A), welche die Bindung an Fc-Rezeptoren stark vermindern. In der C_H3 Region besteht desweiteren ein Polymorphismus (D239E, L241M).
(B) Die DNA-Konstrukte für die Flag-IZ-APRIL und Flag-IZ-BAFF Fusionsproteine enthalten ebenfalls das SP von TRAIL-R2, ein FLAG-Tag, ein Isoleuzin-Zipper (IZ) Trimerisierungsmotiv und die extrazelluläre Domäne von humanem APRIL oder humanem BAFF. Die Klonierungsstrategie für die Liganden und die Rezeptoren ist unter Methoden 2.1.8 und 2.1.10 beschrieben. Zur Herstellung der rekombinanten Liganden- und Rezeptor-Fusionsproteine wurden HEK293T-Zellen mit den für die jeweiligen Proteine kodierenden Plasmiden transfiziert. Nach vier und nach sieben Tagen erfolgte die Ernte der rekombinanten Proteine und deren anschließende Reinigung mittels Protein-G-Sepharose (für die Rezeptor-Fc-Fusionsproteine) bzw. M2-Sepharose (für die Flag-IZ-Liganden) aus den Kulturüberständen (siehe Methoden 2.4.3).

1.1 Biochemische Charakterisierung der rekombinanten Proteine

Die Fusionsproteine wurden mittels Affinitätsaufreinigung aus HEK293T-Kulturüberstand isoliert (siehe Methoden 2.4.3).
Die APRIL- und BAFF-Fusionsproteine zeigen nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung im reduzierten im Vergleich zum nicht-reduzierten Zustand keinen Unterschied im Laufverhalten (**Abb.11A**). Sie liegen v.a. als Monomer (~ 30kDa) ein geringer Anteil als Dimer (~50kDa) (**Abb.11A**) und auch als Trimer (~70) (nur im Western Blot sichtbar, Daten nicht gezeigt) vor.
Die Rezeptor-Fc-Fusionsproteine zeigen im nicht-reduzierten im Vergleich zum reduzierten Zustand ein unterschiedliches Laufverhalten (**Abb.11A**), denn reduziert liegen die kovalent durch Disulfidbrücken verbundenen Rezeptor-Fc-Fusionsproteine als Monomere (~ 43 kDa; **Abb.11A**), nicht-reduziert als Dimere (~65 kDa; **Abb.11A**) vor.

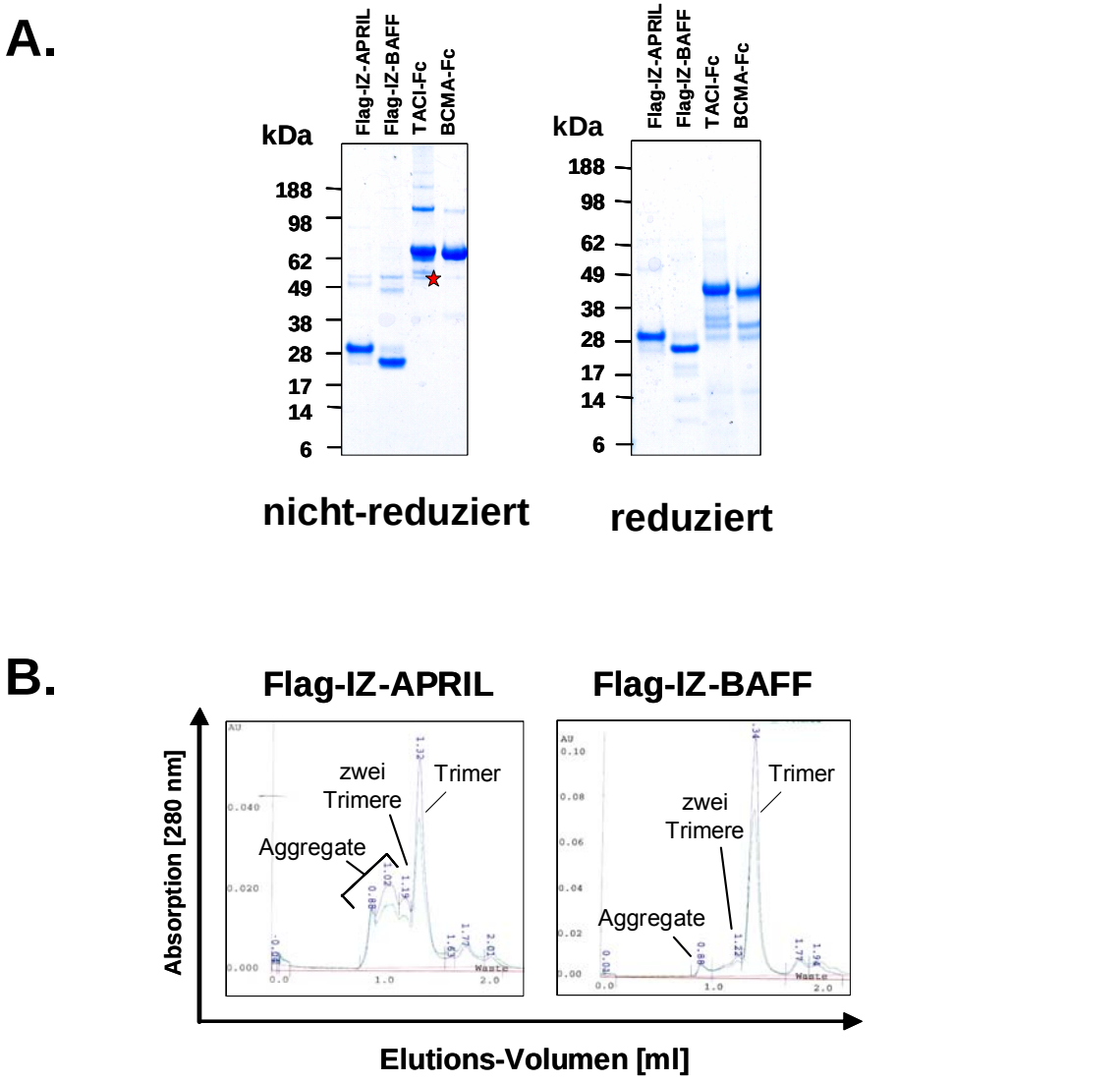


Abbildung 11: Proteinbiochemische Analyse und Gelfiltration der gereinigten Proteine.
(A) Für die Analyse der rekombinanten Proteine mittels Coomassie-Färbung wurden jeweils 2 µg Flag-IZ-APRIL bzw. Flag-IZ-BAFF und 5 µg TACI-Fc bzw. BCMA-Fc unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert. **(B)** Jeweils 20 µg Flag-IZ-APRIL und Flag-IZ-BAFF wurden auf eine Superdex 200 Sepharose Säule aufgetragen. Nach Beendigung der Gelfiltration wurde mit Hilfe von Molekulargewichtsstandards (siehe Methoden 2.5.6) das Molekulargewicht der Protein-Peaks bestimmt und dadurch festgestellt, in welcher Aggregatform die aufgereinigten Proteine vorliegen. Mit Hilfe der Smart Gelfiltrations-Software wurde die Fläche unter den Peaks berechnet und anhand dieses Wertes der Anteil (%) an in der Präparation vorhandenen Dimeren, Trimeren und Aggregaten bestimmt.

In der TACI-Fc-Präparation (nicht-reduziert) sind Spaltfragmente sichtbar (**Abb.11A**, roter Stern). Diese können durch eine potentielle Protease-Schnittstelle, die für die extrazelluläre Domäne von TACI ($\mathbf{K}^{107}X^{108}\mathbf{R}^{109}$) beschrieben wurde (Schneider et al., 2001; Gross et al., 2001), bedingt sein. Um welche Protease es sich handelt, ist nicht bekannt. Mittels Western-Blot Analyse konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesen Fragmenten um das Fc-Fragment handelt, da dieses nur mit einem Fc-spezifischen, jedoch nicht mit einem TACI-spezifischen Antikörper detektiert werden konnte (nicht gezeigt).

1.1.1 Analytische Gelfiltrationschromatographie der rekombinanten Proteine

Die so gereinigten APRIL- und BAFF-Fusionsproteine wurden im nächsten Schritt mittels Gelfiltration analysiert (**Abb.11B**). Die analytische Gelfiltrations-Chromatographie erlaubt den Anteil an Monomeren, Dimeren, Trimeren und Aggregaten in gereinigten Proteinpräparationen unter nativen Bedingungen festzustellen.
Es ist beschrieben, dass rekombinantes humanes APRIL Aggregate bildet (Kalled et al., 2005; Wallweber et al., 2004). Auch das hier hergestellte Flag-IZ-APRIL-Protein liegt zum großen Teil aggregiert vor (**Abb.11B**). Ungefähr 41% liegt als Trimer, ~13% als Hexamer und ~35% in Aggregaten vor. Im Gegensatz dazu eluiert Flag-IZ-BAFF vor allem als Trimer (~72%) und Hexamer (~10%) und nur ein kleiner Teil (~3,5%) ist aggregiert.

1.1.2 Funktionelle Analyse der rekombinanten APRIL-, BAFF-, TACI- und BCMA-Fusionsproteine

Zur funktionellen Analyse der affinitätsgereinigten TACI-, BCMA-, APRIL- und BAFF-Fusionsproteine wurden diese hinsichtlich ihrer Fähigkeit überprüft, ihre jeweiligen Liganden bzw. Rezeptoren zu binden. Dazu wurden die TACI- und BCMA-Rezeptor-Fc-Fusionsproteine mit Flag-IZ-APRIL, Flag-IZ-APRIL 3K→A und Flag-IZ-BAFF immunpräzipitiert. Im Flag-IZ-APRIL 3K→A-Protein wurden drei basische Aminosäuren in der HBD1 (siehe **Abb.8B**) am N-Terminus zu Alanin mutiert, um, wie von Hendriks *et al.* beschrieben, eine APRIL-Form zu generieren, deren Bindung an Heparin und Zelloberflächen-GAGs aufgehoben sein sollte. Die rekombinanten APRIL- und BAFF-Proteine wurden mit TRAIL-R2-Fc kontrollimmunpräzipitiert, um die Spezifität der Bindung nachzuweisen. Für TACI-Fc und BCMA-Fc wurde Flag-TRAIL als Negativkontrolle verwendet.
Wenn eine Interaktion von Flag-IZ-APRIL und Flag-IZ-BAFF mit TACI-Fc bzw. BCMA-Fc stattfindet, sollten die Liganden in dem SDS-PA-Gel detektiert werden. Das Ergebnis der Immunpräzipitation ist in **Abbildung 12** dargestellt.

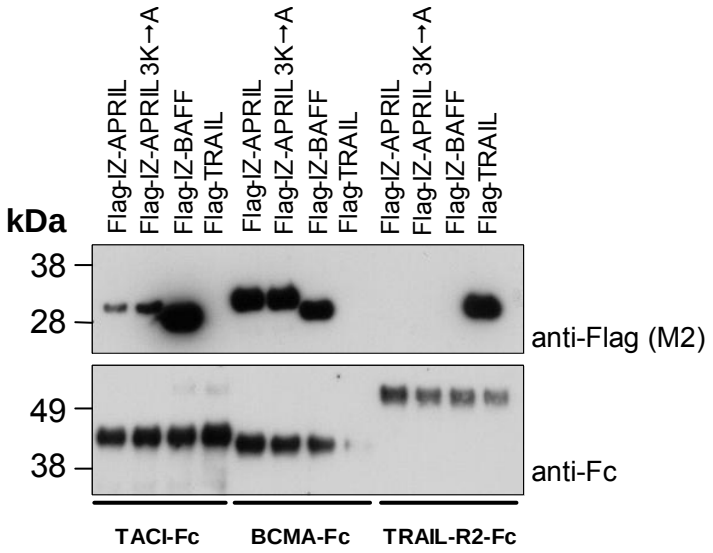


Abbildung 12: Funktionelle Testung der gereinigten Proteine.
Es wurden 200 ng Flag-Ligand mit 500 ng Rezeptor-Fc-Fusionsprotein und 10 µl Potein-G-Sepharose in 1 ml PBS/ 0,05% Triton-X100 IP-Puffer über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler immunpräzipitiert. Die Protein-G-Sepharose wurde am nächsten Tag 5x mit kaltem IP-Puffer gewaschen, die gebundenen Proteinkomplexe eluiert und auf einem 4-12%iges SDS-PA-Gel aufgetragen. Die Detektion der Proteine im Western-Blot erfolgte mit anti-Flag (M2) und anti-huIgG $F(ab')_2$ biotin (anti-Fc)

Sowohl die rekombinanten APRIL-Proteine, als auch das rekombinante BAFF interagieren mit den rekombinanten TACI- und BCMA-Fusionsproteinen. Die Interaktionen sind spezifisch, da APRIL und BAFF nicht mit TRAIL-R2-Fc interagieren und BCMA sowie TACI nicht mit TRAIL. Allerdings ist die Interaktion von APRIL und TACI unter den hier verwendeten IP-Bedingungen schwächer als die mit BCMA bzw. im Vergleich zur Interaktion von BAFF und TACI. Dies korreliert mit der schon in anderen Studien beschriebenen geringeren Affinität von APRIL für TACI im Vergleich zu BCMA und einer höheren Affinität von TACI für BAFF als für APRIL (Marsters et al., 2000; Wu et al., 2000). Weiterhin kann beobachtet werden, dass die Mutation der N-terminalen HBD1 in Flag-IZ-APRIL 3K→A keinen Verlust der Rezeptorbindung bewirkt. Ob auch das hier hergestellte APRIL-Konstrukt, wie von Hendriks *et al.* und Ingold *et al.* beschrieben mit Heparin interagiert, soll im Folgenden näher untersucht werden (Hendriks et al., 2005; Ingold et al., 2005).

1.2 Rekombinantes APRIL und dessen Heparinbindedomän-Mutante haben eine zweiseitige Rezeptorspezifität und zeigen unterschiedliche Affinität gegenüber Heparin

Sequenzen, die reich an basischen Aminosäuren sind, binden an stark negativ geladene GAGs wie Heparin oder Heparansulfat (HS) (Cardin and Weintraub, 1989). APRIL enthält am N-Terminus eine Abfolge basischer Aminosäuren $\mathbf{K}^{110}Q^{111}\mathbf{K}^{112}\mathbf{K}^{113}$, die an der Interaktion von APRIL mit GAGs beteiligt sind (Hendriks et al., 2005; Ingold et al., 2005). Mutation der N-terminalen basischen Aminosäuren zu Alanin (Hendriks et al., 2005) oder Deletion der N-terminalen Domäne (Ingold et al., 2005) in rekombinantem Flag-APRIL führte zu einem kompletten Verlust der Bindung an Heparin-Sepharose. Allerdings konnte ein synthetisches Peptid der N-terminalen Aminosäuren (aa 105-116=HBD1) die Bindung von APRIL an Zelloberflächen-GAGs nicht inhibieren (Ingold et al., 2005). Dies deutet darauf hin, dass die basische N-terminale Sequenz zwar notwendig, jedoch nicht alleine verantwortlich für die Bindung an Zelloberflächen-GAGs ist. Weitere basische Aminosäuren innerhalb der TNF-Homologiedomäne (THD) von APRIL konnten identifiziert werden, die die Interaktion von APRIL mit GAGs vermitteln ($\mathbf{R}^{146}$, $\mathbf{R}^{189}$, $\mathbf{H}^{220}$) (Ingold et al., 2005).

Es sollte nun untersucht werden, ob die in dieser Arbeit hergestellten Flag-IZ-APRIL und Flag-IZ-APRIL 3K→A ($\mathbf{K}^{110}$A, $\mathbf{K}^{112}$A, $\mathbf{K}^{113}$A) Konstrukte an Heparin-Sepharose binden. Die Avidität beider Konstrukte für Heparin sollte verglichen werden. Heparin hat eine hohe negative Ladungsdichte, weshalb es über elektrostatische Wechselwirkungen mit einer Vielzahl von Proteinen interagiert. Allerdings kann durch die Untersuchung der Bindungsstärke unter physiologischen Bedingungen (150 mM NaCl) ein erster Hinweis darauf erhalten werden, ob ein Protein an Heparin bindet und damit möglicherweise auch *in vivo* mit dem weniger stark negativ geladenen Zelloberflächen-GAG HS interagiert. Die durch ionische Wechselwirkungen an Heparin-Sepharose gebundenen Proteine können durch einen ansteigenden NaCl-Gradienten eluiert werden, wodurch die Affinität des untersuchten Proteins für Heparin beurteilt werden kann. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in **Abbildung 13A** dargestellt.
Die rekombinanten Proteine wurden durch schrittweisen Anstieg der NaCl-Konzentration von der Heparin-Sepharose eluiert, die einzelnen Fraktionen mit TCA gefällt und nach Auftrag auf einem SDS-PA-Gel mittels Western-Blot analysiert. Es zeigte sich, dass die Hauptfraktion von rekombinantem Flag-IZ-APRIL bei einer Salzkonzentration von 600 mM NaCl eluierte. Der Austausch der N-terminalen basischen Aminosäuren an den Positionen $\mathbf{K}^{110}$, $\mathbf{K}^{112}$, und $\mathbf{K}^{113}$ zu Alanin verringerte die Affinität von Flag-IZ-APRIL 3K→A für Heparin-Sepharose. Die Hauptfraktion dieser Mutante eluierte bei 200-400 mM NaCl. Um auszuschließen, dass die rekombinanten APRIL-Konstrukte aufgrund der Flag-IZ-Domäne unspezifisch mit der Heparin-Sepharose interagieren, wurde Flag-IZ-BAFF ebenso immunpräzipitiert. Es konnte keine Interaktion von Flag-IZ-BAFF mit Heparin-Sepharose nachgewiesen werden (siehe **Abb.13B**, Spalte 3).

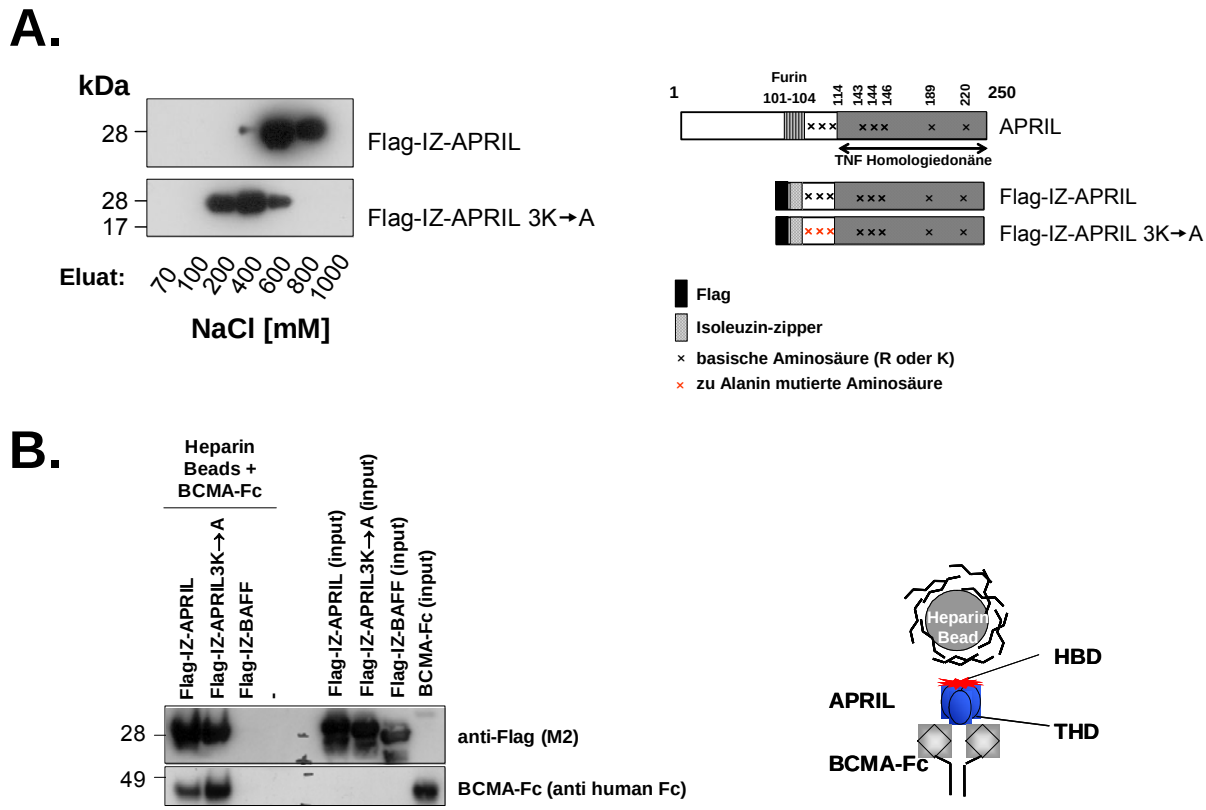


Abbildung 13: Rekombinantes APRIL zeigt unterschiedliche Affiniät gegenüber Heparin und hat eine zweiseitige Rezeptorspezifität.
(A) Je 0,5 µg rekombinantes Flag-IZ-APRIL und 0,5 µg der HBD1 Mutante Flag-IZ-APRIL 3K→A wurden üN mit 20 µl Heparin-Sepharose in HB-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4 /10 mM NaCl / 0,005% Triton-X100) immunpräzipitiert. Am nächsten Tag wurden die Beads 5 x mit HB-Puffer gewaschen und mit ansteigendem NaCl-Gradienten eluiert. Dazu wurden die an Heparin-Sepharose gebundenen Proteine beginnend mit 1 ml der niedrigsten NaCl-Konzentration für 2 min unter Rotation bei RT inkubiert und die eluierten Proteine mit TCA gefällt (siehe auch Methoden 2.5.4). Das präzipitierte Protein wurde in 50 µl SDS-Probenpuffer bei 70°C für 10 min aufgekocht. Die Detektion von Flag-IZ-APRIL erfolgte mit anti-Flag (M2). **Schema:** Repräsentation von nativem APRIL-Protein und der rekombinanten APRIL-Konstrukte.
(B) Je 300 ng Flag-IZ-APRIL, Flag-IZ-APRIL 3K→A, Flag-IZ-BAFF wurden mit 500 ng BCMA-Fc und 20 µl Heparin-Beads über Nacht bei 4°C unter Rotation in HB-Puffer immunpräzipitiert. Am nächsten Tag wurde die IP 5x mit HB-Puffer gewaschen und bei 70°C für 10 min eluiert, auf ein SDS-PA-Gel aufgetragen und gebundenes BCMA-Fc mittels anti human Fc und die Flag-IZ-Liganden mit anti-Flag (M2) im Western-Blot detektiert. **Schema:** Repräsentation der Immunpräzipitation. Es wird deutlich, dass APRIL eine zweiseitige Rezeptorspezifität hat und gleichzeitig sowohl negativ geladene GAGs (Heparin) als auch den Rezeptor BCMA binden kann.

Somit sind die hergestellten rekombinanten APRIL-Konstrukte in der Lage Heparin zu binden. Die N-terminalen basischen Aminosäuren partizipieren nur zum Teil an der Bindung an Heparin-Sepharose. Es müssen daher weitere basische Aminosäuren innerhalb der THD von APRIL für die restliche Bindung der Flag-IZ-APRIL 3K→A Mutante verantwortlich sein.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die verwendeten rekombinanten APRIL-Konstrukte Heparin binden, sollte nun untersucht werden, ob diese gleichzeitig mit Heparin und dem Rezeptor BCMA interagieren können. Im ersten Schritt wurden Flag-

IZ-APRIL, Flag-IZ-APRIL 3K→A und Flag-IZ-BAFF mit Heparin-Sepharose inkubiert. Während Flag-IZ-APRIL und die 3K→A Mutante mit Heparin-Sepharose interagierten, wurde Flag-IZ-BAFF nicht präzipitiert (**Abb.13B**, Blot anti-Flag (M2)). Um eine zweiseitige Rezeptorspezifität der rekombinanten Proteine nachzuweisen, wurden die mit den rekombinanten Proteinen inkubierten Heparin-Beads mit BCMA-Fc immunpräzipitiert. Die Inkubation mit BCMA-Fc zeigt, dass Flag-IZ-APRIL und die 3K→A Mutante BCMA-Fc vergleichbar stark binden und BCMA-Fc selbst nicht mit Heparin interagiert (**Abb.13B**, Blot anti human Fc)

Diese Daten demonstrieren, dass die hier hergestellten rekombinanten APRIL-Fusionsproteine Flag-IZ-APRIL und Flag-IZ-APRIL 3K→A in der Lage sind, gleichzeitig die zwei Rezeptorbinderegionen (THD und HBD) zu nutzen und sowohl BCMA als auch GAGs binden. Weiterhin wird deutlich, dass die HBD1 nicht alleinig für die APRIL↔Heparin Interaktion verantwortlich ist, sondern wie von Ingold *et al.* beschrieben, weitere basische Aminosäuren innerhalb der THD die Bindung von APRIL an GAGs vermitteln (Ingold et al., 2005).

Die hier hergestellten, biochemisch und funktionell getesteten APRIL-, BAFF-, TACI- und BCMA-Konstrukte sollen in den weiteren Experimenten dafür eingesetzt werden, den unbekannten APRIL-Rezeptor auf Monozyten und DCs funktionell zu charakterisieren und dessen Identität zu bestimmen.

2 APRIL bindet Monozyten und Dendritische Zellen und ist ein Überlebens- und Differenzierungsfaktor für Monozyten

Auf der Suche nach dem zu Beginn der Doktorarbeit noch unbekannten dritten APRIL-Rezeptor führte die Analyse verschiedener Immunzellen des peripheren Blutes (NK-Zellen, Granulozyten, T-Zellen, B-Zellen, Monozyten) zu der Beobachtung, dass vor allem Monozyten, die für einen Tag in Kultur gehalten wurden, eine sehr starke Bindung von APRIL zeigten, allerdings nicht mit BAFF interagierten. Dies bedeutete, dass es sich bei dem Rezeptor nicht um BCMA oder TACI, sondern um einen APRIL-spezifischen Rezeptor handelte.
Bisherige Studien zeigen, dass von Monozyten und DCs exprimiertes APRIL und BAFF in der Lage ist, B-Zellen zu aktivieren und den Immunglobulin-Klassenwechsel zu IgG, IgA (Litinskiy et al., 2002) und IgE (Castigli et al., 2005) auszulösen. Weiterhin ist bekannt, dass APRIL einen Wachstumsfaktor für Megakaryozyten (Bonci et al., 2004) und Tumorzellen (Hahne et al., 1998; Rennert et al., 2000) darstellt, die kein TACI und/oder BCMA exprimieren.
Ob von Monozyten und DCs exprimiertes APRIL möglicherweise einen Überlebensfaktor für diese Zellen darstellt, ist nicht bekannt. Im nächsten Schritt folgte daher die Analyse der funktionellen Rolle von APRIL für das Überleben primärer

Monozyten *in vitro*. Um dies zu untersuchen wurden in nachfolgenden Experimenten Monozyten aus dem Blut von humanen Spendern isoliert und *in vitro* zu DCs differenziert. Es sollte untersucht werden, zu welchen Zeitpunkten der Differenzierung und Aktivierung APRIL exprimiert wird und es an den APRIL-spezifischen-Rezeptor auf Monozyten und DCs bindet.

2.1 Expression von APRIL und BAFF in primären Monozyten und Dendritischen Zellen

Monozyten stammen von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark (KM) ab und zirkulieren für ca. 1-3 Tage im Blut (van Furth and Cohn, 1968). Nach Auswanderung in das Gewebe differenzieren Monozyten entweder zu MΦ oder myeloiden DCs (Randolph et al., 1999; Zhou and Tedder, 1996). Monozyten aus dem Blut sind in der Lage, *in vitro* zu DCs zu differenzieren. Dies ist abhängig von Signalen bestimmter Wachstumsfaktoren wie GM-CSF und IL-4 (Romani et al., 1996). Primäre humane Monozyten werden dazu für sieben Tage mit GM-CSF und IL-4 behandelt, welches die Differenzierung der Monozyten zu unreifen DCs bewirkt. Die Zellen werden dann für weitere drei Tage mit LPS oder CD40L stimuliert, um aktivierte DCs zu generieren. Um die Expression von APRIL in Monozyten und DCs festzustellen, wurde aus Monozyten (Tag 0), DCs (Tag 10) sowie aus Zellen an verschiedenen Tagen der Kultivierung mRNA isoliert und eine semi-quantitative RT-PCR durchgeführt. Außerdem wurden die Kulturüberstände gesammelt, um die Menge des von den Zellen sezernierten APRIL-Proteins festzustellen.

2.1.1 Primäre Monozyten und *in vitro* differenzierte DCs exprimieren APRIL- und BAFF-mRNA

Die semiquantitative RT-PCR-Analyse zeigte, dass die APRIL- und BAFF-mRNA zu allen Zeitpunkten der Differenzierung von Monozyten zu DCs und nach Aktivierung der DCs mit LPS oder CD40L exprimiert wird (**Abb.14**). War das Aktin-Transkript schon nach 18 Zyklen detektierbar, so konnte ein BAFF-Transkript bei beiden Donoren zu fast allen Zeitpunkten der Differenzierung nach 22 Zyklen identifiziert werden. Ein Unterschied zeigte sich jedoch in der APRIL-mRNA-Expression. Ist ein APRIL-Transkript nach 22 Zyklen von Tag 0 bis Tag 7 bei beiden Donoren detektierbar, so ist das APRIL-Transkript nach Aktivierung der DCs mit LPS im Vergleich zu unreifen DCs reduziert (siehe **Abb.14**, rote Umrandung, Tag 10, LPS). Konnte eine Reduktion des APRIL-Transkripts ebenso für die mit CD40L aktivierten DCs von Donor 11 festgestellt werden (siehe rote Umrandung, Tag 10, CD40L), so war dies nicht der Fall für die mit CD40L aktivierten DCs von Donor 5.

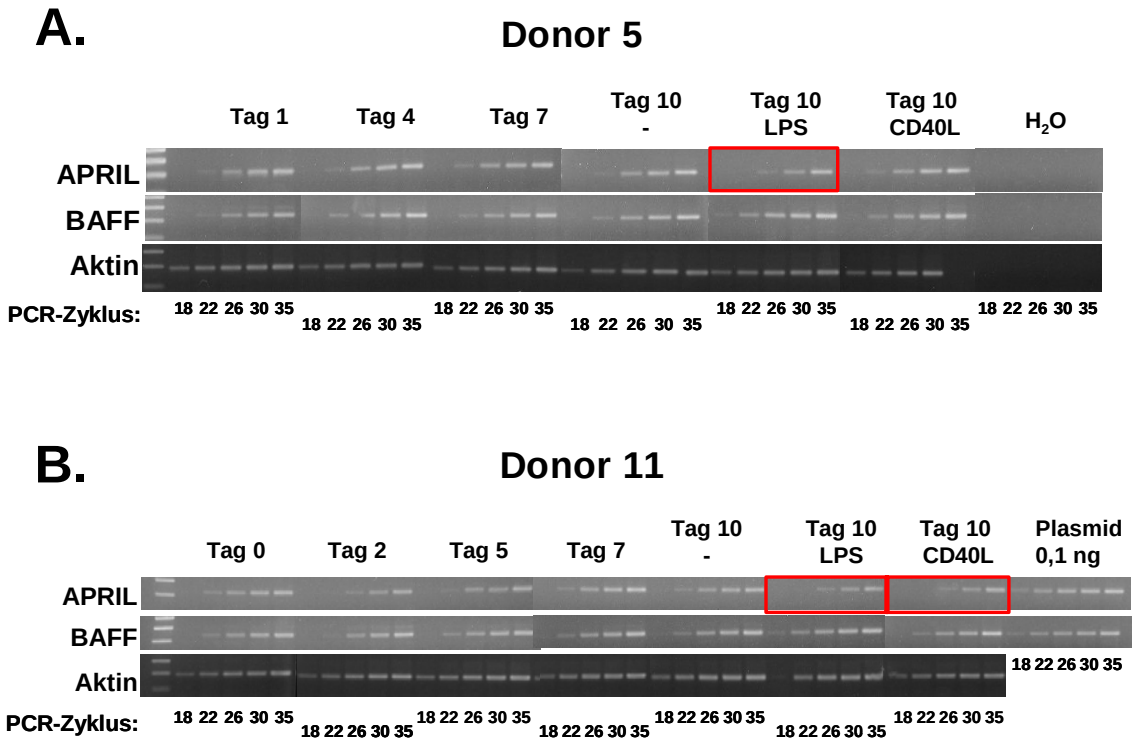


Abbildung 14: Expression der APRIL- und BAFF-mRNA in primären Monozyten und während der Differenzierung von Monozyten zu Dendritischen Zellen.
Primäre Monozyten ($1x10^6$/ml) wurden für sieben Tage in RPMI, 10% hitzeinaktiviertem FCS, 1000U/ml GM-CSF und 160U/ml IL-4 kultiviert. Nach sieben Tagen wurden die Zellen 3x mit RPMI-Medium gewaschen, auf $1x10^6$/ml eingestellt und für weitere drei Tage mit 1 µg/ml LPS (Serotyp 055:B5) und 1 µg/ml LZ-CD40L kultiviert, um reife DCs zu generieren. An den angegebenen Tagen wurden jeweils $3x10^6$ Zellen abzentrifugiert, zweimal mit PBS gewaschen und das Zellpellet bis zur RNA Isolation bei -80°C eingefroren. Die Isolation von Gesamt-RNA und die reverse Transkription erfolgte für alle Proben am selben Tag. 1 µg RNA wurde mit der Superscript III Reversen Transkriptase nach Angaben des Herstellers in einem Volumen von 20 µl in cDNA umgeschrieben. 5 µl der cDNA wurden für die semi-quantitative PCR mit BAFF- und APRIL- spezifischen Primern (siehe Methoden 2.1.11) eingesetzt. Nach 18, 22, 26, 30 und 35 Zyklen wurden jeweils 5 µl aus dem PCR-Ansatz entnommen und auf einem 2%igem Agarosegel aufgetragen. Amplifikation von Aktin diente als Ladekontrolle. Für die Spezifitätskontrolle der APRIL- und BAFF-Primer wurde jeweils 0,1 ng Flag-IZ-APRIL und Flag-IZ-BAFF-Plasmid eingesetzt. In der Negativkontrolle wurde anstelle von cDNA 5 µl H_2O eingesetzt. **(A)** zeigt die semi-quantitative PCR von Donor 5, **(B)** die von Donor 11.

Diese Daten zeigen, dass ein APRIL- und BAFF-Transkript zu allen Zeitpunkten der Differenzierung von Monozyten zu DCs und nach Aktivierung der DCs mit LPS und CD40L exprimiert wird. Es wird deutlich, dass das APRIL-Transkript in mit LPS aktivierten DCs verringert ist. Ob die verringerte APRIL-Transkription eine Auswirkung auf die Expression des APRIL-Proteins hat und ob APRIL in dem hier verwendeten *in vitro* Kultursystem als lösliches Protein in den Überstand sezerniert wird, sowie im Lysat nachweisbar ist, wurde nachfolgend untersucht.

2.1.2 Monozyten und DCs zeigen unterschiedliche APRIL-Proteinexpression

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Monozyten und unreife DCs APRIL in den Kulturüberstand sezernieren (Huard et al., 2004). Allerdings konnte kein APRIL in Lysaten dieser Zellen nachgewiesen werden (Craxton et al., 2003). Es ist zwar bekannt, dass in Lysaten von mit LPS, CD40L und IFN-γ stimulierten DCs APRIL exprimiert wird (Craxton et al., 2003; Litinskiy et al., 2002), um welche Isoform von APRIL es sich hierbei handelt, ist jedoch nicht untersucht worden. Ebenso ist unbekannt, ob APRIL von aktivierten DCs als lösliches Protein in den Kulturüberstand sezerniert wird. Da ein APRIL-Transkript zu allen Zeitpunkten der Differenzierung von Monozyten zu DCs sichtbar war, sollte untersucht werden, welche Form von APRIL von diesen Zellen produziert wird und im Überstand bzw. Lysat sichtbar ist.
Dazu wird an verschiedenen Tagen der Differenzierung Zellkulturüberstand abgenommen und APRIL und BAFF mittels TACI-Fc immunpräzipitiert, sowie ein Teil der Zellen lysiert. Um die von Monozyten und DCs produzierten APRIL-Formen genau zu bestimmen, wurden HEK293T-Zellen mit der Isoform-α bzw. Isoform-β von APRIL kontrolltransfiziert und die APRIL-Expression im Überstand und Lysat der Transfektanten mit einem APRIL-Antikörper analysiert (**Abb.15A**). So konnte das MW der zwei Isoformen eindeutig bestimmt werden.
Die APRIL-Isoform-α ist im Lysat als lösliche, prozessierte Form (~20 kDa) und als nicht prozessiertes Protein (~30 kDa) detektierbar. Im Kulturüberstand ist nur die prozessierte Form (~20 kDa) nachweisbar (**Abb.15A**). Die APRIL-Isoform-β tritt als eine Doppelbande bei ~ 23/27 kDa im Lysat, nicht jedoch im Überstand auf (**Abb.15A**). Daher kann angenommen werden, dass es sich bei dem von Monozyten während der Reifung zu DCs sezernierten APRIL um die Isoform-α handelt (**Abb.15B**). Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch die Isoform-γ exprimiert wird, in welcher 3 Aminosäuren am C-Terminus fehlen. Ein zwischen den beiden Formen differenzierender Antikörper ist nicht bekannt.

APRIL und BAFF akkumulieren im Überstand während der Differenzierung von Tag 0 Monozyten zu Tag 7 unreifen DCs. BAFF ist hier schon nach zwei Tagen im Kulturüberstand detektierbar. Im Überstand der Monozyten einiger Donoren konnte APRIL schon nach 2 Tagen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Überraschenderweise konnte kein APRIL-Protein im Lysat dieser Zellen nachgewiesen werden.

Im nächsten Schritt sollte die Expression von APRIL in unreifen und mit LPS oder CD40L gereiften DCs untersucht werden. Dazu wurden Tag 7 unreife DCs dreimal mit Medium gewaschen, um bisher produziertes APRIL und BAFF zu entfernen. Die Zellen wurden in neuem Monozyten-Medium aufgenommen und für drei weitere Tage mit und ohne Stimuli kultiviert.

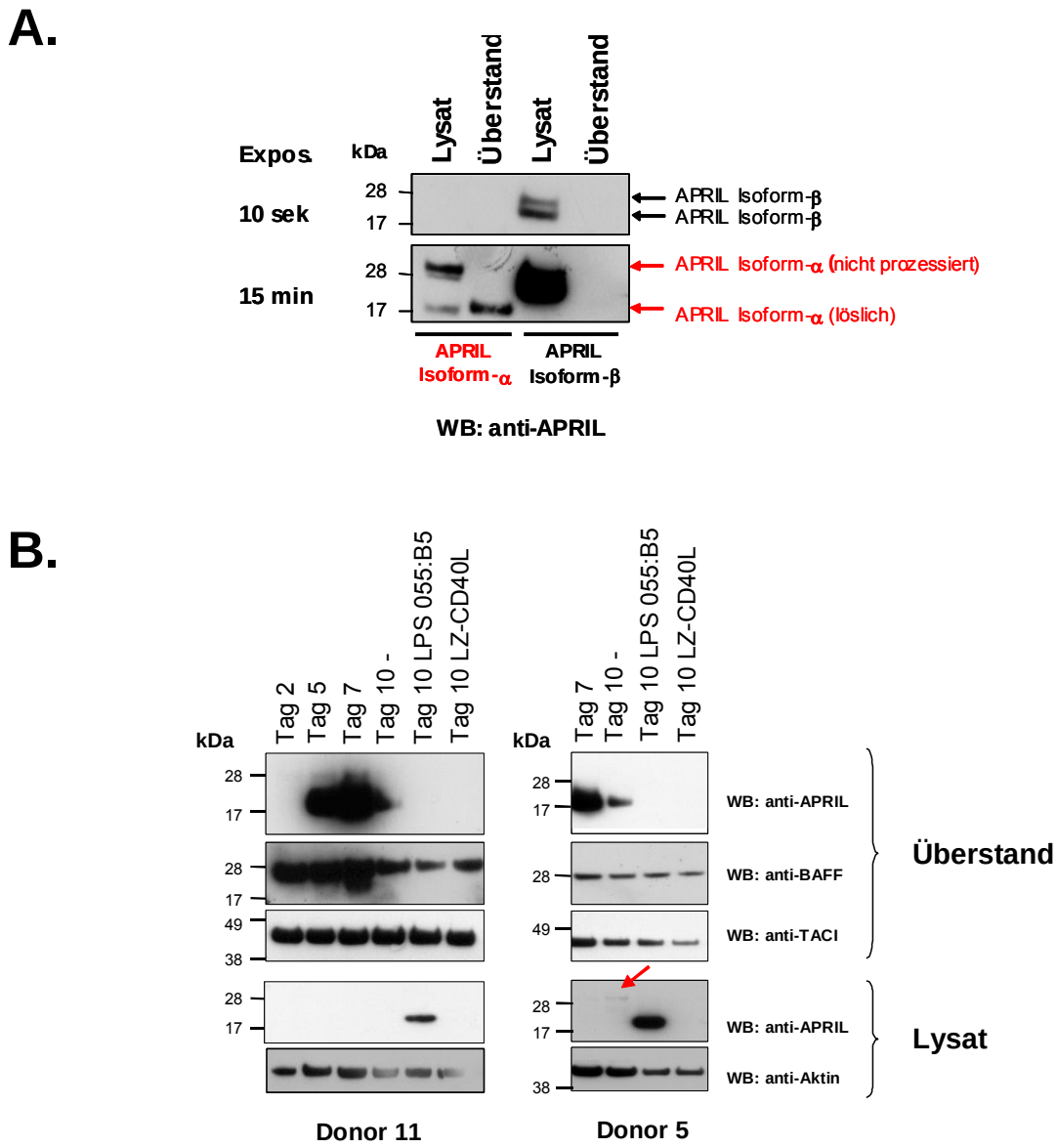


Abbildung 15: APRIL und BAFF Proteinexpression während der Reifung von Monozyten zu Dendritischen Zellen. (A) Kontrolltransfektion von APRIL Isoform-α und APRIL Isoform-β. Drei Tage nach der Transfektion mit APRIL Isoform-α und Isoform-β wurde der Überstand geerntet und die Zellen nach dreimaligem Waschen mit PBS lysiert. Jeweils 10 µl Überstand sowie 10 µl Lysat wurden auf ein 4-12%iges SDS-PA-Gel aufgetragen. Die Detektion des exprimierten Proteins erfolgte mit anti-APRIL (Aprily-1); Western Blot: 10 sek Exposition (oben), und 15 min Exposition (unten). **(B)** Nach Isolation mittels MACS® CD14-Magnetbeads wurden primäre Monozyten in einer Konzentration von $1x10^6$ Zellen/ml in Monozyten-Medium aufgenommen und in 6-Loch Platten in einem Volumen von 4 ml ausplattiert. Nach sieben Tagen waren sie zu unreifen DC differenziert, sichtbar am Verlust der CD14 Expression (nicht gezeigt). Sie wurden 3x mit Medium gewaschen, erneut auf $1x10^6$ Zellen/ml Monozyten-Medium eingestellt und wiederum in 6-Loch Platte in einem Volumen von 4 ml ausplattiert. Zugabe von 1µg/ml LPS oder 1µg/ml CD40L führte nach drei Tagen zu reifen DCs, sichtbar an morphologischen Veränderungen (zytoplasmatische Ausläufer) und verstärkter Expression von CD83, CD86 und HLA-DR (nicht gezeigt). An unterschiedlichen Tagen der Differenzierung wurden die Zellen geerntet und nach zweimaligem Waschen lysiert. An verschiedenen Tagen der Kultur wurde der Überstand mit 1 µg TACI-Fc über Nacht bei 4°C immunpräzipitiert. Nach Elution des Immunpräzipitats bei 70°C für 10' wurde dieses, sowie das Zelllysat (30 µg Gesamtprotein) auf einem 4-12%igem SDS-PA-Gel aufgetrennt und nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran die APRIL- und BAFF-Expression im Kulturüberstand mit anti-APRIL (Aprily-1) und anti-BAFF (Buffy-2) analysiert. Das für die IP benutzte TACI-Fc Protein wurde mit anti-TACI nachgewiesen. Die Detektion von APRIL in den Zelllysaten erfolgte mit anti-APRIL (Aprily-1) und als Ladekontrolle diente Aktin.

Obwohl ein APRIL-Transkript in unreifen und mit LPS oder CD40L aktivierten DCs exprimiert wird (siehe **Abb.14**), ist die APRIL-Isoform-α (~20 kDa) nur im Überstand unstimulierter Tag 10 DCs, jedoch nicht im Überstand mit LPS bzw. CD40L aktivierter Tag 10 DCs nachweisbar. Überraschenderweise ist APRIL nur im Lysat von mit LPS und nicht im Lysat von mit CD40L aktivierten DCs sichtbar. Bei einem MW von ~20 kDa muss es sich um die prozessierte APRIL-Isoform-α im Lysat von mit LPS stimulierten DCs handeln. Nur bei Donor 5 konnte im Lysat unreifer Tag 10 DCs die unprozessierte APRIL Isoform-α (~30 kDa) als schwache Bande detektiert werden (roter Pfeil). Im Gegensatz zu APRIL wird BAFF, unabhängig vom Aktivierungszustand der Tag 10 DCs, in gleichbleibender Menge in den Kulturüberstand sezerniert (**Abb.15B**).

Es zeigt sich, dass APRIL, in dem hier verwendeten *in-vitro*-Kultursystem, beginnend von Tag 2 bis zum Tag 7 im Kulturüberstand, jedoch nicht im Lysat nachweisbar ist. Dies konnte ebenfalls in zwei Studien gezeigt werden, allerdings wurde in der einen Studie nur der Kulturüberstand und in der anderen Studie nur das Lysat von Monozyten und unreifen DCs untersucht (Craxton et al., 2003; Huard et al., 2004).

In einer weiteren Studie (Litinskiy et al., 2002) wurde die unprozessierte Form von APRIL (30 kDa) im Lysat von mit CD40L stimulierten DCs detektiert. Dies konnte hier nicht bestätigt werden (siehe **Abb.15B**). In der Studie von Craxton *et al.* wurde wie hier die prozessierte 20 kDa Form von APRIL im Lysat LPS-stimulierter DCs nachgewiesen, allerdings ist nicht bekannt ob APRIL in den Überstand mit LPS und CD40L aktivierter DCs sezerniert wird.
Obwohl reife DCs APRIL-mRNA exprimieren (siehe **Abb.14**), war keine der APRIL Isoformen im Überstand mit LPS oder CD40L stimulierter Tag 10 DCs nachweisbar. Da die IP jedoch erst nach drei Tagen durchgeführt wurde, ist es möglich, dass direkt nach der Stimulation produziertes APRIL durch Proteasen zerstört wurde.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Monozyten und unreife DCs in der hier verwendeten *in vitro* Kultur APRIL- und BAFF-mRNA exprimieren und lösliches Protein sezernieren. Unter den hier verwendeten Kulturbedingungen wird die APRIL-Isoform-α in den Kulturüberstand sezerniert. Im Überstand mit LPS und CD40L stimulierter DCs ist kein APRIL-Protein nachweisbar, obwohl in diesen Zellen ein APRIL-Transkript vorliegt. Allerdings kann in LPS stimulierten DCs die lösliche Form von APRIL-Isoform-α im Lysat nachgewiesen werden.

Da die prozessierte Form von APRIL im Lysat LPS stimulierter DCs, jedoch nicht im Überstand nachweisbar war, stellte sich die Frage, ob sich APRIL im Zytoplasma befand oder auf der Zelloberfläche der stimulierten DC gebunden war. Wie zuvor erläutert, konnte eine starke Bindung von rekombinantem APRIL auf Monozyten nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass von Monozyten sezerniertes APRIL eventuell auf diese Zellen zurückbindet.
Die Oberflächenfärbung von Monozyten und DCs an unterschiedlichen Tagen der Kultur mit zwei verschiedenen APRIL-Antikörpern und anschließender FACS-Analyse

konnte jedoch kein APRIL nachweisen (Daten nicht gezeigt). Auch wenn APRIL mit den hier verwendeten Antikörpern nicht nachgewiesen werden konnte, muss dieses nicht zwangsläufig bedeuten, dass APRIL diese Zellen nicht gebunden hatte. Erstens könnte das APRIL-Epitop für die Antikörper nicht zugänglich sein, wenn APRIL an den APRIL-Rezeptor auf Monozyten und DCs bindet, zweitens ist es möglich, dass APRIL während der Färbung von dem APRIL-Rezeptor dissoziiert ist oder auch mitsamt des APRIL-Rezeptors proteolytisch von den Zellen freigesetzt wurde. Drittens wäre denkbar, dass von Monozyten und DCs exprimierte Proteasen gebundenes APRIL degradieren. Ausserdem könnte, gebundenes APRIL internalisiert und degradiert worden sein.

Um diese Fragen beantworten zu können, muss der Rezeptor von APRIL auf Monozyten und DCs bekannt sein. Daher sollte im Folgenden die Expression des unbekannten APRIL-Rezeptors auf Monozyten und DCs genauer untersucht werden.

2.2 APRIL bindet Monozyten und Dendritische Zellen

Bisher ist bekannt, dass APRIL, ebenso wie BAFF, die TNF-R-Familienmitglieder TACI und BCMA bindet. Vor kurzem konnten GAG-Ketten von Proteoglykanen als dritter APRIL-Rezeptor identifiziert werden. Es soll im Folgenden untersucht werden, ob es sich bei dem APRIL-Bindungspartner auf Monozyten und DCs um TACI oder BCMA handelt.

2.2.1 Monozyten und DCs exprimieren kein TACI oder BCMA jedoch einen induzierbaren APRIL-spezifischen Bindungspartner

Um den Rezeptor für APRIL auf Monozyten und DCs zu bestimmen, wird zuerst analysiert, ob ein TACI- bzw. BCMA-Transkript in Monozyten und DCs nachweisbar ist. Weiterhin kann durch Vergleich der Bindung von BAFF und APRIL auf Monozyten und DCs darauf geschlossen werden, ob die Proteine TACI und BCMA auf diesen Zellen exprimiert werden.

Die Analyse der TACI- und BCMA-Expression in Monozyten und DCs ergab, dass weder ein TACI- noch ein BCMA-Transkript während der Differenzierung von Monozyten zu Tag 10 unreifen und mit LPS aktivierten DCs exprimiert wurde. Allerdings war eine schwache Bande für TACI in mit CD40L stimulierten DCs sichtbar (**Abb.16A**).

Untersuchung der Bindung von APRIL und BAFF auf der Oberfläche von Monozyten und DCs gibt einen Hinweis darauf, ob TACI, BCMA oder ein weiterer APRIL-Rezeptor auf diesen Zellen exprimiert wird. Erfolgt keine Bindung von BAFF, so kann ausgeschlossen werden, dass APRIL die Rezeptoren TACI und BCMA auf Monozyten und DCs bindet
Direkt nach Isolierung der Monozyten konnte überraschenderweise keine Oberflächenbindung von APRIL nachgewiesen werden (**Abb.16B**). Erst an Tag 1 (hier nicht gezeigt) bis Tag 3 der Monozytenkultur war eine starke APRIL-Bindung zu beobachten, die bis Tag 7 der Kultur wieder abnahm (**Abb.16B**). Zu keinem Zeitpunkt der Differenzierung von Monozyten zu unreifen DCs, sichtbar an der sich verringernden CD14-Oberflächenexpression, konnte eine Bindung von BAFF nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass Monozyten während der Differenzierung zu unreifen DCs kein TACI und BCMA exprimieren und deutet auf einen APRIL-spezifischen Rezeptor hin, dessen Expression erst an Tag 1 nach der Isolation primärer Monozyten auf der Zelloberfläche durch die spezifische APRIL-Bindungskapazität sichtbar gemacht werden kann. Nach initialem Anstieg nimmt die Expression des APRIL-Bindungspartners während der Differenzierung zu unreifen DCs (Tag 7) wieder ab.
Im Gegensatz zu unreifen DCs mit einer verminderten APRIL-Bindung, führte die Stimulation mit LPS oder CD40L für drei Tage zu einem Bindungsanstieg von APRIL (**Abb.16C**)

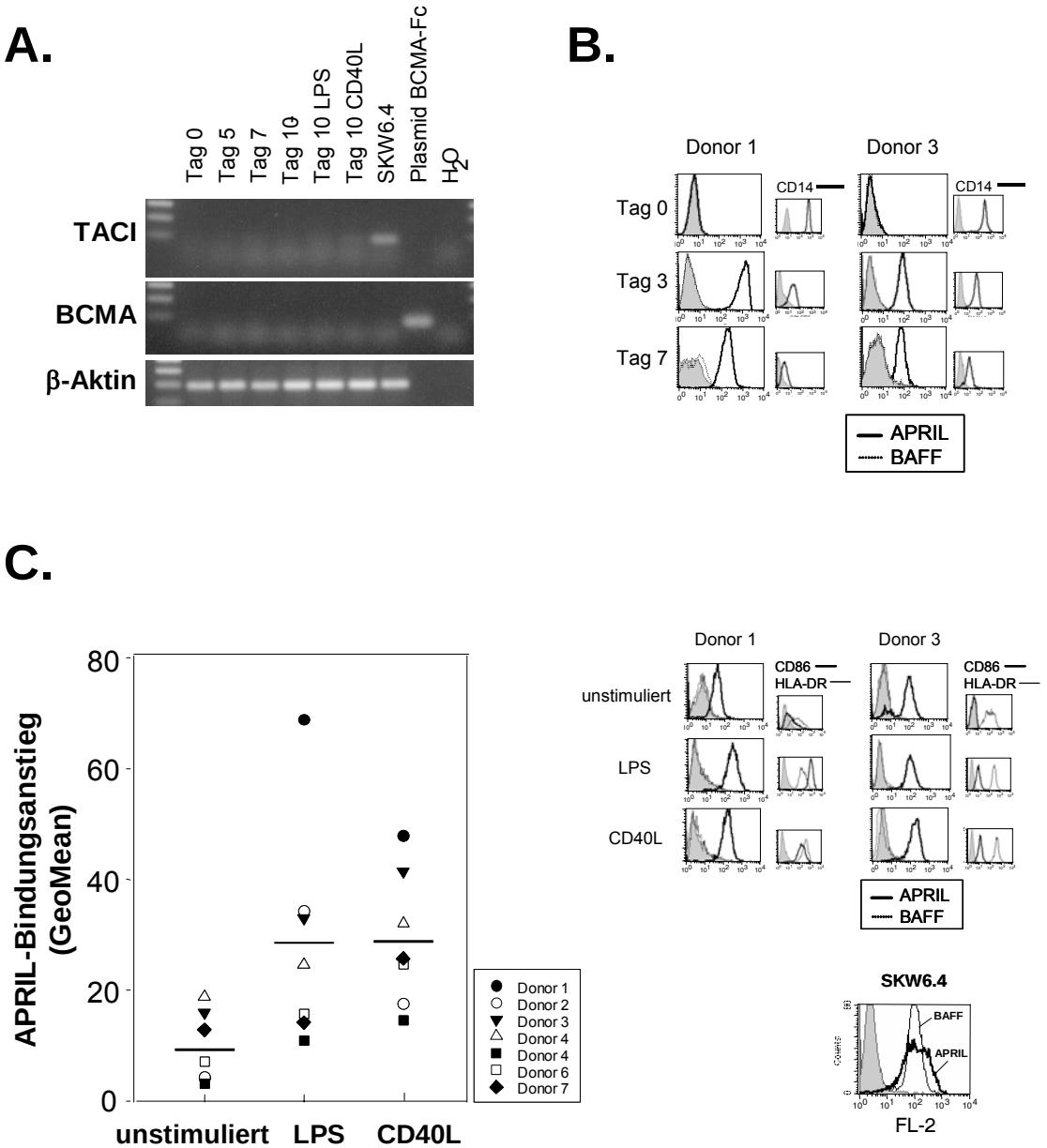


Abbildung 16: Untersuchung der TACI- und BCMA-Expression in Monozyten und Dendritischen Zellen.
(A) Die PCR zur Untersuchung der Expression von TACI und BCMA an unterschiedlichen Tagen der *in vitro* Kultur von Monozyten und DCs (Donor 3) wurde, wie unter Methoden 2.1.11 beschrieben, durchgeführt. Als Positivkontrolle für ein TACI-Transkript wurde cDNA aus SKW6.4 Zellen und für ein BCMA Transkript 2 ng des für BCMA-Fc kodierenden Plasmids verwendet. Aktin diente als Ladekontrolle. 25 µl des 50 µl PCR-Ansatzes wurden auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen. **(B)** Monozyten wurden am Tag der Isolation (Tag 0) und an Tag 3 sowie Tag 7 der Kultur auf die Bindung von Flag-IZ-APRIL untersucht. Die Analyse der APRIL-Bindung erfolgte mittels FACScan (siehe Methoden 2.2.6). Die Bindung von APRIL und BAFF ist für Donor 1 und Donor 3 im Histogramm veranschaulicht. Anti-CD14 charakterisiert die Monozyten-Population. **(C)** Oberflächenfärbung von Tag 10 unstimulierten und für drei Tage mit LPS (1µg/ml) oder CD40L (1µg/ml) stimulierten DCs (Donor 1-7). Im Scatterplot ist die Bindung von APRIL als Anstieg der Bindung im Vergleich zur Hintergundbindung des eingesetzten Detektionsantikörpers (M2) dargestellt. Der Bindungsanstieg berechnete sich aus: (GeoMean Flag-IZ-APRIL-Bindung / GeoMean Hintergrundbindung M2). Das Histogramm veranschaulicht die im Scatterplot berechneten Werte am Beispiel von Donor 1 und 3. Anti-CD86 und anti-HLA-DR charakterisieren die Population der unstimulierten und stimulierten DCs. SKW6.4 Zellen exprimieren TACI und wurden als Positivkontrolle für die APRIL und BAFF Bindung verwendet.

Diese Resultate demonstrieren, dass die Expression des APRIL-Bindungspartners abhängig vom Differenzierungsgrad der Monozyten und DCs auf der Zelloberfläche induziert wird. Direkt aus dem Blut isolierte Monozyten zeigen keine Expression des APRIL-Bindungspartners.

Bislang konnte eine spezifische Interaktion von APRIL mit GAG-Ketten auf primären T-Zellen, B-Zellen, Plasmazellen (Ingold et al., 2005) und einigen Tumorzelllinien (Hendriks et al., 2005) festgestellt werden. Ob APRIL auf Monozyten und DCs, die selbst APRIL sezernieren, ebenso mit GAG-Ketten von Proteoglykanen interagiert, ist nicht bekannt. Im Folgenden sollte analysiert werden, ob es sich bei dem noch unbekannten APRIL-Rezeptor auf Monozyten und DCs um GAG-Ketten von Proteoglykanen handelt.

2.3 APRIL bindet sulfatierte Glykosaminoglykan-Ketten von Proteoglykanen auf Monozyten und Dendritischen Zellen

Ob Zelloberflächen-GAGs für die Interaktion von APRIL mit Monozyten und DCs verantwortlich sind, wurde mit Hilfe unterschiedlicher Methoden überprüft. So wurde erstens untersucht, ob lösliche, stark sulfatierte Polysaccharide wie Heparin und Heparansulfat (HS), die Interaktion von APRIL mit Monozyten und DCs inhibieren. Heparin und HS bestehen aus alternierenden Resten von Glukuronsäure (GlcA) (oder dessen 5-Epimer Iduronsäure) und N-Azetyl-Glukosamin (GlcNAc). Heparin stellt das am stärksten sulfatierte, *in vivo* vorkommende GAG dar. Da Heparin *in vivo* nur in Mastzellen exprimiert wird und als lösliches Molekül vorkommt, ist es unwahrscheinlich, dass es den endogenen Bindungspartner von APRIL darstellt, allerdings befinden sich heparinähnliche GAGs (v.a. HS und CS) auf der Zelloberfläche vieler Zellen in Form von membrangebundenen Proteoglykanen. CS besteht aus alternierenden Resten von GlcA (oder Iduronsäure) und N-Azetyl-Galaktosamin (GalNAc). Die Zuckerreste in HS und CS können mono- oder disulfatiert sein und so neben den Carboxylgruppen zusätzliche negative Ladungen liefern. Zum Zweiten wurden die Zellen mit dem reversiblen Inhibitor der GAG-Sulfatierung, Chlorat, behandelt. Drittens wurden die Zelloberflächenproteoglykane mit Heparitinase oder Chondroitin-ABC Lyase verdaut, um die gebundenen GAG-Ketten zu entfernen.

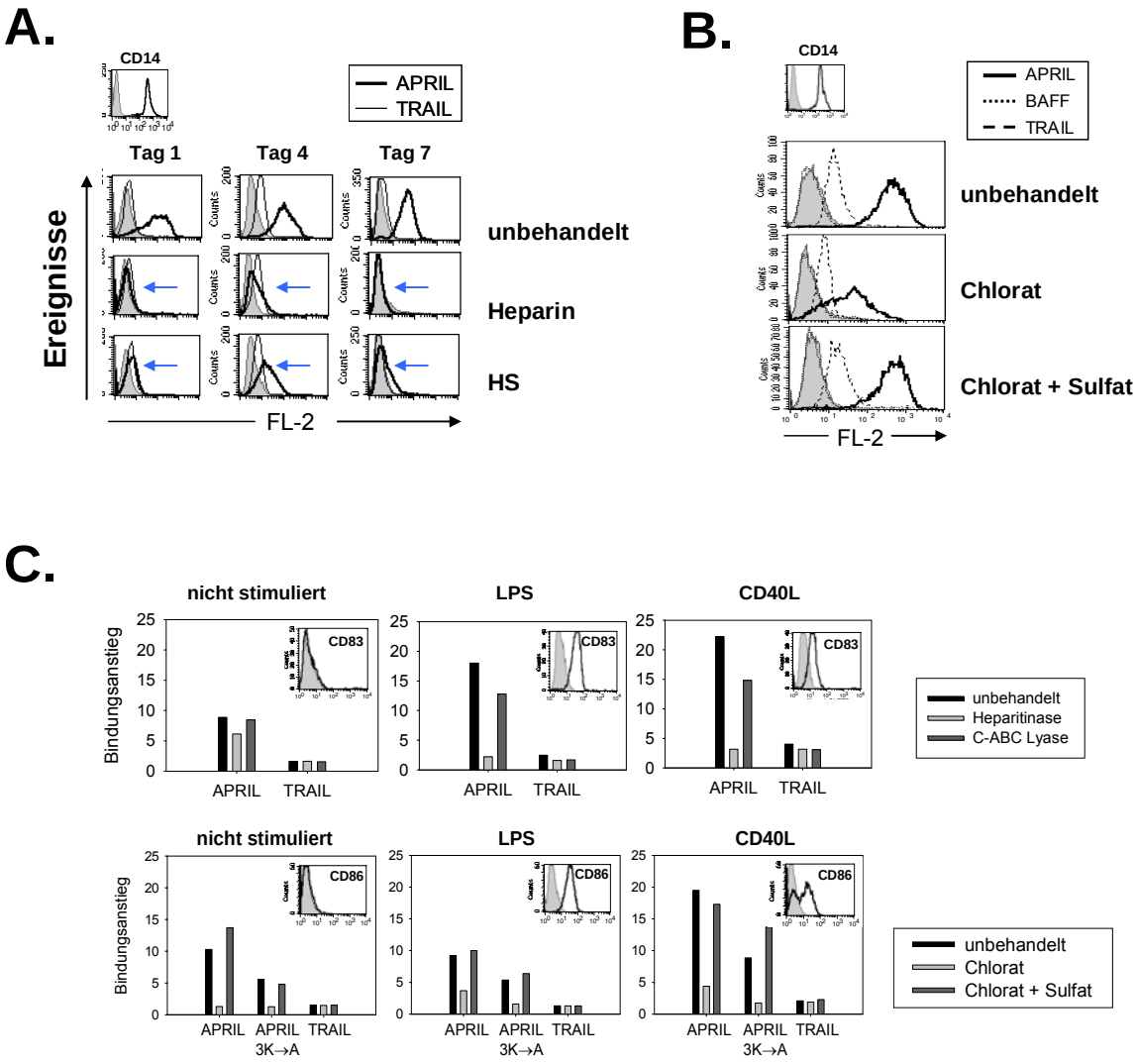


Abbildung 17: APRIL bindet GAG-Ketten von Proteoglykanen auf Monozyten und DCs. (A) Monozyten (Donor 18) wurden nach Isolation in Monozyten-Medium aufgenommen und an Tag 1, Tag 4 und Tag 7 der Differenzierung zu DCs auf die Bindung von Flag-IZ-APRIL (3 µg/ml) und Flag-TRAIL (3µg/ml) in Anwesenheit und Abwesenheit von Heparin (50 µg/ml) und HS (50 µg/ml) untersucht. Nach Präinkubation der GAGs mit Flag-IZ-APRIL bzw. Flag-TRAIL für 30 min bei 4°C wurden $1x10^5$ Zellen mit jeweils 100 µl des Präinkubationsgemisches für 20 min bei 4°C inkubiert. Die weiteren Färbeschritte sind unter Methoden 2.2.6 beschrieben. **(B)** $1x10^6$ Monozyten (Donor 13) wurden in Monozyten-Medium kultiviert und für zwei Tage entweder mit 50 mM Natriumchlorat behandelt oder den mit Natriumchlorat behandelten Zellen wurde nach 24 h 20 mM Natriumsulfat zugefügt. Nach zwei Tagen wurde die Bindung von Flag-IZ-APRIL, Flag-IZ-BAFF und Flag-TRAIL auf diesen Zellen gemessen. **(C**, oben**)** $3x10^6$ aus Monozyten (Donor 14) generierte unreife DCs (Tag 7) wurden in 3 ml Monozyten-Medium aufgenommen und für weitere drei Tage mit und ohne LPS (1µg/ ml) oder CD40L (1µg/ ml) kultiviert, um reife DCs zu generieren. An Tag 10 wurden die Zellen mit und ohne Heparitinase oder Chondroitin-ABC Lyase (C-ABC Lyase) für 60 min wie unter Methoden 2.3.1 beschrieben, behandelt. Daraufhin erfolgte die Messung der Oberflächenbindung von APRIL und TRAIL. Der Nachweis der DC Reifung erfolgte durch Färbung mit anti-CD83. Der Bindungsanstieg berechnete sich aus: (GeoMean Flag-IZ-APRIL bzw. Flag-TRAIL Bindung / GeoMean Hintergrundbindung M2). **(C**, unten**)** Monozyten (Donor 6) wurden wie in (C, oben) zu unreifen und reifen DCs differenziert. An Tag 8 wurde einigen Zellen 50 mM Chlorat und an Tag 9 einem Teil der Chlorat behandelten Zellen 20 mM Sulfat zugegeben. An Tag 10 erfolgte die Messung der Oberflächenbindung von Flag-IZ-APRIL (APRIL), Flag-IZ-APRIL 3K➝A (APRIL 3K➝A) und Flag-TRAIL (TRAIL) auf nicht stimulierten, mit LPS stimulierten und mit CD40L stimulierten DCs. Der Nachweis der DC-Reifung erfolgte durch Färbung mit anti-CD83 und anti-CD86.

APRIL wurde mit den löslichen GAGs Heparin und HS präinkubiert. Anschließend wurde die APRIL-Bindung auf Monozyten (Tag 2) überprüft. Die Vorbehandlung von APRIL mit Heparin oder HS verhindert die APRIL-Bindung auf Tag 1 Monozyten und Tag 7 unreifen DCs (**Abb.17A**). Die nicht ganz vollständige Reduktion der APRIL-Bindung auf Tag 4 Monozyten könnte einerseits auf einen weiteren APRIL-spezifischen Rezeptor hinweisen oder andererseits bedeuten, dass Tag 4 Monozyten ein spezifisches GAG-Epitop aufweisen, welches APRIL bindet und nicht durch die Heparin- bzw. HS-Vorbehandlung blockiert wurde (**Abb.17A**). Dass Heparin und HS die Bindung von TRAIL, eines weiteren Liganden der TNF-Familie, auf Tag 1 und Tag 4 Monozyten nicht inhibieren konnten, unterstreicht die Spezifität der Blockade der APRIL-Bindung (**Abb.17A**).
Die Behandlung der Monozyten mit Chlorat, einem reversiblen Inhibitor der GAG-Seitenketten-Sulfatierung (Rapraeger et al., 1991), reduzierte die APRIL-Bindung signifikant (**Abb.17B**). Die verminderte APRIL-Bindung ist spezifisch für sulfatierte GAGs, da die Bindung von Flag-TRAIL an von den Zellen exprimierten TRAIL-Rezeptoren nicht inhibiert wurde und Flag-IZ-BAFF keine Interaktion mit den behandelten und nicht behandelten Monozyten (Tag 2) zeigte (**Abb.17B**). Simultane Gabe von 50 mM Chlorat und 20 mM Sulfat, welches die Sulfatierung der GAG-Seitenketten wieder erlaubt, stellt die Bindung von APRIL auf diesen Zellen wieder her (**Abb.17B**).

Im Folgenden wurde nach dem Interaktionspartner von APRIL auf DCs gesucht. Dazu wurden aus Monozyten generierte DCs mit Heparitinase (Verdau der HS- Seitenketten von Proteoglykanen) und Chondroitinsulfat-ABC Lyase (C-ABC Lyase; Verdau der CS- und DS-Seitenketten von Proteoglykanen) sowie mit Chlorat behandelt. Proteoglykane können unterschiedliche Arten von GAG-Seitenketten enthalten, wie CS oder HS, die sich in der Art der Zucker und der Sulfatierung unterscheiden. Mit Hilfe der o.g. Enzyme, die in der Lage sind, diese spezifischen Zucker zu verdauen, kann festgestellt werden, welche Zucker an der Interaktion mit APRIL beteiligt sind.
So führte der Verdau von HS-Seitenketten mit dem Enzym Heparitinase zu einem vollständigen Verlust der APRIL-Bindung auf mit LPS und CD40L stimulierten DCs (**Abb.17C**, oben). Im Gegensatz dazu, wird die Bindung von APRIL auf unstimulierten DCs durch diese Behandlung nur um ca. 30% reduziert. Die Behandlung der DCs mit dem Enzym C-ABC Lyase reduzierte die APRIL-Bindung auf mit LPS behandelten DCs um ca. 25%, auf mit CD40L gereiften DCs um ca. 30% und zeigte keinen Effekt der APRIL-Bindung auf unstimulierten DCs. Die Bindung von TRAIL an den TRAIL-Rezeptor auf diesen Zellen änderte sich durch die enzymatische Behandlung kaum (**Abb.17C**, oben). Diese Daten zeigen, dass APRIL auf mit LPS bzw. CD40L aktivierten DCs vor allem mit HS enthaltenen Proteoglykanen (HSPG) interagiert und zu einem geringen Anteil auch über CS-haltige Proteoglykane (CSPG) bindet. Verdau nicht-stimulierter DCs mit Heparitinase oder C-ABC Lyase konnte die Bindung von Flag-IZ-APRIL auf diesen Zellen nicht signifikant reduzieren (**Abb.17C**, oben).

Die Behandlung von DCs mit Chlorat, einem reversiblen Inhibitor der GAG-Sulfatierung, führte zu einer starken Reduktion der APRIL- und APRIL 3K→A-Bindung auf nicht-stimulierten und mit LPS- bzw. CD40L-aktivierten DCs, hatte jedoch keine Auswirkung auf die Bindung von TRAIL an den TRAIL-Rezeptor (**Abb.17C**, unten). Die Zugabe von Sulfat stellte die APRIL- und APRIL 3K→A-Bindung wieder her. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Bindungsstärke der N-terminalen HBD1-Mutante Flag-IZ-APRIL 3K→A im Vergleich zu nativem APRIL reduziert, jedoch nicht aufgehoben ist (**Abb.17C**, unten). Dies deutet auf die Anwesenheit weiterer, von Ingold *et al*. beschriebener basischer Aminosäuren in APRIL hin, die an der Interaktion von APRIL mit GAGs auf diesen Zellen beteiligt sind.
Die starke Reduktion der APRIL-Bindung auf mit Chlorat behandelten (**Abb.17C**, unten), jedoch nicht auf mit Heparitinase und C-ABC Lyase behandelten (**Abb.17C**, oben) unstimulierten DCs deutet auf einen weiteren Interakionspartner von APRIL, neben HS und CS/DS, hin. Als weiteres sulfatiertes GAG würde Keratansulfat (KS) in Frage kommen.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Bindung von APRIL auf Monozyten (Tag 1) durch negativ geladene Sulfatgruppen der GAG-Seitenketten von Proteoglykanen vermittelt wird (**Abb.17A und B**). Es wird deutlich, dass die HBD1 in APRIL teilweise für die Bindung von APRIL an GAGs verantwortlich ist, da die N-terminale HBD1-Mutante eine verringerte Bindung auf DCs zeigte (**Abb.17C**, unten).

Im nächsten Schritt wurde das Anker-Protein, welches die GAG-Ketten kovalent gebunden hat genauer untersucht.

2.4 Expression von Proteoglykanen auf Monozyten und Dendritischen Zellen

Die Proteoglykane, die von Monozyten und MΦ exprimiert werden, sind zum Teil charakterisiert. Direkt aus dem Blut isolierte Monozyten exprimieren keine HSPGs auf der Zelloberfläche (Clasper et al., 1999). Erst Stimulation primärer humaner Monozyten sowie aus ihnen *in vitro* generierte MΦ mit IL-1α, TNF-α oder LPS führt nach zwei bis füng Tagen zur Expression von Syndekan-2, welches HS-Ketten gebunden hat (Clasper et al., 1999). Neben HS-Ketten haben Proteoglykane auf humanen Monozyten an Tag 1 nach der Isolation auch CS-Ketten gebunden. Schon zwei Stunden nach Isolation der Monozyten kann GAG-Neusynthese beobachtet werden (Uhlin-Hansen and Kolset, 1988). Murine peritoneal-MΦ exprimieren Syndekan-1 und -4 auf der Zelloberfläche, deren Expression nach Stimulation der Zellen noch ansteigt (Yeaman and Rapraeger, 1993a; Yeaman and Rapraeger, 1993b). Es ist nicht bekannt, welche Proteoglykane von Monozyten während der *in-vitro*-Differenzierung zu DCs und von aktivierten DCs exprimiert werden.

Um das Anker-Protein und die daran gebundenen HS-Ketten zu identifizieren, wurden Monozyten, Monozyten während der Reifung zu DCs sowie unstimulierte und mit LPS bzw. CD40L aktivierte DCs nach Heparitinase-Behandlung lysiert und das Zelllysat auf einem SDS-PA-Gel aufgetragen. Die Detektion der Anker-Proteine erfolgte mit dem Antikörper 3G10, der die HS-Seitenkettenreste erkennt, die nach Heparitinase-Verdau an den noch intakten Proteoglykanen verblieben sind.
Im Lysat von Tag 1 Monozyten und Tag 10 unstimulierter, mit LPS- bzw. CD40L-aktivierter DCs konnte nach Verdau mit Heparitinase ein HSPG identifiziert werden, welches eine Größe von etwa 42 kDa hat (**Abb.18A**) und in diesen Zellen am stärksten exprimiert wird.
APRIL zeigt starke Bindung auf Monozyten die für einen Tag in IL-4/GM-CSF-haltigem Medium kultiviert wurden (**Abb.17A**). Diese Bindung konnte u.a. durch lösliches Heparin/HS blockiert werden (siehe **Abb.17A**), ein Hinweis auf HSPG als ein möglicher Interaktionspartner von APRIL auf diesen Zellen. Allerdings scheinen Tag 1 Monozyten nur geringe Mengen HSPG zu exprimieren, da nach Verdau von Tag 1 Monozyten mit Heparitinase im WB nur eine schwache 42 kDa-Bande detektiert werden konnte (**Abb.18A**). Da beschrieben ist, dass Tag 1 Monozyten v.a. CSPG exprimieren (Kolset et al., 1983; Uhlin-Hansen et al., 1993), kann vermutet werden, dass die Proteoglykane auf Tag 1 Monozyten v.a. CS-Seitenketten gebunden haben. Dieses würde erklären, warum nach Heparitinase-Verdau im Western-Blot von Tag 1 Monozyten nur eine sehr schwache 3G10 Bande auftritt.
Im Gegensatz zu Tag 0 und Tag 1 Monozyten exprimieren Tag 10 unreife und mit CD40L- bzw. LPS-aktivierte DCs vermehrt HSPGs. Das am stärksten HS-bindende Proteoglykan auf diesen Zellen hat ein MW von ~42 kDa (möglicherweise Syndekan-4). Weiterhin exprimieren Tag 10 unstimulierte und mit CD40L aktivierte DCs ein HSPG welches ein MW von ~35 kDa aufweist (**Abb.18A**), wobei es sich um Syndekan-4 handeln könnte. Es können weitere HSPGs in Tag 10 unstimulierten und mit CD40L stimulierten DCs identifiziert werden, die ein MW von ~58 (möglicherweise Syndekan-3), ~85 (möglicherweise Syndekan-1) und ~110 kDa aufweisen (die Zuweisung der Syndekane zu den mit Heparitinase verdauten 3G10-positiven Protein-Banden in Abb.18A wurde nach [Schofield et al., 1999] vorgenommen).

Diese Daten zeigen, dass Tag 0 Monozyten keine HSPGs auf der Zelloberfläche exprimieren. Dieses Ergebnis korreliert damit, dass APRIL nicht auf Tag 0 Monozyten bindet (siehe **Abb.16B**) und bisher auch in anderen Studien auf Monozyten direkt nach der Isolation keine GAG-Ketten nachgewiesen werden konnten (Clasper et al., 1999; Uhlin-Hansen and Kolset, 1988). Tag 1 Monozyten weisen nur geringe Mengen an Proteoglykanen auf, die HS-Ketten gebunden haben, was möglicherweise bedeutet, dass eine andere Klasse von GAGs, wie z.B. CS für die starke Bindung von APRIL auf Tag 1 Monozyten verantwortlich sein könnte. Es ist beschrieben, dass Proteoglykane auf primären humanen Monozyten, die *in vitro* zu MΦ differenziert wurden v.a. CS-Ketten gebunden haben (Kolset et al., 1983; Levitt and Ho, 1983; Uhlin-Hansen et al., 1989). Weiterhin zeigen Tag 10 unstimulierte und mit LPS- bzw. CD40L-aktivierte DCs eine vermehrte Expression von HS, welches mit der Heparitinase-sensitiven Bindung von APRIL auf mit LPS- und CD40L-aktivierten DCs korreliert (siehe **Abb.17C**, oben).

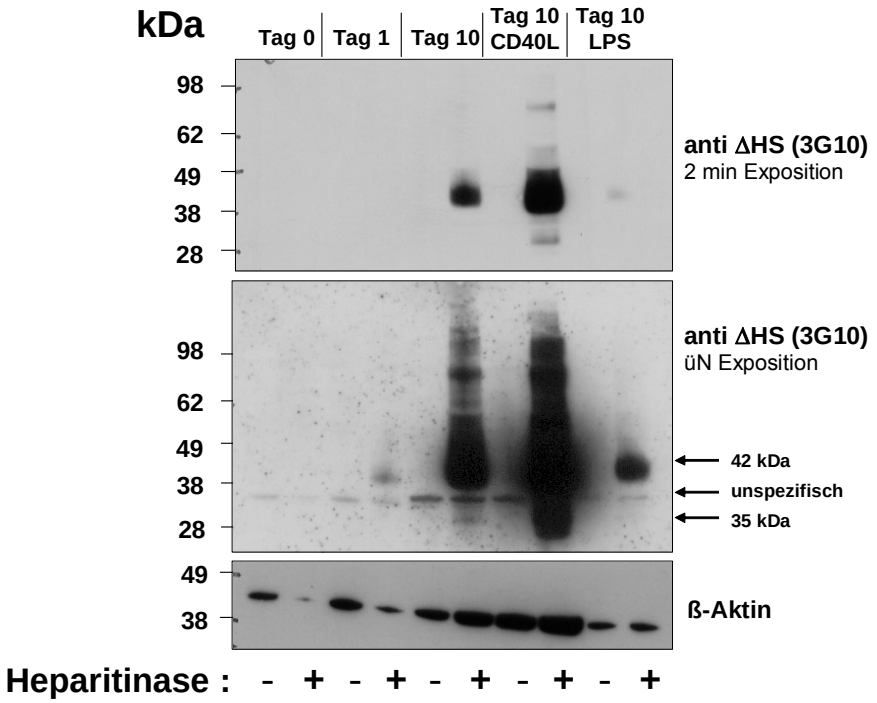


Abbildung 18: Identifizierung des Heparansulfat-Proteoglykans auf Monozyten und DCs.
$3x10^6$ Monozyten (Tag 0, Tag 1) bzw. DCs (Tag 10 unstimuliert, mit LPS 1µg/ml bzw. CD40L 1µg/ml stimuliert) von Donor 12 wurden für 2 h mit 100 mU Heparitinase in 500 µl Heparitinase Puffer (100 mM Natriumazetat, 10 mM Kalziumazetat pH 7) bei 37°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach dem Verdau der HS Ketten wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und lysiert. 30 µg Lysat wurde auf ein SDS-PA-Gel aufgetragen und der Western-Blot mit dem 3G10 Antikörper und anti-β-Aktin inkubiert.

2.5 *In vitro* von Monozyten produziertes APRIL hat Proteoglykane gebunden

Von Monozyten und MΦ synthetisierte Proteoglykane werden kontinuierlich in das Kulturmedium sezerniert (Kolset and Gallagher, 1990; Kolset et al., 1983; Kolset et al., 1990). Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass APRIL GAG-Ketten von Proteoglykanen auf Monozyten (Tag1) und DCs bindet.
Im Folgenden soll untersucht werden, ob von primären humanen Monozyten sezerniertes APRIL HSPGs gebunden hat. Der Verdau von aus Kulturüberstand primärer humaner Monozyten mittels BCMA-Fc immunpräzipitiertem APRIL mit Heparitinase und C-ABC Lyase zeigt, dass APRIL HSPGs gebunden hat (**Abb.19**). Nur geringe Mengen an Proteoglykanen wurden mit Protein-G-Beads unspezifisch gereinigt (längere Exposition des 3G10 Blots, nicht gezeigt). Das MW der gereinigten Proteoglykane lag bei dem hier gezeigten Donor zwischen 70-180 kDa. Aus dem Kulturüberstand drei weiterer Donoren (Donor 6, 7, und 12) aufgereinigtes APRIL hatte ebenso Proteoglykane gebunden, deren MW bei 100-≥300 kDa lag (nicht gezeigt).

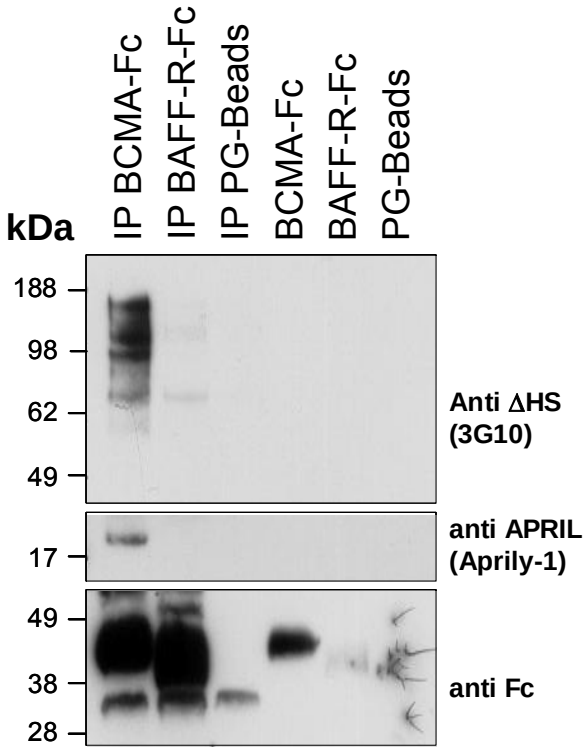


Abbildung 19: Von Monozyten produziertes APRIL hat Proteoglykane gebunden.
$1x10^6$ primäre Monozyten (Donor 20) wurden für fünf Tage in Monozyten-Medium kultiviert. An Tag 5 wurde der Kulturüberstand bei 4000 rpm für 20 min zentrifugiert, um alle Zellen und Zelltrümmer zu entfernen, bevor die IP von jeweils 3 ml Kulturüberstand mit an 10 µl Protein-G Sepharose Beads (PG-Beads) gekoppeltem BCMA-Fc (2 µg), BAFF-R-Fc (2 µg) oder PG-Beads alleine erfolgte. Nach IP über Nacht bei 4°C wurden die Beads 5x mit HB-Puffer (20 mM Tris, 10 mM NaCl pH 7) und darauffolgend 1 x mit Heparitinase Puffer gewaschen. Die gewaschenen Beads, sowie 2 µg rekombinantes BCMA-Fc, BAFF-R-Fc und 10 µl PG-Beads wurden in 80 µl Heparitinase Puffer + 30 mU Heparitinase aufgenommen und üN bei 37°C verdaut. Der Verdau wurde durch Zugabe von 1x reduzierenden Probenpuffer und erhitzen bei 70°C für 10 min gestoppt. Die eluierten Proteine wurden auf ein SDS-PA-Gel aufgetragen und immunpräzipitierte HSPGs mit dem 3G10 Antikörper detektiert. Die Bindung von APRIL wurde mit anti-APRIL (Aprily-1) und die der für die IP eingesetzten Rezeptor-Fc-Fusionsproteine mit anti-huIgG $F(ab')_2$ biotin (anti-Fc) nachgewiesen.

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass primäre Monozyten die Ektodomänen der Zelloberflächenproteoglykane durch Proteolyse in den Kulturüberstand freisetzen und APRIL an diese Proteoglykane bindet. Es ist nicht klar, ob von Monozyten sezerniertes APRIL zuerst Zelloberflächenproteoglykane bindet und dann durch Proteolyse der Proteoglykane zusammen mit diesen von der Zelloberfläche freigesetzt wird, oder APRIL erst im Kulturüberstand mit den freigesetzten, sulfatierten GAG-Ketten der Proteoglykane interagiert.

2.6 APRIL verhindert die spontane Apoptose primärer Monozyten

Monozyten zeigen eine konstante Migration in das Gewebe. Allerdings ist die Anzahl der neu gebildeten Monozyten sehr viel größer als benötigt wird, um sterbende MΦ und DCs zu ersetzen. Dieser Überschuss an Monozyten *in vivo* stirbt durch Apoptose und wird durch Gewebe-MΦ in der Umgebung entfernt (Mangan and Wahl, 1991). Im Gegensatz dazu wird bei Entzündungsprozessen eine große Anzahl an Monozyten benötigt. Während einer Entzündung werden eine Vielzahl von Zytokinen von verschiedenen Zelltypen produziert, die das Überleben von Monozyten beeinflussen. Pro-inflammatorische Zytokine wie TNF-α, Interleukin-1β, IFN-γ und GM-CSF sowie LPS verhindern die spontane Apoptose von Monozyten *in vivo* und *in vitro* und ermöglichen deren Differenzierung zu MΦ (Kiener et al., 1997b; Mangan and Wahl, 1991; Mangan et al., 1991). So zeigen Monozyten eine spontane Apoptose in der *in-vitro*-Kultur innerhalb weniger als 24 h, wenn nicht Wachstumsfaktoren wie z.B. GM-CSF zugegeben werden (Kiener et al., 1997b). Auch die Anwesenheit von 20% Serum in der Kultur kann die Apoptose von Monozyten nicht verhindern (Kiener et al., 1997b). Es ist bekannt, dass APRIL das Überleben von Tumorzellen fördert (Roth et al., 2001). Die Expression von löslichem APRIL in der *in vitro* Kultur von Monozyten (**Abb.15B**) und die induzierbare Expression von an Proteoglykanen gebundenen Glykosaminoglykanen auf Tag 1-3 Monozyten (**Abb.16B** und **17A+B**) implizieren eine Rolle von APRIL für das Überleben von Monozyten. Es wurde daher untersucht, ob APRIL die spontane Apoptose von Monozyten in der *in-vitro*-Kultur verhindern kann.

2.6.1 APRIL verhindert die durch Entzug von Überlebens- und Differenzierungsfaktoren ausgelöste Apoptose primärer Monozyten

Monozyten wurden ohne Zusatz von IL-4/GM-CSF für 72 h auf mit Flag-IZ-APRIL, mit Flag-IZ-BAFF oder unbeschichteten Zellkulturplatten ausgesät. Zeigen unbehandelte und mit BAFF behandelte Monozyten eine stark erhöhte Apoptoserate, so war die Apoptoserate von mit Flag-IZ-APRIL behandelten Zellen stark vermindert (**Abb.20A**). Dies ist sichtbar an der geringen Anzahl toter Zellen im FSC/SSC nach APRIL Behandlung (30%) im Vergleich zu BAFF (79%) und unbehandelten Monoyzten (66%) sowie an der geringeren Anzahl apoptotischer Zellen mit subdiploidem DNA-Gehalt (Sub-G1-Peak) nach APRIL-Behandlung (22%) im Vergleich zu BAFF (56%) und unbehandelten Monozyten (53%) (**Abb.20A**). Dies wird auch deutlich bei Betrachtung der Zellmorphologie unbehandelter, mit BAFF und mit APRIL behandelter Monozyten. Nur in unbehandelten und mit BAFF behandelten Monozyten konnte eine vermehrte Anzahl toter Zellen detektiert werden, sichtbar an den geschrumpften Zellen ohne Zytoplasma (**Abb.20A**).
Um auszuschließen, dass das erhöhte Überleben primärer Monozyten auf eine LPS-Verunreinigung der APRIL-Präparation zurückzuführen ist, wurden weitere Donoren mit verschiedenen immobilisierten Flag-IZ-APRIL und Flag-IZ-BAFF Präparationen,

sowie mit hitzeinaktiviertem Flag-IZ-APRIL behandelt.
Nur mit Flag-IZ-APRIL behandelte Monozyten zeigten eine erhöhte Vitalität nach 72h der *in-vitro*-Kultur, sichtbar an dem erhöhten Umsatz des Farbstoffes MTT durch mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen (**Abb.20B**).

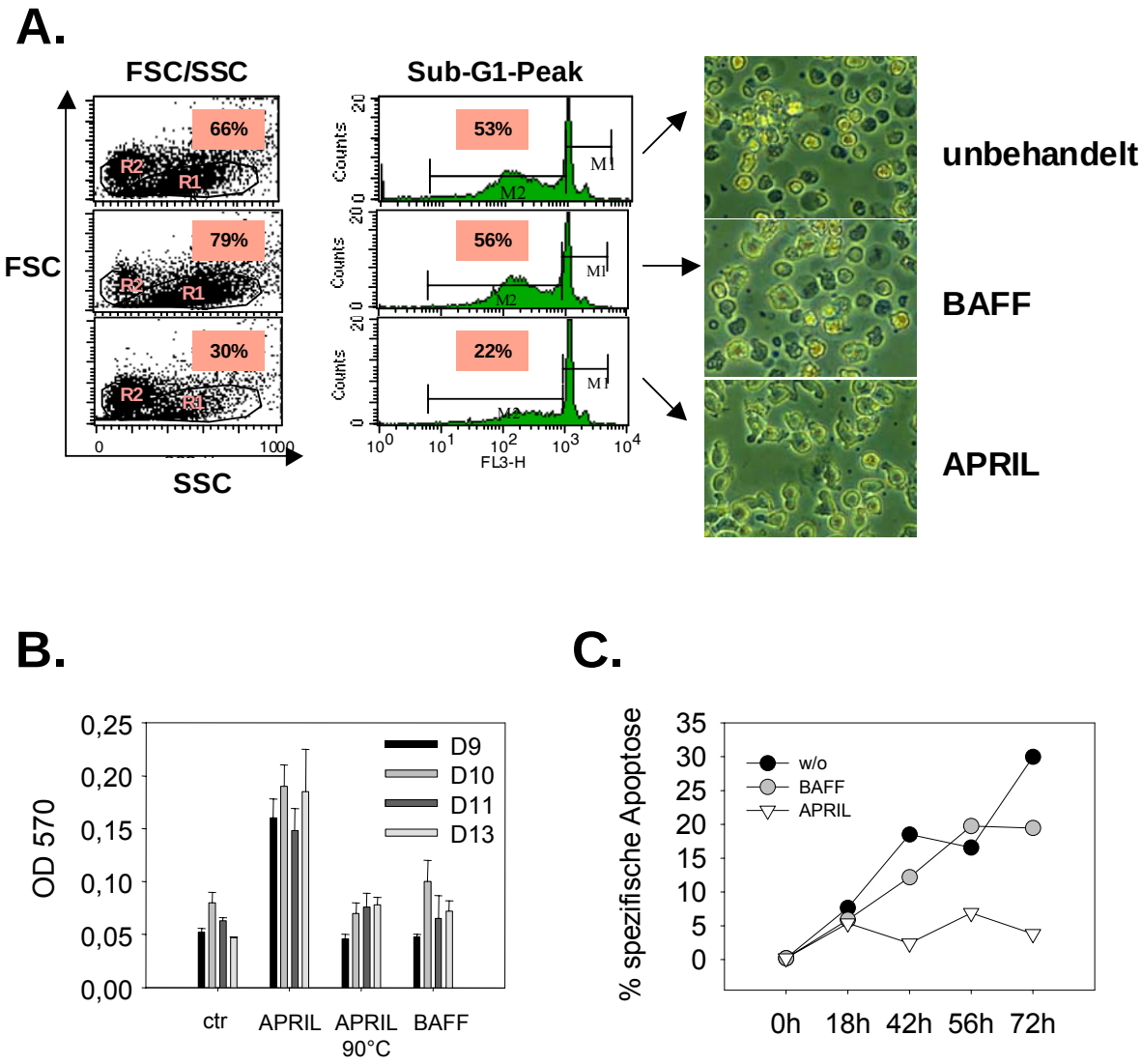


Abbildung 20: APRIL verhindert die spontane Apoptose primärer Monozyten.
(A) Monozyten (Donor 6) 1x10^6/ml wurden in RPMI/10% hitzeinaktiviertem FCS ohne Zugabe von IL-4 und GM-CSF für drei Tage auf mit 5 µg Flag-IZ-APRIL bzw. 5 µg Flag-IZ-BAFF beschichteten 24-Loch Zellkulturplatten ausgesät. Die Messung apoptotischer Zellen erfolgte aufgrund ihrer veränderten Morphologie durch Analyse des FSC/SSC im FACScan (siehe Methoden 2.2.4) und durch Bestimmung der Zellen mit subdiploidem DNA-Gehalt (sub-G1-Peak) (Siehe Methoden 2.2.4). Es wurden jeweils 20000 Zellen gemessen. Die % Angaben der Zellen mit verringertem FSC (Zellmasseverlust) und erhöhtem SSC (erhöhte Granularität) berechnete sich aus: (% Zellen in R1 x 100)/ % Zellen (R1+R2); R1= tote Zellen, R2=lebende Zellen. Weiterhin erfolgte die Dokumentation der behandelten Zellen im Phasenkontrastmikroskop (20 fache Vergrösserung). **(B)** 1x10^5 Monozyten (Donoren 9, 10, 11, 13) wurden am Tag ihrer Isolation auf mit 1 µg Flag-IZ-APRIL, 1 µg für 5 min bei 90°C hitzeinaktiviertem Flag-IZ-APRIL oder 1 µg Flag-IZ-BAFF beschichteten und unbeschichteten (ctr) 96-Loch-Flachbodenplatten ausgesät. Nach drei Tagen erfolgte die Vitalitätsmessung mit dem MTT-Test (siehe Methoden 2.2.4). **(C)** Monozyten (Donor 8) wurden wie in (A) auf Flag-IZ-APRIL und Flag-IZ-BAFF beschichteten 6-Loch Zellkulturplatten ausgesät und die apoptotischen Zellen durch Messung der Zellen mit subdiploidem DNA-Gehalt direkt nach Isolation der Zellen 0 h, nach 18 h, 42 h, 56 h und 72 h ermittelt. % spezifische Apoptose = 100 x (% experimenteller Zelltod - % spontaner Zelltod) / (100 - % spontaner Zelltod).

Ob APRIL die Apoptose primärer Monozyten nur verzögert oder über einen längeren Zeitraum ein Überlebenssignal in Monozyten induziert, wurde untersucht, indem die Apoptose von mit APRIL- oder kontrollbehandelten Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der *in-vitro*-Kultur gemessen wurde. Es zeigte sich, dass die Apoptoserate von mit APRIL behandelten Monozyten im Zeitraum von 18-72 h konstant bei ~ 5% lag. Demgegenüber stieg die Apoptoserate unbehandelter und mit BAFF behandelter Zellen in diesem Zeitraum an (**Abb.20C**). Dies bedeutet, dass APRIL primäre Monozyten über einen längeren Zeitraum vor Apoptose schützt.

2.7 APRIL induziert Adhäsion von Monozyten und ist gleichzeitig ein Differenzierungsfaktor

Zusammen mit Wachstumsfaktoren und Zytokinen liefert die EZM Signale für eine Vielzahl physiologischer Prozesse, wie Adhäsion, Migration, Zellproliferation, -differenzierung und -tod (Giancotti and Ruoslahti, 1999).
Die extrazelluläre Umgebung beeinflusst u.a. auch die Zellform. Nach initialer Anlagerung kommt es, abhängig vom Substrat, Art des Signals und des Zelltyps zur Ausbreitung der Zellen (Burridge and Chrzanowska-Wodnicka, 1996). Die Ausbreitung einer Zelle ist ein wichtiger Prozess, der für die Zellmigration, das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung von Zellen benötigt wird (Berrier et al., 2000). Der Hauptrezeptor für die Adhäsion der meisten Zellen auf Komponenten der EZM, wie Fibronektin, Laminin und Kollagen, ist die Familie der Transmembranrezeptoren der Integrine (Woods et al., 1998). Zwar reicht die alleinige Wechselwirkung der Integrinbindedomäne (RGD) von Fibronektin mit Integrinen für die Anlagerung von Zellen aus, allerdings sind zusätzliche Signale für eine stabile Adhäsion notwendig (Bloom et al., 1999; Saoncella et al., 1999). Ein solches zusätzliches Signal wird von der HBD in Fibronektin geliefert, welche durch Interaktion mit GAG-Ketten von Proteoglykanen der Familie der Syndekane zur Zelladhäsion auf das Substrat Fibronektin führt (Woods et al., 2000). Dies zeigt, dass HSPGs in Kooperation mit Integrinen Adhäsion von Zellen auslösen können.
Allerdings sind heparinbindende Proteine, die keine Integrinbindedomäne aufweisen, auch in der Lage Adhäsion von Zellen auszulösen. Verschiedene Studien beschreiben die Adhäsion von Zellen via HSPGs an immobilisierte heparinbindende Proteine wie FGF-2 (Richard et al., 1995) und heparinbindende Fragmente von Fibronektin (Dalton et al., 1995; Moyano et al., 2003; Woods et al., 2000; Woods et al., 1993; Yoneda et al., 1995), sowie heparinbindende Fragmente des neuronalen Adhäsionsproteins N-CAM (Cole and Glaser, 1986; Cole et al., 1986) und PF4 (engl.: platelet factor 4) (Izzard et al., 1986). Antikörper gegen das Zelloberflächenproteoglykan Syndekan-2 induzieren Adhäsion von Kolon- Karzinomzellen (Park et al., 2002) und Überexpression von Syndekan-2 und -4 verstärkt die Anlagerung und die Ausbreitung von CHO (engl.: Chinese Hamster Ovary)-Zellen (Woods et al., 1998). Diese Studien zeigen, dass Zelloberflächenproteoglykane eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion spielen. Es wird

angenommen, dass die Transmembran-Proteoglykane der Familie der Syndekane durch Interaktion mit heparinbindenden Liganden kreuzvernetzt werden, wodurch es zur Anlagerung zytoplasmatischer Adapterproteine kommt, die wiederum durch Interaktion mit Bestandteilen des Zytoskeletts Adhäsion auslösen.

Um zu untersuchen, ob die N-terminale HBD1 von APRIL für die Adhäsion und das Überleben primärer Monozyten in der *in-vitro*-Kultur notwendig ist, wurden Monozyten sowohl auf mit Flag-IZ-APRIL und Flag-IZ-APRIL 3K→A beschichteten Zellkulturplatten in RPMI + 10% hitzeinaktiviertem FCS ohne Zusatz von IL-4/GM-CSF ausgesät. Monozyten adhärierten nach 5 h sowohl auf mit Flag-IZ-APRIL als auch mit Flag-IZ-APRIL 3K→A beschichteten Platten (nicht gezeigt). Es konnte festgestellt werden, dass auch nach vier Tagen ein großer Anteil der Monozyten auf Flag-IZ-APRIL beschichteten Platten adhäriert war. Im Vergleich dazu war auf den mit der N-terminalen HBD1 Mutante Flag-IZ-APRIL 3K→A beschichteten Platte nur ein kleiner Anteil der Monozyten adhärent verblieben (**Abb.22A**). Die nicht-adhärenten Zellen wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und durch Zugabe von MTT die Anzahl lebender adhärenter Zellen quantifiziert (**Abb.22A**).
Der Anteil apoptotischer Zellen in der nicht-adhärenten Zellpopulation wurde nach 4 Tagen durch Bestimmung des subdiploiden DNA Gehalts (nach Nicoletti) nachgewiesen. Die nicht-adhärenten Monozyten auf mit Flag-IZ-APRIL und Flag-IZ-APRIL 3K→A beschichteten Zellkulturplatten waren kaum apoptotisch. Hingegen war ein großer Anteil der nicht-adhärenten Monozyten auf unbeschichteten (ctrl.) und mit hitzeinaktiviertem Flag-IZ-APRIL beschichteten Platten apoptotisch (Donor 6: ~ 50% und Donor 7: ~30%) (**Abb.22B**).

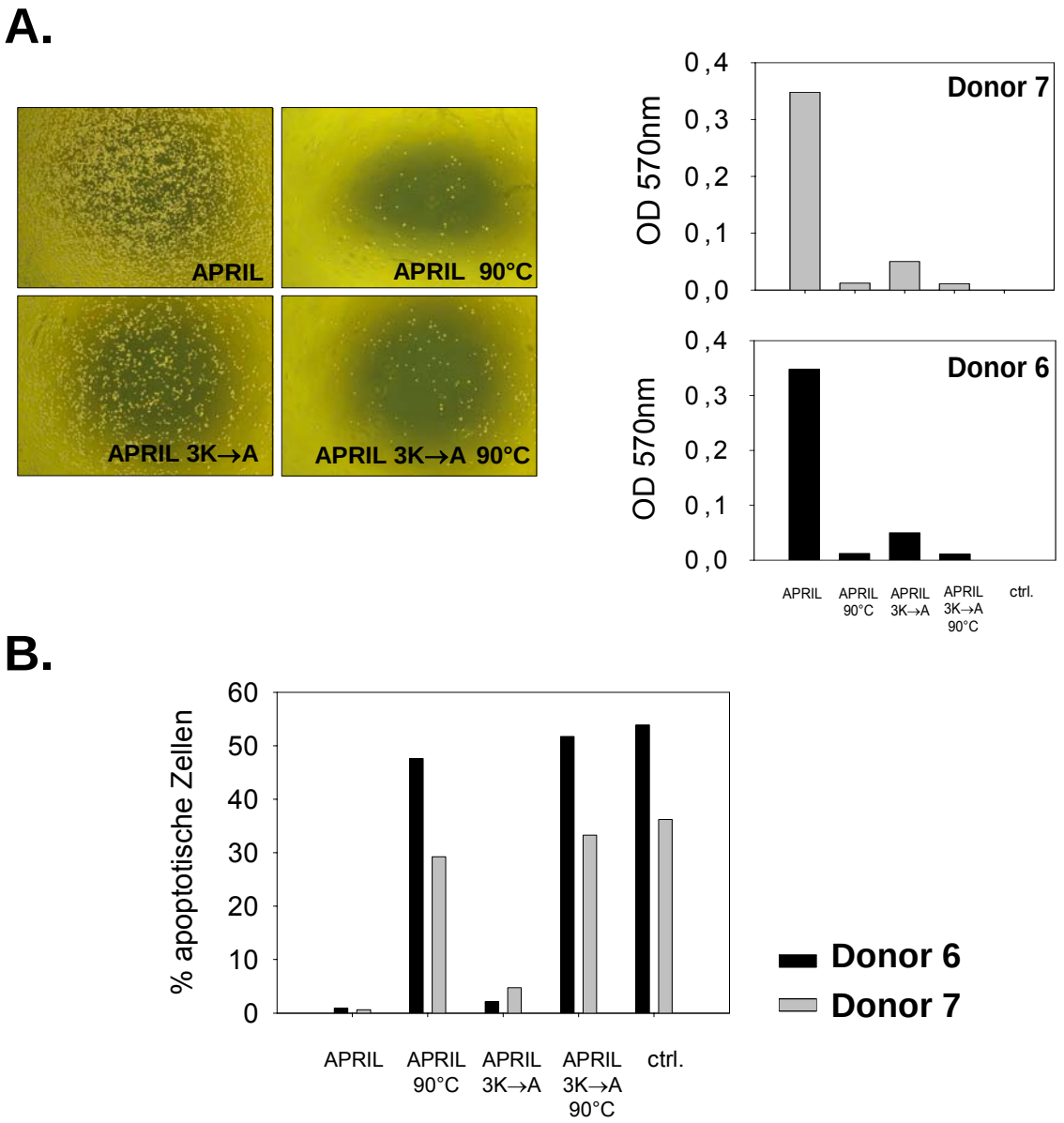


Abbildung 22: Die N-terminale HBD von APRIL vermittelt Adhäsion von Monozyten.
(A) $1x10^6$ Monozyten (Donor 6 und Donor 7) wurden direkt nach der Isolation auf mit 4 µg Flag-IZ-APRIL, 4 µg für 5 min bei 90°C hitzeinaktiviertem Flag-IZ-APRIL oder 4 µg Flag-IZ-APRIL 3K➝A und 4 µg hitzeinaktiviertem Flag-IZ-APRIL 3K➝A beschichteten 24-Loch Zellkulturplatten in 1 ml RPMI/10% hitzeinaktiviertem FCS ohne Zusatz von IL4/GM-CSF ausgesät. Nach Inkubation im Zellkulturbrutschrank für 4 Tage wurden nicht-adhärente Zellen durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die adhärent verbliebenen Zellen mit dem Phasenkontrastmikroskop (10 fache Vergrösserung) dokumentiert. Durch Zugabe von MTT-Färbelösung wurde die Vitalität der adhärenten Zellen bestimmt. **(B)** Bestimmung des % Anteils apoptotischer Zellen der nicht adhärenten Zellen in (A) durch Bestimmung der Zellen mit subdiploidem DNA-Gehalt (Nicoletti) (siehe Methoden 2.2.4).

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass immobilisiertes Flag-IZ-APRIL und Flag-IZ-APRIL 3K➝A Adhäsion von Monozyten auslösen, wobei das Potential, Adhäsion zu vermitteln, für die Flag-IZ-APRIL 3K➝A Mutante verringert ist bzw. über einen längeren Zeitraum nicht aufrechterhalten werden kann, ein Hinweis auf die Rolle von HBD1 in APRIL für die Vermittlung von Zelladhäsion. Trotz der verringerten Fähigkeit

von Flag-IZ-APRIL 3K→A Adhäsion von Monozyten auszulösen, verhindern sowohl Flag-IZ-APRIL als auch Flag-IZ-APRIL 3K→A die durch Wachstumsfaktorenentzug induzierte Apoptose primärer humaner Monozyten in der *in-vitro*-Kultur.

2.7.1 APRIL im Komplex mit BCMA induziert ein starkes Adhäsions- und möglicherweise ein Differenzierungssignal in Monozyten

HBD enthaltende Proteine induzieren Adhäsion von Zellen durch Bindung an GAG-Ketten von Proteoglykanen der EZM. Die duale Rezeptorspezifität von APRIL lässt vermuten, dass APRIL über seine HBD mit Proteoglykanen einer Zelle und über die noch freie THD mit einer TACI- bzw. BCMA-exprimierenden Zellen interagieren kann und so eine Zell-Zell-Anlagerung bewirkt (**Abb.23A**).
Deshalb wurde untersucht, ob eine definierte Ausrichtung der HBD eine verstärkte Adhäsion von Monozyten auslöst. Präinkubation von Flag-IZ-APRIL sowie Flag-IZ-APRIL 3K→A mit BCMA-Fc führt zur Ausbildung eines Liganden-Rezeptor Komplexes, in welchem die noch freie HBD von APRIL definiert ausgerichtet ist (**Abb.23A**). Beschichtung von Zellkulturplatten mit diesem Komplex, welcher zellgebundenes BCMA-APRIL nachahmt, führte zu einer verstärkten Adhäsion der Monozyten (**Abb.23 B und C**).
Nach vier Tagen wurden die nicht-adhärenten Zellen durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die verbliebenen adhärenten Zellen im Mikroskop dokumentiert. Nur auf mit Flag-IZ-APRIL/BCMA-Fc (A) beschichteten und Flag-IZ-APRIL 3K→A/BCMA-Fc (C) beschichteten Platten waren adhärente Zellen sichtbar, die eine stark makrophagen-ähnliche Morphologie aufwiesen. Die Anzahl der adhärenten, makrophagen-ähnlichen Zellen war auf den mit Flag-IZ-APRIL/BCMA-Fc beschichteten Zellkulturplatten erheblich größer als auf der mit Flag-IZ-APRIL 3K→A/BCMA-Fc beschichteten Platte. Die Zellen waren so stark konfluent, dass der Boden der Zellkulturplatte nicht mehr sichtbar war. Dies deutet darauf hin, dass APRIL sowohl einen Überlebens- als auch Differenzierungsfaktor für Monozyten darstellt (**Abb.23B**). Der erhöhte Umsatz des Vitalitätsfarbstoffes MTT von auf Flag-IZ-APRIL/BCMA-Fc und Flag-IZ-APRIL 3K→A/BCMA-Fc adhärierten Tag 4 Monozyten veranschaulicht nochmals eine Rolle von APRIL als Überlebens- und Differenzierungsfaktor für Monozyten, wobei weniger Monozyten auf der N-terminalen HBD1-Mutante Flag-IZ-APRIL 3K→A adhäriert waren (**Abb.23C**).

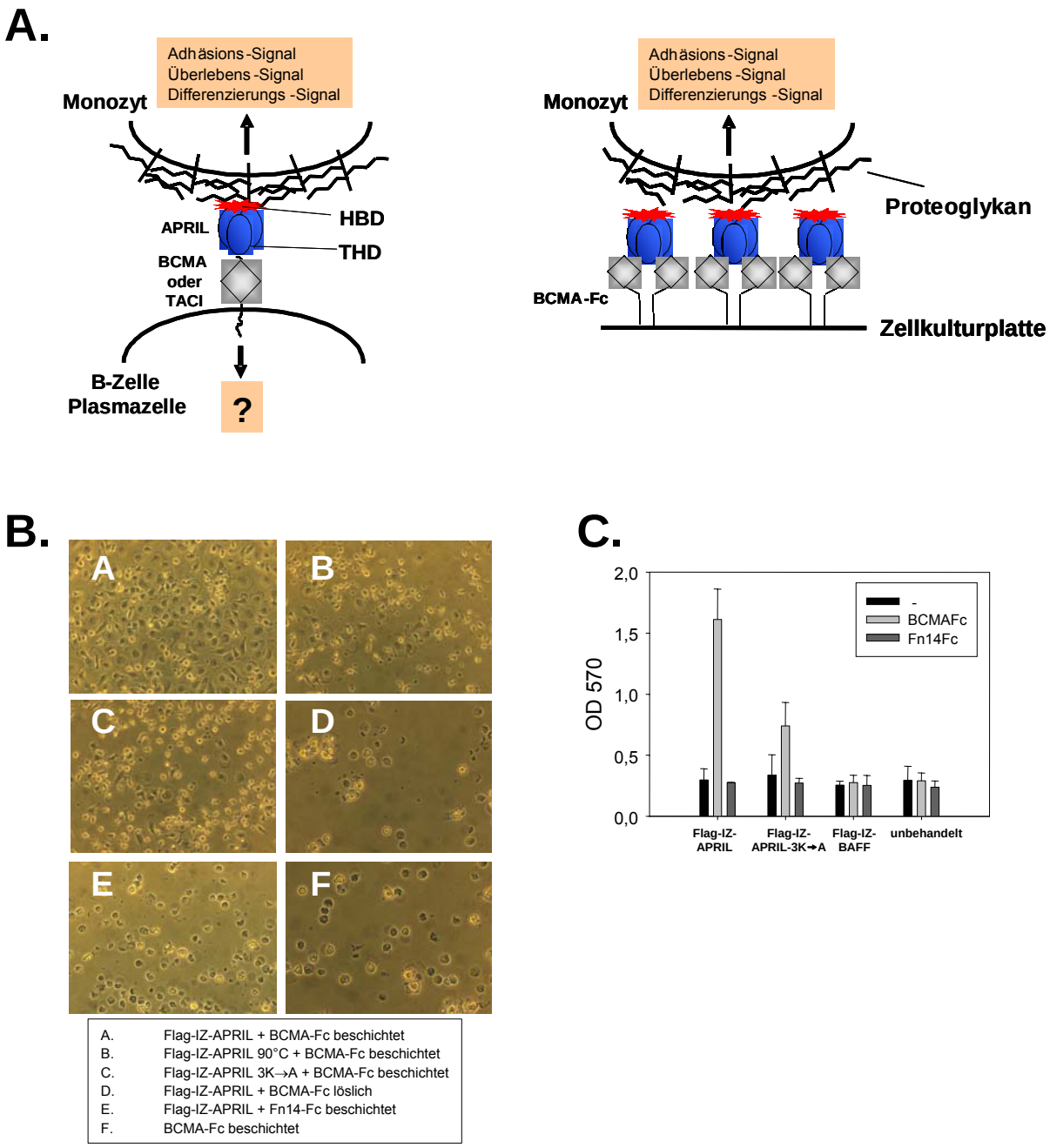


Abbildung 23: Die gerichtete Ausrichtung der HBD von APRIL im Komplex mit BCMA induziert ein Überlebens- und Differenzierungssignal in primären humanen Monozyten. (A) siehe Text.
(B) 0,5 µg Flag-IZ-APRIL bzw. Flag-IZ-APRIL 3K→A und 0,5 µg hitzeinaktiviertes Flag-IZ-APRIL wurden für 30 min bei Raumtemperatur mit 3 µg BCMA-Fc in PBS präinkubiert, um die Bildung eines Liganden-Rezeptor Komplexes zu ermöglichen. 24-Loch Zellkulturplatten wurden für 4 h bei 37°C mit diesen Komplexen sowie mit 0,5 µg Flag-IZ-APRIL+Kontroll-Fc-Protein Fn14-Fc und 3 µg BCMA-Fc allein beschichtet. Nach 4 h wurde die Zellkulturplatte zweimal mit PBS gewaschen und $1x10^6$ Monozyten (Donor 21) in 1 ml RPMI/10% hitzeinaktiviertem FCS ohne Zusatz von IL-4/GM-CSF darauf ausgesät. An Tag 4 wurden nicht-adhärente Zellen entfernt und die verbliebenen adhärenten Zellen mit dem Phasenkontrastmikroskop dokumentiert (20-fache Vergrösserung). **(C)** Bestimmung der Vitalität der Tag 4 adhärenten Zellen (Donor 21) durch Zugabe von MTT-Färbelösung und Messung der Absorption bei 570 nm im Photometer. Dargestellt sind für 4 Tage auf Flag-IZ-APRIL allein, Flag-IZ-APRIL im Komplex mit BCMA-Fc oder Fn14-Fc adhärierte Monozyten; auf Flag-IZ-APRIL 3K→A allein, Flag-IZ-APRIL 3K→A im Komplex mit BCMA-Fc oder Fn14-Fc adhärierte Monozyten; auf Flag-IZ-BAFF allein, Flag-IZ-BAFF im Komplex mit BCMA-Fc oder Fn14-Fc adhärierte Monozyten und auf unbehandelten Zellkulturplatten, BCMA-Fc bzw. Fn14-Fc beschichteten Zellkulturplatten adhärierte Monozyten. Fn14-Fc diente als Kontroll-Fc-Protein, welches keine Bindung mit APRIL und BAFF eingeht.

3 TACI bindet Glykosaminoglykan-Ketten von Proteoglykanen auf Monozyten und Dendritischen Zellen

In dieser Arbeit und einer vor kurzem veröffentlichen Studie (Bischof et al., 2005) wurden GAG-Ketten von Proteoglykanen als weiterer Bindungspartner von TACI identifiziert. So interagiert TACI mit Syndekan-2 (Bischof et al., 2005). Da die Bindung von TACI auf Syndekan-2 überexprimierenden Zellen durch Zugabe von Heparin geblockt werden konnte, kann geschlussfolgert werden, dass TACI GAG-Seitenketten von Syndekan-2 bindet (Bischof et al., 2005). Allerdings wurde bisher nicht untersucht, ob TACI mit GAG-Ketten von Proteoglykanen auf Monozyten und Dendritischen Zellen interagiert. Dies ist von Bedeutung, da diese Zellen neben Proteoglykanen auch die Liganden APRIL und BAFF exprimieren.
Weiterhin ist nicht bekannt, ob in der linearen Sequenz von TACI oder in der Kristallstrukur von TACI Abfolgen basischer Aminosäuren auftreten, die die Interaktion von TACI mit GAG-Seitenketten von Proteoglykanen vermitteln. Dies soll im Folgenden untersucht werden.

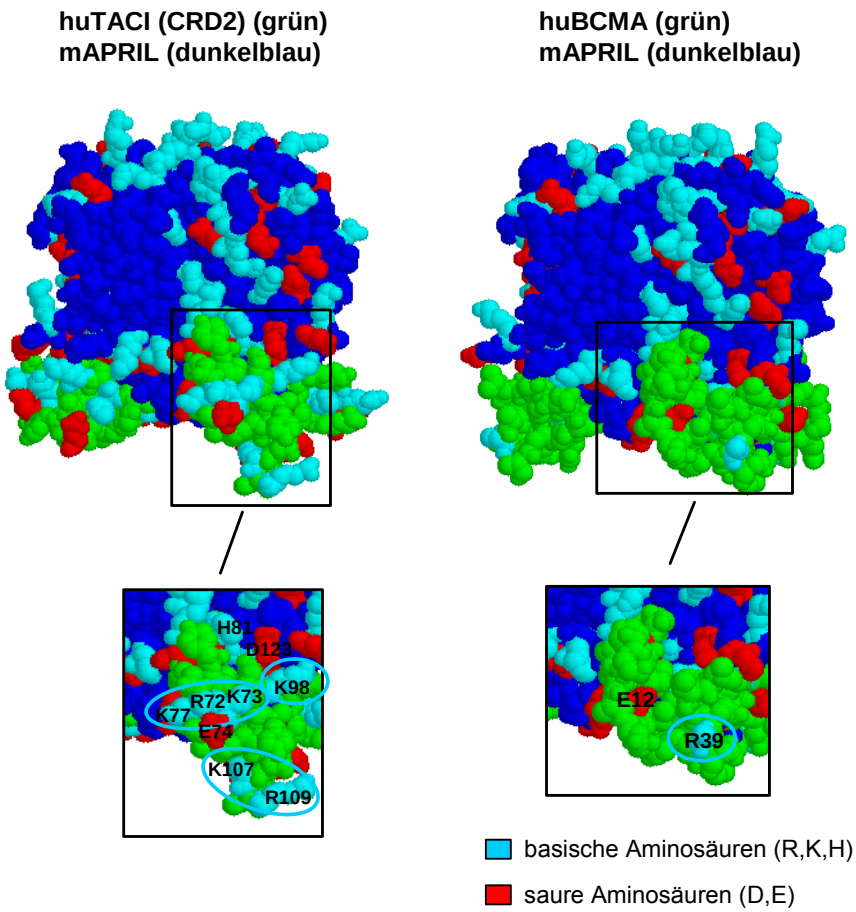
3.1 TACI enthält potentielle Heparin-Bindedomänen (HBD)

HBD in Proteinen können (i) in einer Abfolge basischer Aminosäuren in der linearen Aminosäuresequenz sichtbar werden (Cardin and Weintraub, 1989), und (ii) kann sich durch die Anordnung der Aminosäuren in der dreidimensionalen Struktur von Proteinen eine Akkumulation basischer Aminosäuren ergeben, die zuvor in der linearen Aminosäuresequenz nicht sichtbar war (Margalit et al., 1993). Daher sollen die Abfolge der basischen Aminosäuren sowohl in der linearen Aminosäuresequenz der extrazellulären (EC) Domänen von humanem und murinem TACI und BCMA, als auch in der Kristallstruktur von humanem TACI (PDB:1XU1) und humanem BCMA (PDB:1XU2) verglichen werden.

A.

```
                        6  8 9   12 14
human TACI    1  MSGLGRSRRGGRSRVDQEERFPQGLWTGVA
murin TACI    1  MAMAF.........................

human TACI   31  MRSCPEEQYWDPLLGT..CMSCKTICNHQSQRTCAAFCRS   CRD1
murin TACI    6  ...CPKDQYWDSSRKS..CVSCALTCSQRSQRTCTDFCKF

                     72 73    77                      98
human TACI   69  LS.CRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHP.KQCAYFCE.   CRD2
murin TACI   41  IN.CRKEQGRYYDHLLGACVSCDSTCTQHP.QQCAHFCE.

                  107 109          119  122
human TACI  106  NKLRSPVNLPPELRRQRSGEVENNSDNSGRYQGLEHRGSEASPALPGLKLSADQV ALVYS
murin TACI   78  KRPRSQANLQPELGRPQAGEVEVRSDNSGRHQGSEH.GPGLRLSSDQLTLYC


human BCMA    1  MLQM
murin BCMA    1  MAQ.

human BCMA    5  AGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNA   CRD1
murin BCMA    4  ..QCFHSEYFDSLLHACKPCHLRCS.N.PPATCQPYCDPSVTSSVKGTYT

human BCMA   44  SVTNSVKGTNA
murin BCMA   39  SVTSSVKGTYT
```

B.


huTACI (CRD2) (grün)
mAPRIL (dunkelblau)

huBCMA (grün)
mAPRIL (dunkelblau)

Abbildung 24: Darstellung der Aminosäuresquenz der extrazellulären Domänen von BCMA und TACI und der Kristallstrukuren von BCMA-APRIL und TACI-APRIL.
(A) Die extrazelluläre (EC) Domäne von humanem und murinem TACI und BCMA kann in drei Bereiche unterteilt werden. Einen N-terminalen Bereich, den Bereich der cysteinreichen Domänen (CRD) und in einen C-terminalen Bereich. Die CRD sind verantwortlich für die Liganden-Interaktion. Die Cysteine sind in rot dargestellt. Basische, positiv geladene Aminosäuren sind hellblau unterlegt (R, K, H) und Bereiche in denen diese Aminosäuren in der linearen Sequenz akkumulieren bzw. als basische HBD in der Kristallstruktur von TACI (siehe B) sichtbar werden, blau unterstrichen. BCMA enthält eine CRD und TACI zwei CRD. **(B)** Darstellung der Kristallstruktur von humanem TACI CRD2 (aa 68-109; grün) im Komplex mit murinem APRIL (PDB:1XU1) (dunkelblau) und von humanem BCMA (aa 8-43; grün) im Komplex mit murinem APRIL (PDB:1XU2) (dunkelblau). In hellblau sind basische positiv geladene Aminosäuren (R, K, H) dargestellt und in rot saure, negativ geladene Aminosäuren (D, E). Hellblau umrandet sind basische Aminosäuren die in TACI CRD2 und BCMA ausserhalb der APRIL-Bindestelle liegen.

Der Vergleich der linearen Aminosäuresequenz der EC Domänen von BCMA und TACI zeigt, dass nur in TACI und nicht in BCMA Abfolgen basischer Aminosäuren auftreten (hellblau unterstrichen). Sowohl in humanem als auch murinem TACI ist eine Abfolge basischer Aminosäuren in der CRD2 ($\mathbf{R}^{72}$ $\mathbf{K}^{73}$ X X X $\mathbf{K}^{77}$) sichtbar (**Abb.24A**). Weiterhin tritt in humanem jedoch nicht in murinem TACI eine Abfolge basischer Aminosäuren am N-Terminus ($\mathbf{R}^{6}$ X $\mathbf{R}^{8}$ $\mathbf{R}^{9}$ X X $\mathbf{R}^{12}$ X $\mathbf{R}^{14}$) auf (**Abb.24A**).
Um die Lage dieser basischen Aminosäuren in der dreidimensionalen Struktur von TACI zu identifizieren, wurde die Kristallstruktur von TACI CRD2 im Komplex mit murinem APRIL untersucht. Da nur die Kristallstruktur der CRD2 von TACI vorliegt, kann die Lage der basischen Aminosäuren am N-Terminus sowie am C-Terminus der EC-Domäne von TACI nicht analysiert werden. Es können drei basische Aminosäuren ($\mathbf{R}^{72}$ $\mathbf{K}^{73}$ X X X $\mathbf{K}^{77}$) in TACI CRD2 identifiziert werden, die in der Kristallstruktur nahe beieinander liegen (hellblaue Umrandung) (**Abb.24B**), allerdings in der linearen Sequenz nicht direkt aufeinander folgen (**Abb.24A**).
Weiterhin ist zu beobachten, dass die Aminosäuren $\mathbf{R}^{72}$ $\mathbf{K}^{73}$ $\mathbf{K}^{77}$ nicht an der Bindung von APRIL beteiligt sind, sondern an der 'Außenseite' von TACI liegen (**Abb. 24B**), welches auf eine mögliche zweiseitige Rezeptorspezifität von TACI (GAG ↔TACI ↔ APRIL) hinweisen kann. Weitere Aminosäuren, die an der 'Außenseite' von TACI liegen und möglicherweise nicht an der APRIL-Bindung beteiligt sind, sind $\mathbf{K}^{98}$, $\mathbf{K}^{107}$ und $\mathbf{R}^{109}$.
Betrachtet man nur die lineare Sequenz der basischen Aminosäuren in TACI, so entspricht die N-terminale basische Domäne eher einem typischen Heparinbindemotiv (**B**X**BB**) (Cardin and Weintraub, 1989), als die lineare Abfolge der basischen Aminosäuren in der CRD2. So ähnelt die Abfolge der N-terminalen basischen Aminosäuren ($\mathbf{R}^{6}$ X^{7} $\mathbf{R}^{8}$ $\mathbf{R}^{9}$) in TACI sehr stark der Abfolge der basischen Aminosäuren der HBD1 in APRIL ($\mathbf{K}^{110}$ X^{111} $\mathbf{K}^{112}$ $\mathbf{K}^{113}$).
Da die Analyse der basischen Aminosäuren in der linearen Aminosäuresequenz und der Kristallstruktur von TACI potentielle heparinbindende Domänen vermuten lässt, wurde untersucht, ob TACI mit dem GAG Heparin interagiert.

3.2 TACI bindet Heparin-Sepharose und interagiert gleichzeitig mit BAFF

Die Immunpräzipitation von TACI-Fc, BCMA-Fc, BAFF-R-Fc und Fn14-Fc mit Heparin-Beads zeigt, dass nur TACI-Fc mit Heparin interagiert (**Abb.25A**). Um die Affinität von TACI gegenüber Heparin zu bestimmen, wurde TACI-Fc nach Immunpräzipitation mittels eines ansteigenden NaCl-Gradienten eluiert. Es zeigte sich, dass TACI-Fc bei 200-400 mM NaCl von den Heparin-Beads dissoziierte (**Abb.25B**). Um zu untersuchen, ob die N-terminalen basischen Aminosäuren ($\mathbf{R}^6$ X^7 $\mathbf{R}^8$ $\mathbf{R}^9$) in TACI an der Interaktion mit Heparin beteiligt sind, wurden diese zu Alanin mutiert (TACI-Fc 3R→A). Es war festzustellen, dass TACI-Fc 3R→A in der Lage war Heparin-Beads zu binden, allerdings eluierte ein Teil des Proteins schon bei einer NaCl Konzentration von 40 mM und die Hauptfraktion bei 200 mM NaCl (**Abb.25B**). Dies zeigt, dass die N-terminalen basischen Aminosäuren nur zu einem Teil für die Interaktion von TACI mit Heparin verantwortlich sind und weitere basische Aminosäuren in TACI an der Heparin-Bindung beteiligt sein müssen.

Das hier verwendete humane TACI-Fc Konstrukt enthält die TACI-EC Domäne aa S2-L118. Da somit die restlichen C-terminalen Aminosäuren (u.a. die Abfolge der basischen Aminosäuren $\mathbf{R}^{119}\mathbf{R}^{120}Q^{121}\mathbf{R}^{122}$) in der EC Domäne von TACI fehlen und in der CRD1 keine potentielle HBD erkennbar ist, kann vermutet werden, dass die basischen Aminosäuren an der 'Außenseite' von TACI CRD2 ($\mathbf{R}^{72}$ $\mathbf{K}^{73}$ X X X $\mathbf{K}^{77}$) sowie $\mathbf{K}^{98}$, $\mathbf{K}^{107}$ und $\mathbf{R}^{109}$ für die restliche Bindung des rekombinanten TACI-Fc Konstrukts an Heparin verantwortlich sind. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass auch die basischen Aminosäuren $\mathbf{R}^{119}\mathbf{R}^{120}Q^{121}\mathbf{R}^{122}$, die in dem hier verwendeten TACI-Fc Konstrukt fehlen, an der Interaktion TACI -GAG partizipieren.

Es stellte sich die Frage, ob TACI gleichzeitig Heparin sowie APRIL und/oder BAFF binden kann. Da APRIL selbst Heparin bindet, wurde für die IP BAFF verwendet. Eine spezifische Interaktion von an Heparin gebundenem TACI-Fc und TACI-Fc 3R→A mit Flag-IZ-BAFF konnte festgestellt werden (**Abb.25C**).

Weiterhin wurde untersucht, ob TACI neben der Interaktion mit dem stark sulfatierten GAG Heparin auch mit von Zellen durch Proteolyse freigesetzten HSPGs interagiert. Proteoglykane werden von fast allen Zellen durch Proteasen kontinuierlich von der Zelloberfläche abgespalten und so in den Kulturüberstand freigesetzt (Bernfield et al., 1999). Ob TACI HSPGs von Zellen bindet, ist nicht bekannt. Da rekombinantes TACI-Fc in HEK293T-Zellen produziert wurde, wurde getestet, ob TACI-Fc, nach Aufreinigung aus dem Kulturüberstand transfizierter HEK293T-Zellen, Proteoglykane gebunden hat. Dazu wurde 10 µg aufgereinigtes TACI-Fc mit Heparitinase verdaut.

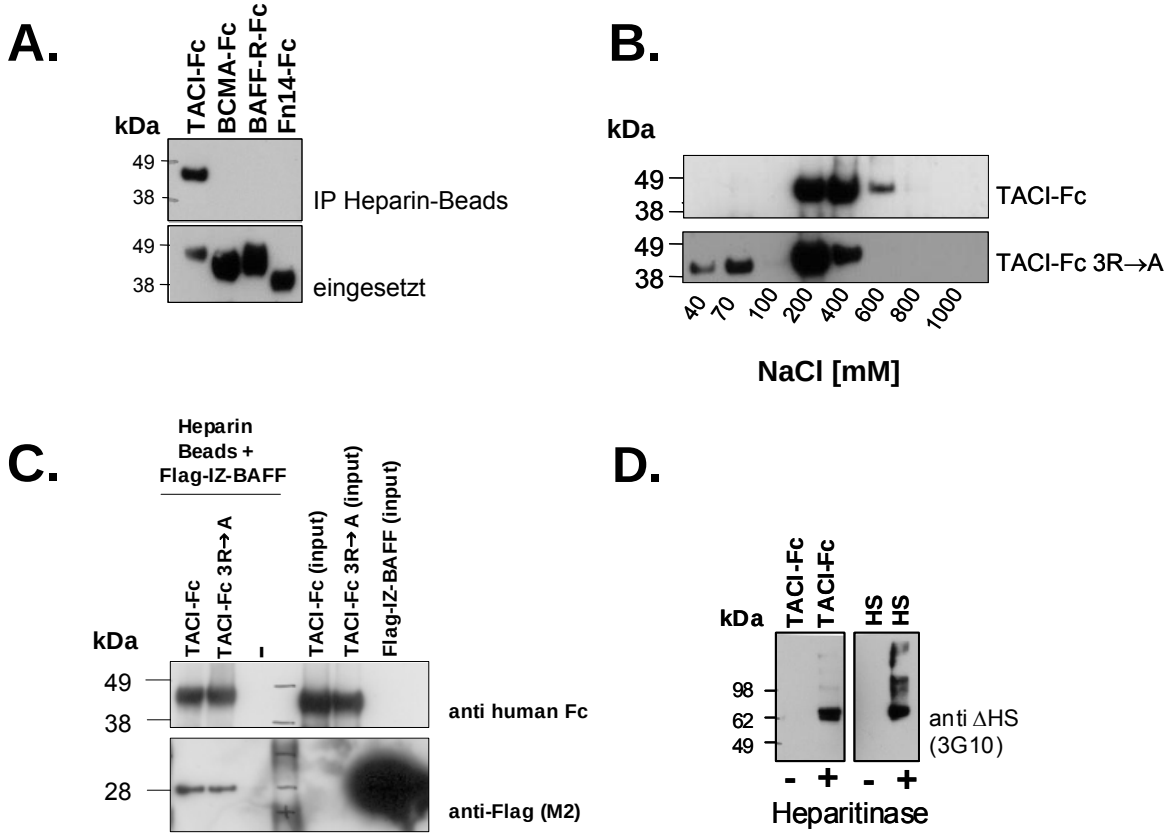


Abbildung 25: TACI bindet das GAG Heparin und hat eine duale Rezeptorspezifität.
(A) Je 0,5 µg rekombinantes TACI-Fc, BCMA-Fc, BAFF-R-Fc und Fn14-Fc wurden üN mit 20 µl Heparin-Sepharose in HB-Puffer (20 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 0,005% Triton-X100 pH 7.4) immunpräzipitiert. Am nächsten Tag wurden die Beads 5x mit HB-Puffer gewaschen und die gebundenen Proteine bei 70°C für 10 min in reduzierendem SDS-Probenpuffer eluiert. Nach Auftrag auf ein 4-12%igen SDS-PA-Gel erfolgte der Nachweis der an Heparin-Sepharose gebundenen Fc-Proteine mittels Western Blot mit anti-huIgG $F(ab')_2$ biotin. **(B)** Elution von an Heparin-Sepharose gebundenem TACI-Fc (1 µg) und TACI-Fc 3R→A (1 µg) mittels aufteigendem NaCl Gradienten (siehe Methoden 2.5.4). Nach TCA Fällung der eluierten Proteine wurden diese im Western-Blot mit anti-huIgG $F(ab')_2$ biotin detektiert. **(C)** Je 1 µg TACI-Fc und TACI-Fc 3R→A wurden mit 300 ng Flag-IZ-BAFF und 10µl Heparin-Beads in HB-Puffer üN bei 4°C immunpräzipitiert. Am nächsten Tag wurde die IP 5x mit HB-Puffer gewaschen und bei 70°C für 10 min eluiert, auf ein SDS-PA-Gel aufgetragen und gebundens Flag-IZ-BAFF mit anti-Flag (M2) sowie die Fc-Proteine mit anti-huIgG $F(ab')_2$ biotin im Western Blot detektiert. **(D)** Rekombinantes TACI-Fc (10 µg) wurde üN bei 37°C mit 50 mU Heparitinase in Heparitinasepuffer wie unter Methoden 2.3.1 beschrieben, verdaut. Nach Zugabe von 1x SDS Probenpuffer (reduzierend), Auftrag auf ein 4-12%iges SDS-PA-Gel und Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde der Blot mit dem 3G10 Antikörper, welcher die an Proteoglykanen verbliebenen HS Reste erkennt, inkubiert. Als Positivkontrolle diente 1 µg HS (aus boviner Niere).

Es zeigte sich, dass TACI-Fc ein Proteoglykan gebunden hat, welches ein MW von ~62 kDa aufweißt. Ein bekanntes HSPG, welches dieses MW besitzt, ist Glypikan.
Diese Resultate demonstrieren, dass TACI mit dem stark sulfatierten GAG Heparin interagiert, allerdings neben den N-terminalen basischen Aminosäuren weitere basische Aminosäuren für die Bindung von TACI an Heparin verantwortlich sein müssen. Außerdem zeigt TACI eine duale Rezeptorspezifität und kann daher GAGs und BAFF, und damit höchstwahrscheinlich auch APRIL, gleichzeitig binden. Weiterhin interagiert TACI mit von HEK293T-Zellen freigesetzten HSPGs weshalb diese neben APRIL und BAFF einen dritten spezifischen Liganden von TACI darstellen.

Bisher wurde eine spezifische Bindung von TACI an GAGs nur auf Syndekan überexprimierenden Jurkat-Zellen nachgewiesen (Bischof et al., 2005). Es ist nicht bekannt, ob TACI mit auf Monozyten und DCs exprimierten GAG-Ketten von Proteoglykanen interagiert. Monozyten während der Reifung zu DCs und reife DCs exprimieren abhängig von Aktivierungs- und Differenzierungssignalen HSPGs auf der Zelloberfläche (**Abb.18**) sowie APRIL und BAFF (**Abb.15B**), wobei bisher nur BAFF auf diesen Zellen als membrangebundenes Protein nachgewiesen werden konnte. Daher wurde in der Folge untersucht, ob TACI mit Monozyten und DCs interagiert und welches der Interaktionspartner von TACI auf diesen Zellen ist.

3.3 TACI bindet sulfatierte Glykosaminoglykan-Ketten von Proteoglykanen auf Monozyten und Dendritischen Zellen

Es ist bekannt, dass Monozyten und aktivierte DCs membrangebundenes BAFF auf der Zelloberfläche exprimieren (Nardelli B 2001, Litinskiy MB 2002). Die Expression von TWE-PRIL (einem Transmembran-Hybridprotein aus Tweak und APRIL) wurde bisher als an Polysomen gebundene RNA in primären Monozyten nachgewiesen (Pradet-Balade et al., 2002), allerdings konnte das Protein in Monozyten bisher nicht detektiert werden (Pradet-Balade et al., 2002) und auch in dieser Arbeit war TWE-PRIL (48 kDa) in Lysaten von Monozyten und DCs nicht nachweisbar (nicht gezeigt). TACI bindet APRIL, BAFF und GAG-Ketten von Proteoglykanen. Um zwischen einer Interaktion von TACI mit BAFF, APRIL oder sulfatierten GAG-Ketten auf Monozyten und DCs zu unterscheiden, wurde gleichzeitig die Bindung von BCMA-Fc (interagiert mit APRIL und BAFF) und/oder BAFF-R-Fc (interagiert nur mit BAFF) auf mit Chlorat behandelten Monozyten und DCs sowie mit Heparitinase behandelten DCs untersucht.

3.3.1 Chlorat-Behandlung von Monozyten vermindert TACI-Bindung

Monozyten, die für drei Tage in IL-4/GM-CSF-haltigem Medium kultiviert wurden, zeigen eine starke Oberflächenbindung von TACI-Fc, BCMA-Fc und BAFF-R-Fc (**Abb.26A**). Da bekannt ist, dass Monozyten BAFF auf der Zelloberfläche exprimieren, wurde bisher angenommen, dass auch die hier observierte TACI-Fc-, BCMA-Fc- und BAFF-R-Fc-Bindung auf eine Interaktion mit BAFF zurückzuführen ist. Überraschenderweise, konnte die Bindung von TACI auf mit Chlorat behandelten Monozyten fast vollständig inhibiert werden (blaue Pfeile **Abb.26A**), wohingegen sich die Bindung von BCMA-Fc und BAFF-R-Fc kaum veränderte.
Dass die TACI-Fc-Bindung durch Zugabe von Sulfat zu den mit Chlorat behandelten Monozyten wieder rekonstituiert werden konnte (blaue Pfeile **Abb.26A**) zeigt, dass sulfatierte GAG-Seitenketten von Proteoglykanen auf Tag 3 Monozyten TACI-Fc binden bzw. für die Bindung von TACI an einen weiteren Liganden (möglicherweise

APRIL oder BAFF) notwendig sind. Da sich die Bindung von BAFF-R-Fc und BCMA-Fc auf diesen Zellen kaum veränderte, kann ausgeschlossen werden, dass die Chlorat Behandlung die Expression des membrangebundenen BAFF-Proteins beeinflusst hat.

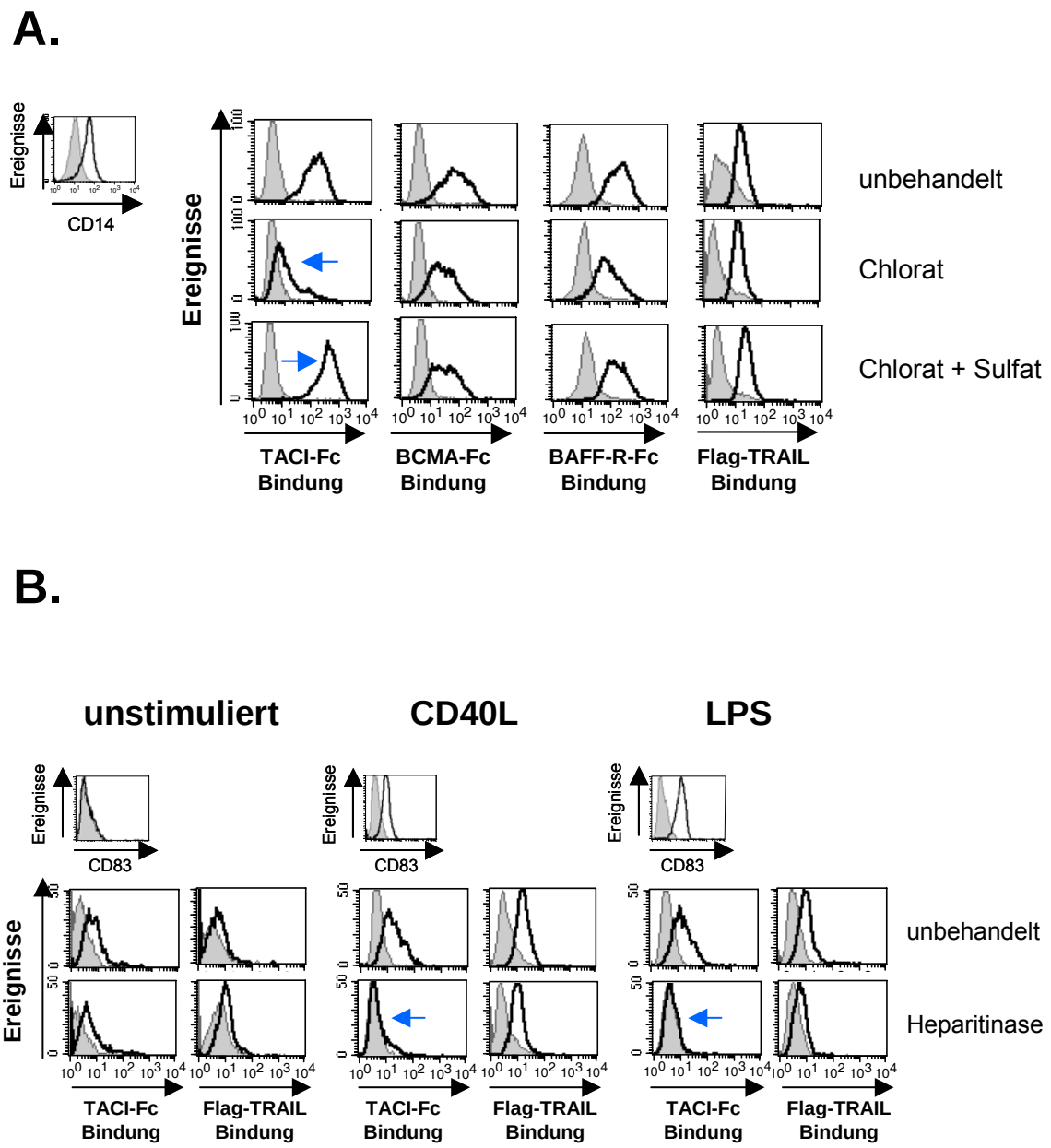


Abbildung 26: TACI bindet sulfatierte GAGs auf primären Monozyten und Dendritischen Zellen.
(A) Monozyten (Donor 15) wurden für drei Tage in Monozyten-Medium kultiviert. An Tag 1 nach der Isolation wurde zu einigen Zellen 50 mM Natriumchlorat gegeben. An Tag 2 nach der Isolation wurde einem Teil der mit Natriumchlorat behandelten Zellen 20 mM Natriumsulfat zugefügt. An Tag 3 nach der Isolation wurde die Bindung von TACI-Fc, BCMA-Fc und BAFF-R-Fc auf diesen Zellen mittels FACScan gemessen. Flag-TRAIL diente als Positivkontrolle. **(B)** $3x10^6$ aus Monozyten (Donor 14) generierte unreife DCs (Tag 7) wurden in 3 ml Monozyten-Medium aufgenommen und für weitere drei Tage mit und ohne LPS (1µg/ml) oder CD40L (1µg/ml) kultiviert, um aktivierte DCs zu generieren. An Tag 10 wurden die Zellen mit und ohne Heparitinase für 60 min wie unter Methoden 2.3.1 beschrieben, behandelt. An Tag 10 erfolgte die Messung der Oberflächenbindung von TACI-Fc und Flag-TRAIL auf nicht stimulierten, mit LPS stimulierten und mit CD40L stimulierten DCs. Der Nachweis der DC Reifung erfolgte durch Färbung mit anti-CD83.

Da TACI GAG-Ketten auf Monozyten bindet, wurde untersucht, ob diese auch den Bindungspartner von TACI auf DCs darstellen. Zeigt TACI eine schwache Bindung auf unstimulierten DCs, so steigt die Bindung von TACI auf mit LPS und CD40L aktivierten DCs (**Abb.26B**). Heparitinase-Behandlung unstimulierter Tag 10 DCs von Donor 14 (**Abb.26B**) führte zu keiner Verminderung der geringen TACI-Bindung. Interessanterweise ist die TACI-Bindung auf mit Heparitinase behandelten aktivierten Tag 10 DCs vollständig aufgehoben (blaue Pfeile **Abb.26B**), hingegen die Bindung von TRAIL an TRAIL-Rezeptoren auf diesen Zellen kaum inhibiert (**Abb.26B**).
Die Beobachtung, dass die Heparitinase-Behandlung mit CD40L bzw. LPS aktivierter DCs die TACI-Bindung stark vermindert bzw. komplett aufhebt, deutet auf HS als Bindungspartner von TACI auf aktivierten DCs hin.

3.4 TACI induziert Adhäsion und Zelltod in IL-4/GM-CSF behandelten Monozyten

Das Vorhandensein potentieller basischer Heparinbindedomänen in TACI (**Abb.24**) und die Bindung von TACI auf Monozyten und DCs via GAG-Ketten von Proteoglykanen (**Abb.26**), führte zu der Vermutung, das TACI ebenso wie APRIL in der Lage sein sollte, Adhäsion von Monozyten auszulösen.
Primäre humane Monozyten adhärieren schon nach 1 h (hier gezeigt nach 4 h) auf mit TACI-Fc beschichteten Zellkulturplatten, jedoch nicht auf mit BCMA-Fc oder Fn14-Fc beschichteten Platten (**Abb.27A**), so dass ausgeschlossen werden kann, dass die Adhäsion durch Interaktion von TACI mit auf der Zelloberfläche von Monozyten exprimiertem APRIL oder BAFF bzw. durch die Interaktion des Fc-Teils mit Fc-Rezeptoren auf Monozyten ausgelöst wurde. Weiterhin ist die durch TACI induzierte Adhäsion nicht auf eine LPS-Verunreinigung des TACI-Fc-Proteins zurückzuführen, da hitzeinaktiviertes TACI-Fc keine Adhäsion auslöste (**Abb.27A**). Interessanterweise führte die Zugabe von löslichem TACI-Fc auch zur Adhäsion von Monozyten (Daten nicht gezeigt).
Diese Resultate zeigen, dass TACI durch Interaktion mit einem anderen Liganden als BAFF oder APRIL die Adhäsion von Monozyten induziert, da durch BCMA kein Adhäsionssignal ausgelöst wurde. Bei diesem Liganden handelt es sich möglicherweise um die in in dieser Arbeit identifizierten GAG-Ketten von Proteoglykanen auf der Zelloberfläche von Monozyten.

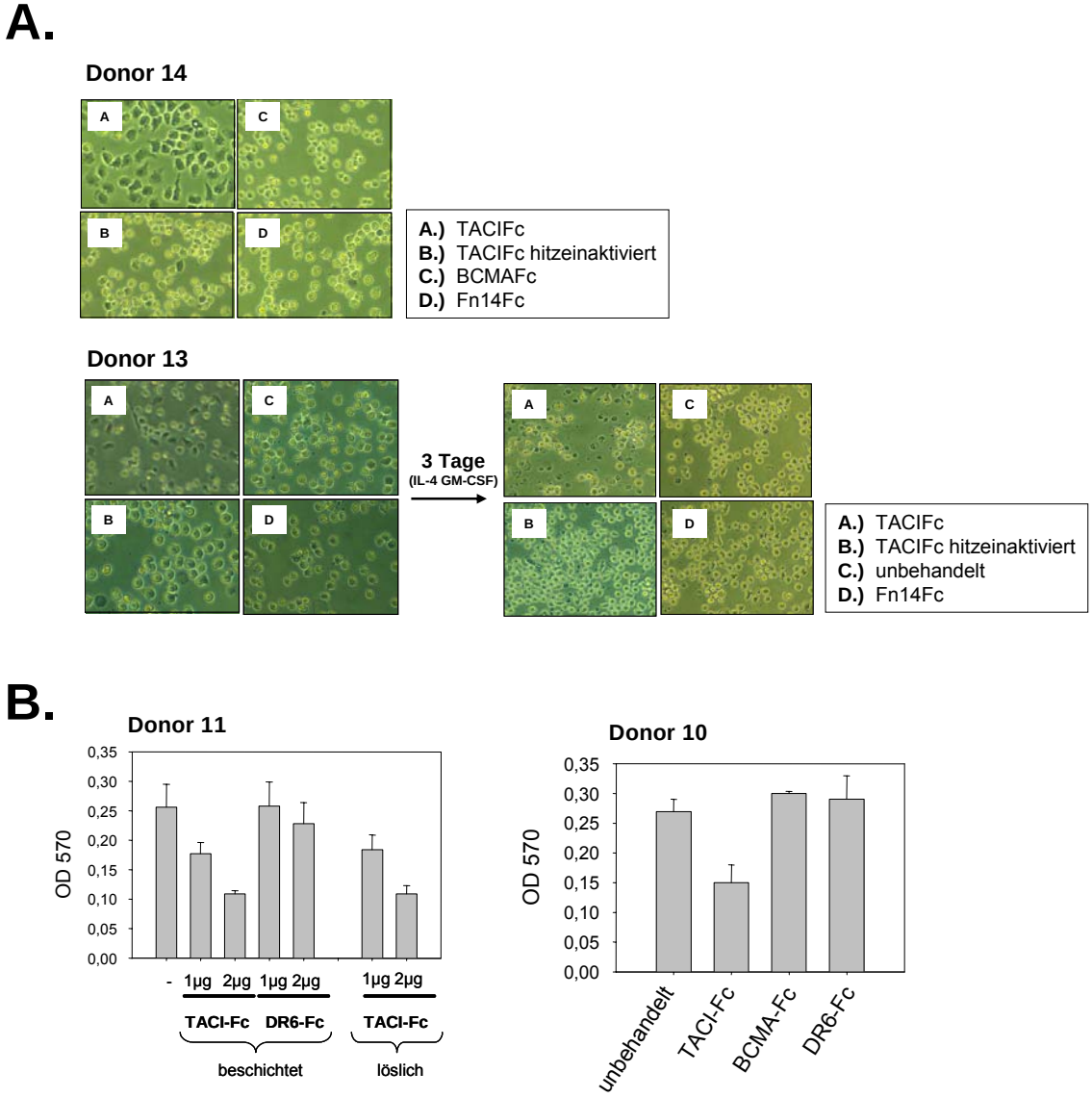


Abbildung 27: TACI induziert Adhäsion und Zelltod in mit IL-4/GMCSF behandelten primären Monozyten. **(A)** $1x10^6$ Monozyten wurden in 1 ml Monozytenmedium auf mit 1 µg Fc-Protein beschichteten und danach 2 x mit PBS gewaschenen 24-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Nach 5h wurden die Zellen im Phasenkontrastmikroskop (20 fache Vergrösserung) visualisiert. Nach drei Tagen wurde für Donor 13 die Morphologie der Zellen mit dem Phasenkontrastmikroskop dokumentiert. **(B)** $1x10^5$ Monozyten (Donor 11) wurden in 100 µl Monozyten-Medium auf mit 1 µg und 2 µg TACI-Fc oder Kontroll-Fc-Protein (DR6-Fc) beschichteten 96-Loch Flachbodenplatten ausgesät. Lösliches TACI-Fc wurde nach dem Ausplattieren der Zellen zugegeben. Nach drei Tagen wurde die Vitalität der Zellen mit dem MTT-Test bestimmt. **(C)** $1x10^5$ Monozyten (Donor 10) wurden wie in (B) ausgesät und 2 µg TACI-Fc, 2 µg BCMA-Fc und 2 µg DR6-Fc zu den Zellen gegeben. Nach drei Tagen wurde die Vitalität mit dem MTT-Test bestimmt.

Während der Differenzierung von Monozyten zu DCs werden APRIL und BAFF in den Kulturüberstand sezerniert (siehe **Abb.15B**). Da in Gegenwart von rekombinantem APRIL die Apoptose primärer Monozyten unterdrückt wird (siehe **Abb.20**), stellt sich die Frage, ob Neutralisation des von Monozyten produzierten APRIL-Proteins durch die löslichen Rezeptoren BCMA-Fc und TACI-Fc, das durch IL-4/GM-CSF induzierte Überlebens- und Differenzierungssignal unterdrücken kann. Dazu wurden Monozyten

in IL-4/GM-CSF-haltigem Medium ausplattiert, und BCMA-Fc bzw. TACI-Fc zu den Monozyten gegeben. Führt die durch APRIL induzierte Adhäsion von Monozyten zu deren Überleben (siehe **Abb.20**), so sterben überraschenderweise die auf TACI adhärierten Zellen (siehe **Abb.27**), obwohl die Wachstums- und Differenzierungsfaktoren IL-4/GM-CSF im Kulturmedium vorhanden sind, hingegen überleben mit BCMA-Fc, DR6-Fc (siehe **Abb.27 B**) oder Fn14-Fc (**Abb.27A**, Donor 13) behandelte Zellen.
Dies zeigt, dass Neutralisation der TNF-Homologiedomäne (THD) von APRIL nicht ausreicht, Zelltod in Monozyten auszulösen, da Zugabe von BCMA-Fc keinen Effekt auf das Überleben von Monozyten hat. APRIL weist eine zweiseitige Rezeptorspezifität auf (Hendriks et al., 2005; Ingold et al., 2005), d.h. APRIL ist in der Lage über seine THD mit TACI bzw. BCMA und über seine HBD mit GAG-Seitenketten von Proteoglykanen zu interagieren (siehe **Abb.13B**). Dieses Ergebnis legt den Schluss nahe, dass an BCMA-Fc gebundenes APRIL über die noch frei zugängliche HBD ein Überlebenssignal in die Zelle weiterleitet.

Dass TACI im Gegensatz zu BCMA Zelltod in mit IL-4/GM-CSF inkubierten Monozyten induziert (**Abb.27**), könnte auf eine Interaktion von TACI mit GAG-Ketten von Proteoglykanen zurückzuführen sein. Möglicherweise wird durch die von löslichem als auch von immobilisiertem TACI ausgelöste Adhäsion ein Todessignal in die Monozyten geleitet. Weiterhin ist denkbar, dass TACI mit IL-4 und GM-CSF um die Bindung an GAG-Ketten von Proteoglykanen kompetitiert, da auch diese Wachstumsfaktoren mit GAG-Ketten von Proteoglykanen interagieren (Lortat-Jacob et al., 1997; Wettreich et al., 1999).

IV Diskussion

Die Superfamilien der TNF-Liganden und -Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle während der Organogenese, der Homöostase, Entwicklung und Funktion des Immunsystems und bei der Übermittlung von Signalen, die sowohl das Überleben, als auch die Apoptose von Zellen regulieren (Locksley et al., 2001). Viele Mitglieder dieser Superfamilien haben nicht nur einen spezifischen Interaktionspartner, sondern ein Ligand kann mit mehreren Rezeptoren und/oder ein Rezeptor mit mehreren Liganden interagieren (Hehlgans et al., 2005).
Das APRIL/BAFF-Zytokin-System bildet eine Untergruppe der TNF-/TNF-R-SF, bestehend aus überlappenden und nicht überlappenden Bindungspartnern. So binden die Liganden APRIL und BAFF die Rezeptoren TACI und BCMA, allerdings interagiert BAFF noch mit einem weiteren Rezeptor, dem BAFF-R.
Schon kurz nach der Entdeckung von APRIL war klar, dass neben den schon bekannten Rezeptoren TACI und BCMA ein weiterer, APRIL-spezifischer Bindungspartner existieren musste (Hahne et al., 1998; Rennert et al., 2000). Lange Zeit wurde angenommen, dass es sich hierbei um ein noch unbekanntes Mitglied der TNF-R-SF handelt. Dieses konnte allerdings nicht bestätigt werden. Im Verlauf dieser Arbeit und von anderen Wissenschaftlern wurden polyanionische GAG-Ketten von Proteoglykanen als dritter Bindungspartner von APRIL auf Tumorzellen, T-, B-, und Plasmazellen identifiziert (Hendriks et al., 2005; Ingold et al., 2005). Interessanterweise konnten in dieser Arbeit und in einer vor kurzem veröffentlichen Publikation GAG-Ketten von Proteoglykanen ebenso als ein weiterer Bindungspartner von TACI identifiziert werden (Bischof et al., 2005). Die Erweiterung des APRIL/BAFF-Zytokin-Systems um einen zusätzlichen unerwarteten Bindungspartner, den an Proteoglykanen gebundenen GAG-Seitenketten, sowohl für den Liganden APRIL als auch den Rezeptor TACI, erfordert eine erneute Betrachtung der Wechselwirkungen von APRIL und TACI mit Zellen des Immunsystems. Dies liegt darin begründet, dass sich die Signalwege, die via TACI und APRIL in die Zelle weitergeleitet werden, abhängig vom Bindungspartner unterscheiden können. Bisher konnte in vielen Studien gezeigt werden, dass GAGs die Wechselwirkungen zwischen Liganden und Rezeptoren beeinflussen (Gan et al., 1994; Kireeva et al., 1996; Lee et al., 2004; Olson et al., 1991; Rapraeger et al., 1991; Tapanadechopone et al., 2001). Daher ist es unerlässlich, die Interaktion von APRIL und TACI mit Zellen des Immunsystems, im Hinblick auf die Interaktion mit GAG-Ketten von Proteoglykanen zu studieren.
Monozyten und DCs sind neben MΦ die Hauptproduzenten von APRIL. Da bekannt ist, dass die Expression von HSPGs auf der Zelloberfläche primärer humaner Monozyten während der Differenzierung zu MΦ ansteigt (Clasper et al., 1999), wurde in dieser Arbeit untersucht, ob Monozyten während der Differenzierung zu DCs ebenso Proteoglykane exprimieren und die an ihnen gebundenen GAG-Ketten einen möglichen weiteren Bindungspartner von APRIL und TACI darstellen.

1 Untersuchung der Interaktion von APRIL und TACI mit Glykosaminoglykan-Ketten und der Expression von APRIL in Monozyten und Dendritischen Zellen

Untersuchung der Interaktion von APRIL und TACI mit GAG-Ketten

Bis heute konnte für fünf Mitglieder der TNF-/TNF-R-SF eine Bindung an GAG-Ketten von Proteoglykanen nachgewiesen werden. So interagieren die TNF-Familienmitglieder TNF und APRIL sowie die TNF-R-Familienmitglieder OPG, TACI und DcR3 mit GAG-Ketten von Proteoglykanen. TNF bindet Biglykan und Dekorin, Proteoglykane der EZM, welche mit CS und DS substituiert sind (Tufvesson and Westergren-Thorsson, 2002). Weiterhin sind die löslichen Rezeptoren OPG (Standal et al., 2002; Yamaguchi et al., 1998) und DcR3 (Chang et al., 2006) in der Lage Zelloberflächen HSPGs zu binden. APRIL bindet HSPGs auf Tumorzellen (Hendriks et al., 2005) und GAG-Ketten von Proteoglykanen auf T-, B- und Plasmazellen (Ingold et al., 2005). TACI bindet HS-Seitenketten von Syndekan-1-, -2- und -4-überexprimierenden Jurkat-Zellen (Bischof et al., 2005).
Eine große Zahl an Wachstumsfaktoren und proinflammatorischen Zytokinen bindet GAG-Ketten von Proteoglykanen (Tanaka et al., 1998). Dazu gehören FGF-1 und -2, EGF und HGF (Ruoslahti and Yamaguchi, 1991), verschiedene Chemokine wie SDF-1 (Netelenbos et al., 2002; Sadir et al., 2001), RANTES (Vives et al., 2002), MCP-1, MIP-1α/β und IL-8 (Ali et al., 2000; Hoogewerf et al., 1997; Luster et al., 1995; Webb et al., 1993; Kawashima et al., 2003; Koopmann et al., 1999; Koopmann and Krangel, 1997; Webb et al., 1993), weiterhin IFN-γ (Lortat-Jacob and Grimaud, 1992; Fernandez-Botran et al., 1999; Lortat-Jacob and Grimaud, 1991; Lortat-Jacob et al., 1995) und GM-CSF (Wettreich et al., 1999), sowie viele Interleukine wie IL-1 (Ramsden and Rider, 1992), IL-2 (Najjam et al., 1998), IL-4 (Lortat-Jacob et al., 1997), IL-5, IL-6 (Lipscombe et al., 1998; Mummery and Rider, 2000), IL-7 (Clarke et al., 1995), IL-10 (Lipscombe et al., 1998; Salek-Ardakani et al., 2000; Tanaka et al., 1998), IL-11 (Walton et al., 2002) und IL-12 (Hasan et al., 1999). Auch wenn für viele dieser Faktoren die funktionelle Bedeutung der Interaktion mit GAGs noch nicht eindeutig bestimmt ist, so wird angenommen, dass GAGs die gebundenen Proteine vor Degradation schützen, als Lagerungsort für gebundene Proteine dienen, für deren gerichtete Präsentation an spezifische Rezeptoren notwendig sind und durch Bindung an die EZM Gradienten aufbauen, die für die gerichtete Migration von Zellen notwendig sind (Bernfield et al., 1999; Whitelock and Iozzo, 2005).

Der Vergleich heparinbindender Sequenzen in verschiedenden Proteinen führte zur Identifizierung bestimmter basischer Aminosäuresequenzen X**BBB**XX**B**X, X**BB**X**B**X, X**B**X**BB**X und X**BB**XX**B**X (wobei B eine basische Aminosäure ist und X irgendeine Aminosäure darstellt), die die Interaktion heparinbindender Proteine mit Heparin vermitteln (Cardin and Weintraub, 1989; Ali et al., 2002). Von Margalit *et al.* wurde ein alternatives Heparinbindemotiv beschrieben, in welchem ein Abstand von ~20Å zwischen den basischen Aminosäuren, die an gegenüberliegenden Seiten einer α-Helix oder einem β-Faltblatt liegen, wichtig für die Interaktion mit Heparin ist (Margalit et al., 1993). Weiterhin wurde von Hileman *et al.* vorgeschlagen, dass auch in der Kristallstruktur von Proteinen basische Motive sichtbar werden können, die zuvor in der linearen Aminosäuresequenz nicht erkennbar waren (Hileman et al., 1998).
Die Bindung von APRIL an polyanionische Polysaccharide auf der Zelloberfläche wird zu einem Großteil von einer Abfolge positiv geladener basischer Aminosäuren am N-Terminus von APRIL (**K**^{111}Q^{112}**K**^{113}**K**^{114}Q^{115}**H**^{116}) vermittelt (Hendriks et al., 2005; Ingold et al., 2005), sowie von weiteren basischen Aminosäuren innerhalb der THD (**R**^{146}, **R**^{189}, **H**^{220}). Diese bilden in der Kristallstruktur eine Art Plattform basischer Aminosäuren an der gegenüberliegenden Seite der TACI/BCMA-Bindestelle von APRIL (**Abb.8A**).

Die basischen Aminosäuren im TACI-Protein, die die Bindung an GAGs vermitteln sind bis heute nicht bekannt. Untersuchung der linearen Sequenz und der dreidimensionalen Kristallstruktur von TACI machten sowohl Cardin- und Weintraub- (Cardin and Weintraub, 1989) (**Abb.24A**), als auch Hileman- (Hileman et al., 1998) Sequenzen (**Abb.24B**) sichtbar. So entspricht die Abfolge der basischen Aminosäuren in humanem TACI **R**^{119}**R**^{120}Q^{121}**R**^{122} am C-Terminus der EC-Domäne einer Cardin- und Weintraub-Sequenz und die basischen Aminosäuren **R**^{72}, **K**^{73}, **K**^{77}, **K**^{98}, **K**^{107} und **R**^{109} möglicherweise einer Hileman-Sequenz, die in der Kristallstruktur an der 'Außenseite' von humanem TACI liegt und ein basisches Motiv formt (**Abb.24B**). Ob die basischen Aminosäuren am N-Terminus von TACI und in der CRD1 (**Abb.24A**) eine Hileman-Sequenz bilden, kann nicht gesagt werden, da diese bisher nicht kristallisiert wurden. Weiterhin ist eine Akkumulation basischer Aminosäuren am N-Terminus von humanem TACI **R**^{6}S^{7}**R**^{8}**R**^{9}G^{10}G^{11}**R**^{12}S^{13}**R**^{14} sichtbar (**Abb.24A**), die den heparinbindenden Motiven X**B**X**BB**X und X**BB**XX**B**X entsprechen, allerdings in der Aminosäuresequenz von murinem TACI fehlen (**Abb.24A**).

Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen HBD in Proteinen und negativ geladenen Sulfat- und Carboxylgruppen in GAGs (Heparin, HS) sind zu einem großen Teil für die Interaktion Protein-GAG verantwortlich. Die relative Affinität Protein-GAG beruht auf ionische Wechselwirkungen und kann daher mit Hilfe der NaCl-Konzentration gemessen werden, die benötigt wird, um das Protein von der Heparin-Affinitätsmatrix zu verdrängen (Thompson et al., 1994). Ist eine Salzkonzentration von >1M NaCl notwendig, um ein Protein von einer Heparin-Matrix zu eluieren, so kann von einer starken Interaktion ausgegangen werden, wohingegen Elution bei weniger als 300-400 mM NaCl eine relativ schwache Bindung mit Heparin darstellt (Conrad et al., 1998).

Es ist beschrieben, dass die Bindung der N-terminalen HBD Mutante Flag-APRIL 3K→A an Heparin-Sepharose bei physiologischer Ionenstärke (150 mM NaCl), aufgehoben ist (Hendriks et al., 2005; Ingold et al., 2005). Das in dieser Arbeit hergestellte Flag-IZ-APRIL-Konstukt eluierte bei 600 mM NaCl, und die N-terminale HBD Mutante Flag-IZ-APRIL 3K→A bei 200-400 mM NaCl von Heparin-Sepharose (**Abb.13A**). Dies zeigt, dass die Flag-IZ-APRIL 3K→A Mutante auch bei physiologischer Ionenstärke (150 mM NaCl) mit Heparin interagieren würde. Warum zeigen jedoch die Flag-APRIL Mutanten von Hendriks *et al.* und Ingold *et al.* bei physiologischer Ionenstärke keine Bindung an Heparin-Sepharose? Diese unterschiedliche Beobachtung könnte zum einen bedeuten, dass weitere basische Aminosäuren durch die stabilisierte Trimerisierung, vermittelt durch den Isoleuzin-Zipper, eine andere Konformation im APRIL-Protein einnehmen und so Heparin-Sepharose stärker binden können. Zum anderen ist es möglich, dass sich die basische Plattform, die sich erst ausbildet, wenn drei APRIL-Monomere eine Bindung eingehen (siehe **Abb.8A**), in der hier verwendeten Flag-IZ-APRIL 3K→A Mutante, erzwungen durch den Isoleuzin-Zipper, leichter ausbildet als in der Flag-APRIL 3K→A Mutante.
Es ist bekannt, dass z.B. die dimere Form des Chemokins MIP-1α eine höhere Affinität gegenüber HS aufweist als die monomere oder tetramere Form (Stringer et al., 2003). Ebenso bindet dimeres IL-8 ein HS-Saccharid, bestehend aus 22-24 Monosacchariden stärker als monomeres IL-8 (Spillmann et al., 1998). Es wird angenommen, dass GAGs zwei oder mehr HBD auf diesen dimeren Chemokinen binden, welches eine qualitativ stärkere Bindung bewirkt. Möglicherweise liegt die von Hendriks *et al.* und Ingold *et al.* hergestelle Flag-APRIL 3K→A Mutante bei physiologischer Ionenstärke nicht als Trimer vor. Das hier hergestellte Flag-IZ-APRIL 3K→A Konstrukt sollte durch den angefügten Isoleuzin-Zipper, bei physiologischer Ionenstärke als stabiles Trimer vorliegen und trotz der N-terminalen Mutationen eine basische Plattform aufweisen (siehe Kalottenmodell **Abb.8A**, von murinem TACI, in welchem ein Teil der HBD1 fehlt, allerdings weitere basische Aminosäuren innerhalb der THD die basischen Plattform bilden). Aufgrund dieser stabilen Trimerisierung kann Flag-IZ-APRIL 3K→A an Heparin-Sepharose binden, jedoch mit geringerer Affinität als Flag-IZ-APRIL
Da Flag-IZ-BAFF nicht an Heparin-Sepharose bindet (**Abb.13B**), kann ausgeschlossen werden, dass der Isoleuzin-Zipper für die Bindung von APRIL an Heparin verantwortlich ist. Ebenso wie das von Hendriks *et al.* untersuchte Flag-APRIL Konstrukt, können auch die hier hergestellten Flag-IZ-APRIL Konstrukte gleichzeitig mit Heparin-Sepharose und BCMA-Fc interagieren (**Abb.13B**) und bestätigen damit die zweiseitige Rezeptorspezifität von APRIL.

Vor kurzem wurden GAGs als Bindungspartner von TACI identifiziert (Bischof et al., 2005). Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Dass einer der schon bekannten APRIL-Rezeptoren TACI und/oder BCMA mit GAGs interagieren könnte, wurde vermutet: Erstens, weil für einige Liganden/Rezeptor-Paare wie Thrombin/Antithrombin und FGF/FGF-R bekannt ist, dass für eine produktive Interaktion beider Bindungspartner GAGs notwendig sind (Conrad et al., 1998; Robinson et al., 2005). Es ist daher vorstellbar, dass GAGs die APRIL/BAFF ↔TACI Interaktion regulieren, da sich die Affinitäten von APRIL und BAFF gegenüber TACI

nicht stark unterscheiden und GAGs hier möglicherweise das fehlende Bindeglied bei der Entscheidung einer präferentiellen APRIL- oder BAFF-Bindung an TACI sind. Zweitens, weil in dieser Arbeit in der linearen Aminosäuresequenz sowie in der Kristallstruktur von TACI, jedoch nicht von BCMA, potentielle heparinbindende Motive identifiziert werden konnten (**Abb.24**).
So bindet rekombinantes TACI-Fc im Gegensatz zu rekombinantem BCMA-Fc und BAFF-R-Fc an Heparin-Sepharose (**Abb.25A**). Allerdings eluierte TACI-Fc schon bei einer Salzkonzentration von 200-400 mM NaCl (**Abb.25B**), ein Hinweis auf eine schwache TACI-GAG-Interaktion *in vivo* bei physiologischer Ionenstärke. Die N-terminalen basischen Aminosäuren in humanem TACI $\mathbf{R}^6S^7\mathbf{R}^8\mathbf{R}^9$ waren nur zu einem Anteil für die Interaktion von TACI mit GAGs verantwortlich, da die Hauptfraktion der N-terminalen HBD Mutante TACI-Fc 3R→A bei 200 mM NaCl von der Heparin-Sepharose eluierte (**Abb.25B**). Das schon ein kleiner Teil bei 40 mM NaCl eluierte, ist ein Hinweis auf eine verminderte Interaktion dieser Mutante mit GAGs bei physiologischer Ionenstärke. Da nur in humanem, nicht jedoch in murinem TACI diese Abfolge basischer Aminosäuren am N-Terminus auftritt (**Abb.24A**) und ein Großteil der Mutante bei einer Salzkonzentration von >150 mM NaCl von der Heparin-Sepharose eluierte, kann vermutet werden, dass weitere basische Aminosäuren in TACI für die Bindung an das GAG Heparin verantwortlich sind. Experimente zur Überprüfung der Beteiligung weiterer basischer Aminosäuren an der Vermittlung der Bindung von TACI an GAGs werden derzeit unternommen. Dazu werden zum einen die basischen Aminosäuren, die an der 'Außenseite' der CRD2 von TACI liegen (**Abb.24B**) zu Alanin mutiert. Zum zweiten werden von den basischen Aminosäuren, die in der linearen Aminosäuresequenz von TACI akkumulieren (**Abb.24A** hellblau unterstrichen), Peptide generiert. Es wird interessant sein zukünftig zu untersuchen, ob diese Peptide möglicherweise die Bindung von TACI an Heparin-Sepharose bzw. an GAGs auf Monozyten und DCs inhibieren. Dies kann einen Hinweis auf die basischen Aminosäuren geben, die die Interaktion TACI-GAG vermitteln. Ebenso wie APRIL, hat auch TACI eine duale Rezeptorspezifität, da es gleichzeitig mit Heparin und BAFF interagieren kann (**Abb.25C**). Da viele heparinbindende Liganden/Rezeptor-Paare GAG-Ketten für eine produktive Interaktion benötigen, könnte dies ein Hinweis auf eine präferentielle Interaktion von APRIL und TACI in Anwesenheit von GAGs sein. Möglicherweise unterscheidet sich das Signal, welches nach BAFF- oder APRIL-Bindung in die TACI-exprimierende Zelle geleitet wird, abhängig von den GAG-Ketten der Proteoglykane auf der Zelloberfläche.

Die in den vorhergehenden Abschnitten diskutierten Affinitäten von APRIL und TACI gegenüber Heparin-Sepharose, gemessen anhand der Ionenstärke, die benötigt wird um die Proteine von Heparin-Sepharose zu eluieren, geben erstmals einen Hinweis auf die Bindungsstärke von APRIL und TACI gegenüber GAGs. Ein Vergleich der Affinität von rekombinantem APRIL (600 mM NaCl) sowie rekombinantem TACI (200-400 mM NaCl) mit der Affinität von anderen heparinbindenden Proteinen gegenüber Heparin-Sepharose, macht jedoch deutlich, dass APRIL und TACI eine schwache Bindung mit Heparin und damit möglicherweise auch mit GAGs auf der Zelloberfläche eingehen. Eluiert Heparin Kofaktor II auch bei einer niedrigen NaCl Konzentration von Heparin

(250mM) (Bohme et al., 2002), zeigen weitere heparinbindende Proteine wie OPG (550 mM NaCl) (Yamaguchi et al., 1998), GM-CSF (500 mM NaCl) (Wettreich et al., 1999) Antithrombin-α und -β (800 mM und 1,2 M NaCl) (Brennan et al., 1987; Picard et al., 1995) und PF4 (engl.: platelet factor 4 / 1,4 M NaCl) (Rucinski et al., 1990) eine sehr viel höhere Affinität gegenüber Heparin als APRIL und TACI.
Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass *in vivo* weitere Faktoren, wie die Interaktion von Wasserstoffbrücken zwischen protonierten Aminogruppen in den GAG-Ketten mit neutralen Aminosäureresten in APRIL und TACI (Hileman et al., 1998) und hydrophobe Interaktionen von N-Azetyl-Gruppen in GAG-Ketten mit Leuzin- und Tyrosin-Resten in APRIL und TACI (Caldwell et al., 1996; Nadkarni et al., 1996), eine Rolle bei der Protein-GAG-Interaktion spielen, die aufgrund der fehlenden Domänenstruktur von Heparin hier nicht sichtbar werden. Weiterhin gibt die Bestimmung der Ionenstärke, die zur Elution eines Proteins von Heparin notwendig ist, kein akkurates Bild der *in vivo* vorkommenden thermodynamischen Situation. So wird die Affinität eines Proteins gegenüber GAGs nicht nur durch die exakte Komplementarität der Ladungen bestimmt, sondern auch durch die Stärke der Reorganisation der an GAGs gebundenen Proteine (Szwajkajzer and Carey, 1997), d.h die Kooperativität, die entstehen kann, wenn sich die Konformation der an GAGs gebundenen Proteine ändert und dadurch eine stärkere Protein-GAG Interaktion bewirkt wird (Mulloy and Forster, 2000; Powell et al., 2004).

Heparin ist sehr viel stärker sulfatiert als HS (Tumova et al., 2000). So sind ungefähr 40-50% der Glukosamine in HS sulfatiert, hingegen 80-90% im Heparin der Mastzellen (Tumova et al., 2000). Im Gegensatz zu Heparin sind in HS-Ketten die sulfatierten Bereiche in Domänen organisiert, unterbrochen von nicht-modifizierten Bereichen (Tumova et al., 2000). Dieses spezifische Sulfatierungsmuster, welches durch das zelltypspezifische Repertoire an Sulfotransferasen, Epimerasen und weiterer GAG-modifizierender Enzyme bestimmt wird und sich abhängig vom Aktivierungszustand einer Zelle ändern kann, bestimmt die spezifische Protein-GAG Interaktion (Gallagher, 2001; Murphy et al., 2004; Gallagher and Walker, 1985; Lindahl et al., 1998; Turnbull and Gallagher, 1991a; Turnbull and Gallagher, 1991b). Heparin hat die höchste negative Ladungsdichte und neigt daher zu elektrostatischen Interaktionen mit einer Vielzahl von Proteinen. Auf der anderen Seite hat HS eine komplexere Struktur und geht daher spezifische Interaktionen mit Proteinen ein (Tumova et al., 2000), die bedingt durch die oben beschriebene Domänenstruktur und unter dem Einfluss weiterer *in vivo* vorkommender Faktoren wie pH-Wert (Goerges and Nugent, 2004; Lardner, 2001; Wettreich et al., 1999) und Ionenstärke der Umgebung (Powell et al., 2004) sowie divalenten Kationen (Ayotte and Perlin, 1986; Kan et al., 1996; Rabenstein et al., 1995), die Bindungsstärke zwischen GAGs und dem jeweiligen Protein beeinflussen.
Daher sind weitere Studien notwendig, die die genauen APRIL- und TACI-Bindestellen in HS identifizieren, deren Bindungsstärke feststellen und die Auswirkung der Bindung auf die Konformation von APRIL und TACI mittels Kristallstrukturanalysen oder 'Molecular Modelling' (Raman et al., 2003; Sadir et al., 2001; Vives et al., 2002) analysieren sollen. Methoden zur Charakterisierung der Proteinbindestelle in HS wurden in den letzten Jahren entwickelt. So wurden HS/Oligosaccharid-Banken (Jemth

et al., 2002; Seeberger and Haase, 2000; Yates et al., 2004) hergestellt, die eine Aussage über die optimale Minimalsequenz (Turnbull et al., 1999) die für die Protein-GAG-Interaktion notwendig ist, erlauben. Allerdings fehlt auch hier der Kontext der HS-Kette mit vollständiger Domänenstruktur, da diese *in vivo* lange Polysaccharid-Ketten bilden (**Abb.7**). Weiterhin kann durch Kalorimetrie, die die Wärme misst, die bei einer Protein-GAG-Interaktion frei wird, eine Aussage über die Bindungsstärke gemacht werden (Capila et al., 1999; Dong et al., 2001; Sigurskjold, 2000; Thompson et al., 1994) und Biosensor-Studien können die Bindungskinetik einer Protein-GAG-Interaktion messen (Edwards et al., 1995b; Fernig, 2001; Osmond et al., 2002; Schuck, 1997). Ein anderer, vielversprechender Ansatz ist die Herstellung von Zelllinien, die bestimmte Enzyme wie Glykosyltransfersasen, Sulfotransferasen und Epimerasen überexprimieren und dadurch eine definiert modifizierte HS-Kette auf der Zelloberfläche anreichern (Cheung et al., 1996; Liu et al., 1999; Pikas et al., 2000; Rong et al., 2001). Wird eine vermehrte Bindung eines Proteins auf der Oberfläche von Zellen, die ein bestimmtes Enzym überexprimieren, festgestellt, könnte durch Identifikation dieser Biosyntheseenzyme in Immunzellen eine Vorhersage über eine mögliche APRIL- bzw. TACI-GAG-Interaktion auf diesen Zellen gemacht werden. Weiterhin kann durch Verwendung von Zelllinien, die Mutationen der GAG-Biosyntheseenzyme aufweisen ebenso ein Hinweis auf eine präferentielle APRIL- bzw. TACI-GAG Interaktion erhalten werden (Esko and Selleck, 2002).

Interessant wäre die Klärung der Frage, ob Momomeres, Dimeres oder Trimeres APRIL und TACI eine unterschiedliche Avidität gegenüber Heparin/HS aufweisen, analog der oben genannten dimeren Chemokine MIP-1α und IL-8 mit der höchsten Avidität für Heparin/HS im Vergleich zur monomeren Form. Dies ist deshalb von Bedeutung, da die Mitglieder der TNF-R-Familie auf der Zelloberfläche als Monomere, Dimere oder schon präassoziert als Trimere vorliegen können (Naismith and Sprang, 1995) und weiterhin angenommen wird, dass die Liganden der TNF-Familie Homotrimere ausbilden (Locksley et al., 2001). Eine erhöhte Avidität von HS für eine der Formen ließe möglicherweise eine Aussage über das Vorliegen eines Monomeren, Dimeren oder Trimeren Rezeptors bzw. Liganden auf der Oberfläche von Zellen zu, die GAGs einer definierten Domänenstruktur exprimieren. Möglicherweise ist die Bildung von APRIL-Trimeren in Anwesenheit von GAGs definierter Struktur bevorzugt, da nur im Trimer eine optimale Ausrichtung der basischen Plattform auftritt (**Abb.8A**).

Es wird angenommen, dass die Kreuzvernetzung von Liganden deren membrangebundene Form nachahmt. So ist bekannt, dass GAGs zur Oligomerisierung von Chemokinen wie MCP-1 beitragen (Lau et al., 2004) und die Chemokine RANTES und MIP-1α/β von zytotoxischen T-Zellen im Komplex mit sulfatieren Proteoglykanen sezerniert werden (Wagner et al., 1998). Allerdings konnte durch Kreuzvernetzung von löslichem APRIL mit Heparin, welches zelluläre GAGs nachahmt, kein verstärktes Proliferationssignal in B-Zellen ausgelöst werden (Ingold et al., 2005). Dies wurde damit begründet, dass sich die Domänen-Struktur von Heparin und Zelloberflächen-GAGs stark unterscheiden und daher APRIL durch Heparin nicht optimal kreuzvernetzt wird (Ingold et al., 2005). Es ist beschrieben worden, dass rekombinant hergestelltes

APRIL Aggregate formt (Kalled et al., 2005; Wallweber et al., 2004). Auch in der hier hergestellten rekombinanten APRIL Form ist ca. 1/3 des Proteins aggregiert (**Abb.11B**). Unter den hier verwendeten Kultur- und Reinigungsbedingungen hat von Monozyten sezerniertes APRIL HSPGs gebunden (**Abb.19**). Dieses könnte auf eine Kreuzvernetzung von APRIL mit HS-Ketten von Proteoglykanen hinweisen.
Um eindeutig zu zeigen, dass Proteoglykane für die Aggregatbildung verantwortlich sind, soll zukünftig untersucht werden, ob auch APRIL, wenn dieses keine Proteoglykane gebunden hat, Aggregate bildet. Dazu wird die HBD-Mutante von APRIL sowie aus dem Überstand von mit Chlorat behandelten Zellen aufgereinigtes APRIL mittels Gelfiltration analysiert.

Möglicherweise hat auch *in vivo* von Zellen freigesetztes APRIL Proteoglykane gebunden. So ist vorstellbar, dass das Proteoglykan APRIL vor Degradation durch Proteasen schützt, APRIL durch das Proteoglykan multimerisiert wird und dadurch ein stärkeres Signal in eine TACI- bzw. BCMA-exprimierende Zelle leitet (Agonist), oder aber durch die Proteolyse der Proteoglykane die Zelloberfläche von gebundenem APRIL gereinigt wird und APRIL somit nicht mehr in seiner immobilisierten Form vorliegt, die möglicherweise für eine produktive Interaktion mit einer TACI- oder BCMA-exprimierenden Zelle notwendig ist (Antagonist).

Untersuchung der Expression von APRIL in Monozyten und Dendritischen Zellen

Myeloide Zellen gehören zu den Hauptproduzenten von APRIL und BAFF. APRIL wird während der Differenzierung von Monozyten zu DCs *in vitro* sezerniert, jedoch ist im Zellkulturüberstand mit LPS und CD40L aktivierter DCs kein lösliches APRIL detektierbar und die prozessierte APRIL Isoform-α tritt nur in Lysaten mit LPS stimulierter DCs auf (siehe **Abb.15B)** und (Craxton et al., 2003). Ob sich diese Isoform intrazellulär befindet oder an der Zellmembran gebunden ist, ist nicht bekannt.
Monozyten aus dem peripheren Blut exprimieren keine Proteoglykane auf der Zelloberfläche (Clasper et al., 1999). Erst nach Stimulation mit LPS oder Differenzierung zu MΦ ist das Proteoglykan Syndekan-2 auf der Zelloberfläche nachweisbar (Clasper et al., 1999). Auch in dieser Arbeit konnten auf Monozyten direkt nach der Isolation keine HSPGs nachgewiesen werden, allerdings stieg der Anteil an HSPGs während der Differenzierung von Monozyten zu DCs (**Abb.18**).

Rekombinantes Flag-IZ-APRIL zeigt eine starke Bindung auf Monozyten während der Reifung zu DCs (**Abb.16**). Daher wurde vermutet, dass auch von diesen Zellen sezerniertes APRIL auf diese Zellen zurückbinden und so in deren Lysaten nachweisbar sein sollte. In dieser Arbeit wurden GAG-Ketten von Proteoglykanen als Bindungspartner von APRIL auf Monozyten und DCs identifiziert.
Da rekombinantes APRIL Tag 1 Monozyten bindet (**Abb.16**) und Tag 1 Monozyten

kaum Proteoglykane mit HS-Ketten exprimieren (**Abb.18**), kann angenommen werden, dass APRIL CS-haltige Proteoglykane auf Tag 1 Monozyten bindet. Dies steht in Einklang mit Daten weiterer Studien, die CSPGs auf mit LPS stimulierten humanen Monozyten und aus humanen Monozyten generierten MΦ feststellen konnten (Kolset et al., 1983; Uhlin-Hansen et al., 1989; Uhlin-Hansen et al., 1993). Interessanterweise steigt der Anteil an Proteoglykanen mit HS-gebundenen Seitenketten während der Differenzierung zu DCs (**Abb.18**). Es werden HSPGs unterschiedlichen MWs sichtbar. Das am stärksten HS-haltige Proteoglykan in DCs hat ein MW von ~42 kDa und könnte Syndekan-2 darstellen (Clasper et al., 1999; Schofield et al., 1999). Es kann angenommen werden, dass von Monozyten und DCs sezerniertes APRIL GAG-Ketten von Syndekanen auf derselben Zelle bindet und dadurch kreuzvernetzt. Eine mögliche Erklärung dafür, dass trotz starker Flag-IZ-APRIL-Bindung kein endogen prozessiertes APRIL in Lysaten dieser Zellen nachweisbar war, könnte darin liegen, dass Ligandenbindung an GAG-Ketten von Proteoglykanen zu deren Clustering und Internalisierung führen kann (Fuki et al., 1997). Die mögliche Internalisierung des APRIL-Proteoglykan-Komplexes und dessen Degradation in Lysosomen könnte die Abwesenheit von Zelloberflächen-gebundenem APRIL in Lysaten von Monozyten während der Reifung zu DCs und in CD40L aktivierten DCs erklären (**Abb.15B**).

Eine weitere Erklärung dafür, dass in Lysaten dieser Zellen kein prozessiertes APRIL nachweisbar war, könnten proteolytische Enzyme in der Kultur sein, die von Monozyten während der Reifung zu DCs freigesetzt werden und Zelloberflächen-Proteoglykane und an Ihnen gebundene Liganden freisetzen können (Luikart, 1988; Savion et al., 1987; Vlodavsky et al., 2002). Dafür spricht, dass von Monozyten während der Reifung zu DCs sezerniertes APRIL HSPGs gebunden hat (**Abb.19**). Um welche Proteoglykane es sich dabei handelt, ist jedoch nicht bekannt. Da das von Monozyten sezernierte APRIL lösliche Proteoglykane gebunden hat, ist die Bindestelle für Zelloberflächen-Proteoglykane okkupiert, weshalb sezerniertes APRIL nicht auf die Zellen zurückbinden kann.

Dass in Lysaten LPS aktivierter DCs die prozessierte APRIL Form sichtbar ist (**Abb.15B**), könnte einerseits auf eine verminderte Internalisierung und Degradation des an Proteoglykanen gebunden APRIL-Proteins oder auf eine verminderte Proteolyse der Proteoglykane nach LPS-Stimulation zurückzuführen sein. Möglich ist auch, dass APRIL von mit LPS stimulierten DCs gar nicht freigesetzt wird. Es soll darauf hingewiesen werden, dass die Detektion von APRIL in Lysaten und im Überstand unstimulierter und mit LPS bzw. CD40L stimulierter DCs erst drei Tage nach der Stimulation erfolgte. Daher ist möglich, dass zu Beginn der DC-Aktivierung APRIL in den Überstand freigesetzt wurde und auch auf der Oberfläche von mit CD40L stimulierten DCs sichtbar war und somit verfügbar für TACI- und BCMA-exprimierende B-Zellen, die im Rahmen einer Immunantwort mit DCs interagieren würden (Balazs et al., 2002; Esko and Selleck, 2002). Dass APRIL nach 3 Tagen Stimulation nicht im Überstand und Lysat von mit CD40L und im Überstand von mit LPS stimulierten DCs nachweisbar war, könnte ein Hinweis auf eine Degradation des APRIL-Proteins und dass Ausklingen einer Immunantwort sein. So wäre vorstellbar,

dass auf der Zelloberfläche von DCs via Proteoglykane immobilisiertes APRIL mit TACI- bzw. BCMA-exprimierenden B-Zellen interagiert und die Anlagerung beider Zellen fördert, ähnlich der Formation der immunologischen Synapse zwischen einer DC und einer T-Zelle (Balazs et al., 2002) und Schema in **Abbildung 23A**.
In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung interessant, dass auch aus Monozyten *in-vitro*-generierte MΦ FGF-2 exprimieren und rekombinantes FGF-2 binden, jedoch kein endogenes FGF-2 auf der Zelloberfläche detektiert werden konnte (Clasper et al., 1999). Es wird angenommen, dass FGF-2 via HSPG internalisiert und dadurch die Zelloberfläche von FGF-2 befreit wird (Gannoun-Zaki et al., 1991; Roghani and Moscatelli, 1992; Rusnati et al., 1993). Auf diese Weise wird die Menge an FGF-2 limitiert, das FGF-R-exprimierende Zellen aktivieren könnte.

Zukünftig ist zu klären, ob von Monozyten während der Reifung zu DCs sezerniertes APRIL auf diese Zellen zurückbindet und daraufhin internalisiert und degradiert wird, proteolytische Enzyme Zelloberflächen-Proteoglykane degradieren und APRIL somit nicht auf diese Zellen zurückbinden kann oder APRIL selbst durch proteolytische Enzyme degradiert wird.
Die Internalisierung und Degradation von sezerniertem APRIL kann untersucht werden, indem die Bildung von Lysosomen durch Behandlung der Zellen mit Chloroquin inhibiert oder die Ansäuerung der Lysosomen durch NH_4Cl verhindert wird. Zusatz von Proteaseinhibitoren kann möglicherweise die Degradation der Proteoglykane inhibieren. Weiterhin sollte in Zukunft untersucht werden, ob durch Behandlung der Monozyten mit Chlorat die Menge an sezerniertem APRIL ansteigt. Da durch die Chlorat-Behandlung die an den GAGs gebundenen negativ geladenen Sulfatgruppen fehlen, kann sezerniertes APRIL nicht mehr auf die Zellen zurückbinden, weshalb die Menge an sezerniertem APRIL im Kulturmedium ansteigen sollte.

Abbildung 28 gibt einen Überblick über die möglichen Wechselwirkungen von APRIL und TACI mit Proteoglykanen.

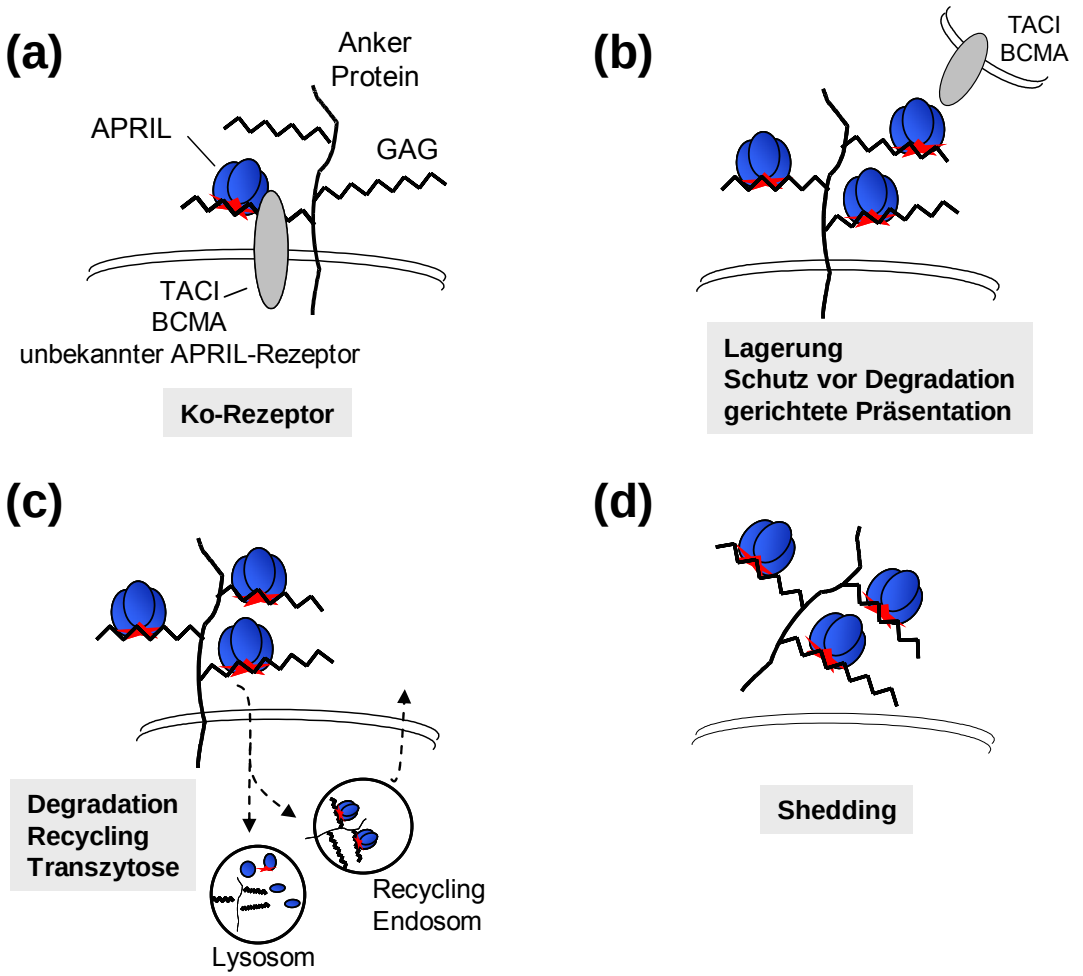


Abbildung 28: Schematische Darstellung möglicher Wechselwirkungen von APRIL und TACI mit Proteoglykanen.
(a) Eine direkte Interaktion von APRIL mit TACI und/oder BCMA oder einem noch unbekannten APRIL-Rezeptor ist nur in Anwesenheit von Proteoglykanen möglich, die möglicherweise das fehlende Bindeglied einer präferentiellen APRIL-Bindung an dessen Rezeptoren darstellen. Es ist denkbar, dass die Bindung von APRIL und TACI an GAG-Ketten von Proteoglykanen eine Konformationsänderung in den gebundenen Proteinen verursacht, die eine verstärkte Liganden/Rezeptor-Interaktion bewirkt. **(b)** Durch Bindung an GAG-Ketten von Proteoglykanen wird die lokale APRIL-Konzentration erhöht. Proteoglykane schützen das an ihnen gebundene APRIL- bzw. TACI-Protein vor Degradation durch Proteasen und ermöglichen eine gerichtete Präsentation des APRIL-Proteins an dessen Rezeptoren, wodurch möglicherweise eine Zell-Zell-Anlagerung bewirkt wird. **(c)** Internalisierung der Proteoglykane nach APRIL- bzw. TACI- Bindung führt entweder zur Degradation, zum Recycling oder zur Transzytose der gebundenen Proteine. **(d)** Shedding der Ektodomäne von Proteoglykanen und damit von gebundenem APRIL-Protein reduziert zelloberflächengebundenes APRIL. Das im Komplex mit Proteoglykanen freigesetzte APRIL-Protein kann entweder als Agonist (Bindung von APRIL an entfernte Rezeptoren) oder als Antagonist (APRIL kann über seine Heparinbindedomäne nicht mehr auf Zellen binden) wirken.

In bisherigen Studien wurde zwar die Expression von APRIL in Monozyten und Monozyten während der Reifung zu DCs untersucht, um welche Isoform von APRIL es sich bei dem von diesen Zellen sezernierten APRIL handelt, war bisher nicht bekannt. Durch Kontrolltransfektion von HEK293T-Zellen mit APRIL-Isoform-α und -β kodierenden Plasmiden, konnte erstmals gezeigt werden, dass die Isoform-β nicht sezerniert wird, sondern nur als membranintegriertes Protein vorkommt (**Abb.15A**).

Daher kann angenommen werden, dass es sich bei dem von Monozyten sezernierten Protein um die Isoform-α handelt. Da in APRIL-Isoform-γ drei Aminosäuren am C-Terminus fehlen, diese Differenz jedoch im SDS-PA-Gel nicht sichtbar ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch diese Isoform löslich exprimiert wird. Weitere Untersuchungen sollten aufklären, ob APRIL-Isoform-β eine ähnliche Funktion wie Δ-BAFF hat, in welchem die vom Exon 3 kodierende Aminosäuresequenz fehlt und welches die Freisetzung von membrangebundenem BAFF von der Zelloberfläche verhindert (Gavin et al., 2003).

2 Glykosaminoglykane auf Monozyten und Dendritischen Zellen stellen einen weiteren Bindungspartner für APRIL und TACI dar.

Es wird angenommen, dass von Monozyten, MΦ und DCs produziertes APRIL und BAFF parakrin wirken und unter anderem für den T-Zell-unabhängigen Ig-Klassenwechsel von B-Zellen verantwortlich sind (**Abb.5**). Allerdings wurde eine autokrine Wirkung dieser Liganden bisher nicht in Betracht gezogen.
Rekombinantes APRIL zeigt eine starke Bindung auf Monozyten während der Reifung zu DCs und die Bindung von APRIL auf DCs steigt nach Aktivierung mit LPS bzw. CD40L an (**Abb.16B**). Da diese Zellen keine Bindung von Flag-IZ-BAFF zeigen (**Abb.16B**), kann angenommen werden, dass TACI und BCMA als Bindungspartner hier nicht in Frage kommen. Monozyten exprimieren nach 24 h in der *in-vitro*-Kultur HSPGs und CSPGs auf der Zelloberfläche, deren Expression durch LPS noch gesteigert werden kann (Clasper et al., 1999; Kolset et al., 1983; Uhlin-Hansen et al., 1989) und vor kurzem konnten Zelloberflächen-GAGs als ein weiterer APRIL-spezifischer Interaktionspartner identifiziert werden (Hendriks et al., 2005; Ingold et al., 2005). Aufgrund der Resultate dieser Studien und der Beobachtung, dass Monozyten erst an Tag 1 nach der Isolation APRIL-Bindung zeigen, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die Interaktion von APRIL mit Monozyten während der Reifung zu DCs und auf aktivierten DCs, auf einer Interaktion mit GAG-Ketten von Proteoglykanen beruht.

Mit Hilfe unterschiedlicher Methoden, ist es möglich, Zelloberflächen-GAGs als einen Interaktionspartner von APRIL zu identifizieren. In dieser Arbeit wurden vier Methoden angewendet. Erstens wurde versucht, die Bindung von APRIL auf Monozyten und DCs mit Hilfe löslicher GAGs definierter struktureller Komposition zu inhibieren. Zweitens wurden Monozyten und DCs mit Chlorat behandelt, welches die Sulfatierung von GAG-Ketten kompetitiv hemmt. Drittens wurden mögliche HS-Ketten und CS-Ketten auf der Zelloberfläche von DCs mit Hilfe der Enzyme Heparitinase und C-ABC Lyase verdaut und viertens wurden die basischen Aminosäuren in der HBD1 von APRIL zu Alanin mutiert, um die Aminosäuren, die für die APRIL-GAG-Interaktion verantwortlich sind, zu identifizieren.

Dass lösliche GAGs wie Heparin und HS die Bindung von APRIL auf Monozyten während der Reifung zu DCs aufheben (**Abb.17A**) und Chlorat Vorbehandlung die Bindung von APRIL auf diesen Zellen reduziert (**Abb.17B**), zeigt, dass Zelloberflächen-GAGs den Interaktionspartner von APRIL auf diesen Zellen darstellen. Auch auf unstimulierten und mit LPS sowie CD40L stimulierten DCs ist die Bindung von Flag-IZ-APRIL sensitiv gegenüber einer Chlorat-Vorbehandlung (**Abb.17C**, unten), ein Hinweis auf sulfatierte GAG-Ketten von Proteoglykanen als der Interaktionspartner von APRIL auf DCs. Da die N-terminale HBD-Mutante Flag-IZ-APRIL 3K→A eine reduzierte Bindungsstärke auf DCs zeigt (**Abb.17C**), kann davon ausgegangen werden, dass die zu Alanin mutierten N-terminalen basischen Aminosäuren $\mathbf{K}^{110}$, $\mathbf{K}^{112}$ und $\mathbf{K}^{113}$ zum Teil für die Bindung von APRIL an Zelloberflächen-GAGs von DCs verantwortlich sind. Die starke Reduktion der APRIL-Bindung auf mit LPS und CD40L stimulierten DCs nach Heparitinase Behandlung (Verdau von HS-Ketten), jedoch kaum nach C-ABC Lyase Behandlung (Verdau von CS- und DS-Ketten) macht deutlich, dass HS- gebundene Proteoglykane den Hauptinteraktionpartner von APRIL auf aktivierten DCs darstellen (**Abb.17C**).
Da Behandlung von unstimulierten DCs mit Heparitinase oder mit C-ABC Lyase die Bindung von APRIL nicht reduziert (**Abb.17C**, oben), allerdings Chlorat Vorbehandlung zu einer vollständigen Aufhebung der APRIL-Bindung auf diesen Zellen führt, kann davon ausgegangen werden, dass nicht HS- oder CS- bzw. DS-Seitenketten von Proteoglykanen, sondern möglicherweise KS-Seitenketten für die Bindung von APRIL auf nicht stimulierten DCs verantwortlich sind. Daher soll in zukünftigen Experimenten die Bindung von APRIL auf unstimulierten Tag 10 DCs, die mit dem Enzym Keratanase behandelt wurden (Verdau von KS-Ketten) analysiert werden.

TACI bindet GAG-Ketten von Proteoglykanen (Bischof et al., 2005). Bisher wurde eine Interaktion von TACI mit Proteoglykanen auf Syndekan überexprimierenden Jurkat Zellen und HEK293T-Zellen nachgewiesen (Bischof et al., 2005). In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass TACI GAG-Ketten von Proteoglykanen auf Monozyten während der Reifung zu DCs (**Abb.26A**) und HSPGs auf DCs (**Abb.26B**) bindet. Es ist bekannt, dass Monozyten und DCs membrangebundenes BAFF exprimieren und dessen Expression nach Aktivierung dieser Zellen ansteigt (Litinskiy et al., 2002; Nardelli et al., 2001). Der überraschende Befund, dass TACI-Bindung auf Monozyten während der Differenzierung zu DCs nach Chlorat-Behandlung fast komplett aufgehoben ist, allerdings BCMA-Fc und BAFF-R-Fc eine unveränderte Bindung zeigen (**Abb.26A**), veranschaulicht, dass sich die Expression von membrangebundenem BAFF auf diesen Zellen durch die Behandlung nicht verändert hat. Dies kann auf der einen Seite bedeuten, dass GAG-Ketten den einzigen Ligand von TACI auf diesen Zellen darstellen. Auf der anderen Seite ist bekannt, dass GAGs die Konformation von Proteinen ändern können und gleichzeitig eine Art Brücke für zwei heparinbindene Proteine bilden. So wird durch die Bindung von Heparin an Antithrombin III dessen Konformation so verändert, dass es aktives Thrombin binden kann und Thrombin gleichzeitig mit demselben Heparin-Molekül interagiert (Dementiev et al., 2004; Li et al., 2004). Ebenso ist die Signalweiterleitung von FGF via

dessen Rezeptor FGF-R abhängig von Zelloberflächen-GAGs, die sowohl FGF als auch den FGF-R binden (Schlessinger et al., 2000) und die Bindung von FGF-2 an den FGF-R auf mit Chlorat behandelten Fibroblasten erst in Anwesenheit löslicher GAGs möglich (Rapraeger et al., 1991; Wu et al., 2003; Zhang et al., 2001). Es wird angenommen, dass GAG-Ketten von Proteoglykanen einen Ko-Faktor für die Interaktion heparinbindender Liganden und Rezeptoren darstellen.
Eine interessante Möglichkeit besteht daher darin, dass zellgebundene GAGs notwendig sind, um die Konformation von TACI so zu ändern, dass es erst dann mit BAFF und/oder APRIL auf diesen Zellen interagieren kann.

3 APRIL und TACI vermitteln Adhäsion von Monozyten via Glykosaminoglykane und induzieren ein Überlebens- und Differenzierungssignal (APRIL) und ein Todessignal (TACI) in Monozyten

Experimente, in denen für die Identifizierung des TACI- (**Abb.26A**) und APRIL-Bindungspartners (**Abb.17B**) mit Chlorat behandelte Zellen benutzt wurden, deuten darauf hin, dass APRIL und TACI auf Tag 1-3 Monozyten GAG-Ketten von Proteoglykanen binden.
Zusätzliche Analysen zeigten, dass diese Aktivität kritisch für die Induktion von Zelladhäsion primärer humaner Monozyten auf APRIL war, da das Adhäsionssignal der N-terminalen HBD-Mutante von APRIL verringert war (**Abb.22A**).
Es ist bekannt, dass Kreuzvernetzung von Zelloberflächenproteoglykanen durch immobilisierte heparinbindende Proteine Zelladhäsion auslöst (Woods et al., 1998). So induziert immobilisiertes Flag-IZ-APRIL Adhäsion von Monozyten. Zwar adhärieren Monozyten auch auf der N-terminalen HBD-Mutante von APRIL, allerdings kann dieses Adhäsionssignal nicht über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten werden (**Abb.22A**). Dieses Adhäsionssignal wird von der N-terminalen HBD in APRIL vermittelt, da primäre humane Monozyten nach 4 Tagen der *in-vitro*-Kultur eine stärkere Adhäsion auf immobilisiertem Flag-IZ-APRIL als auf der N-terminalen HBD-Mutante Flag-IZ-APRIL 3K→A zeigen (**Abb.22A**). Trotz der verringerten Adhäsion der Mutante sind sowohl Flag-IZ-APRIL als auch Flag-IZ-APRIL 3K→A in der Lage, ein Überlebenssignal in Monozyten zu induzieren, die ohne IL-4 und GM-CSF als Wachstums- und Differenzierungsfaktoren kultiviert wurden (**Abb.22B**).
Dies zeigt, dass APRIL, ausgelöst durch die initiale Adhäsion, ein Überlebenssignal in Monozyten induziert, die ohne Wachstumsfaktoren kultiviert wurden. Primäre humane Monozyten, die *in vitro* ohne Wachstums- bzw. Differenzierungsfaktoren (GM-CSF, M-CSF, IL-4), proinflammatorischen Zytokinen (TNF-α, IFN-γ) oder LPS kultiviert werden, sterben via Apoptose (Kiener et al., 1997a; Kiener et al., 1997b; Mangan and

Wahl, 1991; Mangan et al., 1991). Es wird angenommen, dass die spontane Apoptose von Monozyten *in vitro* durch eine CD95-CD95L Interaktion auf benachbarten Monozyten ausgelöst wird (Kiener et al., 1997b; Perlman et al., 1999; Perlman et al., 2001a; Perlman et al., 2001b). IL-4, IL-10, LPS und TNF-α inhibieren die spontane Apoptose von Monozyten durch Hochregulation des antiapoptotischen Proteins cFlip, welches Todesrezeptor-vermittelte Apoptose inhibiert (Eslick et al., 2004; Perlman et al., 1999; Perlman et al., 2001b).
Immobilisiertes APRIL verhindert die spontane Apoptose von Monozyten *in vitro* über einen Zeitraum von mindestens 72 h (**Abb.20C**). Im Gegensatz dazu kann lösliches APRIL die spontane Apoptose primärer humaner Monozyten nicht verhindern (Daten nicht gezeigt). Zukünftig soll untersucht werden, ob APRIL ebenso wie IL-4, IL-10, LPS und TNF-α die Apoptose von Monozyten durch Erhöhung des intrazellulären cFlip-Proteins bewirkt und/oder weitere anti-apoptotische Moleküle wie Bcl-2-Familienmitglieder (Reddig and Juliano, 2005) bzw. Veränderung der CD95/CD95L-Expression für das APRIL-vermittelte Überlebenssignal verantwortlich sind.

Multiple Zytokine sind in die Differenzierung von Monozyten zu MΦ und DCs während unterschiedlicher Stadien ihrer Entwicklung involviert. Weiterhin bilden Monozyten des peripheren Blutes eine heterogene Population, sichtbar an der Expression unterschiedlicher Oberflächenmarker, die auf eine unterschiedliche physiologische Bedeutung der Monozyten *in vivo* hindeuten (Gordon and Taylor, 2005). Es wird zwar angenommen, dass im Blut zirkulierende Monozyten Vorläufer von Gewebs-MΦ und DCs darstellen, die vor allem bei Entzündungen in das Gewebe rekrutiert werden (Gordon and Taylor, 2005), es ist allerdings noch nicht vollständig klar, welche Faktoren deren Differenzierung zu MΦ bzw. DCs bestimmen (Becker et al., 1987; Chapuis et al., 1997; Randolph et al., 1999; Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Zwar ist das Ausmaß, in welchem Monozyten *in vitro* zu MΦ bzw. DCs differenzieren, abhängig von Faktoren in der Zellkultur (Grage-Griebenow et al., 2001), allerdings kann so ein erster Hinweis auf eine mögliche funktionelle Rolle dieser Faktoren auf die Differenzierung von Monozyten zu MΦ bzw. DCs *in vivo* erhalten werden.
Nach Kontakt mit IL-4 und GM-CSF (Zytokine, die von Mastzellen im Gewebe produziert werden) differenzieren Monoyzten *in vitro* zu unreifen DCs (Sallusto and Lanzavecchia, 1994; Zhou and Tedder, 1996). Zugabe von IFN-α/β (Blanco et al., 2001; Paquette et al., 1998), TNF-α (Chomarat et al., 2003) oder Kultivierung von Monozyten mit GM-CSF plus TGF-β, IL-15 oder IL-13 (Geissmann et al., 1998; Mohamadzadeh et al., 2001; Piemonti et al., 1995) induziert deren Differenzierung zu DCs. Im Gegensatz dazu differenzieren Monozyten in Anwesenheit von M-CSF (Becker et al., 1987), PF4 (Scheuerer et al., 2000), IL-6 (Chomarat et al., 2000) oder IL-10 (Allavena et al., 1998) zu MΦ. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass Zytokine in der Umgebung von Monozyten deren Differenzierung zu MΦ und DCs kontrollieren. Interessanterweise binden die beschriebenen Differenzierungsfaktoren (IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α, IFN-γ, PF4, GM-CSF und M-CSF) ebenso wie APRIL GAG-Ketten von Proteoglykanen.

APRIL interagiert *in vivo* sowohl mit GAG-Ketten von Proteoglykanen als auch mit den TNF-R-Familienmitgliedern TACI und BCMA, die v.a. auf B-Zellen und Plasmazellen exprimiert werden (Hendriks et al., 2005; Ingold et al., 2005). In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass APRIL eine duale Rezeptorspezifität aufweist (**Abb.13B)** (Hendriks et al., 2005; Ingold et al., 2005). Es wurde weiterhin beobachtet, dass nur die immobilisierte Form von APRIL, welche die membrangebundene Form nachahmt, ein Adhäsions- und Überlebenssignal in Monozyten auslöst. Diese Resultate führten zu der Vermutung, dass die durch Bindung von APRIL an TACI bzw. BCMA bewirkte definierte Ausrichtung der HBD möglicherweise ein stärkeres Adhäsionssignal in Monozyten auslösen könnte.

In der Tat bewirkt immobilisiertes Flag-IZ-APRIL im Komplex mit BCMA eine verstärkte Adhäsion von Monozyten innerhalb von 4 h (**Abb.23B**, nicht gezeigt). Die HBD-Mutante von APRIL im Komplex mit BCMA induzierte eine stark vermindertes Adhäsionssignal (**Abb.23B**, nicht gezeigt). Immobilisiertes Flag-IZ-APRIL im Komplex mit Fn14-Fc, einem TNF-R-Familienmitglied, welches keine Bindung mit APRIL eingeht, sowie löslicher Flag-IZ-APRIL/BCMA Komplex, induzierten keine Adhäsion von Monozyten innerhalb von 4 h (**Abb.23B**, nicht gezeigt). Dies zeigt, dass APRIL nur im Komplex mit BCMA und gleichzeitiger Immobilisierung ein Adhäsionssignal in Monozyten auslösen kann.

Die durch Bindung von APRIL an BCMA bewirkte definierte Ausrichtung der HBD und die dadurch vermittelte erhöhte Adhäsion, sowie das verstärkte Überlebenssignal deuten auf eine Beteiligung von BCMA bzw. TACI auf B- und Plasmazellen an einem APRIL-vermittelten Überlebens- und möglicherweise Differenzierungssignal für Monozyten *in vivo* hin. Dass APRIL über seine HBD ein Differenzierungssignal in Monozyten auslösen könnte, kann deshalb vermutet werden, weil fast alle Monozyten, nach Kultur für vier Tage auf immobilisiertem Flag-IZ-APRIL/BCMA Komplex, allerdings kaum auf der HBD1-Mutante im Komplex mit BCMA, adhärent verblieben waren (**Abb.23B und C**). Diese stark konfluenten Zellen implizieren eine mögliche *in-vivo*-Rolle von APRIL bei der Differenzierung von Monozyten zu MΦ oder DCs.

Die Akkumulation von Leukozyten im Entzündungsgewebe ist nicht nur abhängig von chemotaktischen Signalen, sondern auch von Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen (Wahl et al., 1993). Es wäre daher vorstellbar, dass das von aus dem Blut in das Entzündungsgewebe migrierten Monozyten produzierte APRIL, über die THD an BCMA bzw. TACI exprimierende Zellen bindet und mit der noch freien HBD gleichzeitig an Monozyten gebunden bleibt. Die durch APRIL induzierte Immobilisierung sowohl von TACI/BCMA auf B-, Plasmazellen und möglicherweise auch auf T-Zellen, als auch von Proteoglykanen auf Monozyten, induziert möglicherweise ein verstärktes Signal in die TACI/BCMA-exprimierende Zelle (z.B. Ig-Klassenwechsel), als auch ein Überlebens- und Differenzierungssignal in Monozyten, die dann möglicherweise abhängig von Signalen weiterer Zytokine und Wachstumsfaktoren in der Umgebung zu MΦ bzw. DCs differenzieren. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass APRIL weitere Faktoren wie IL-6 und/oder M-CSF in Monozyten induziert, die die Differenzierung von Monozyten zu MΦ auslösen. Dies soll in zukünftigen Experimenten mittels ELISA und blockierender Antikörper überprüft werden.

Das Konzept, dass Wachstumsfaktoren sowohl prarakrin als auch autokrin wirken, wurde vor ca. 25 Jahren etabliert (Sporn and Todaro, 1980). Wachstumsfaktoren diffundieren nicht passiv in die Umgebung nachdem sie von der Zelle freigesetzt wurden, sondern die meisten dieser Faktoren enthalten bestimmte Motive, die ihre Interaktion mit anderen Proteinen der EZM bewirken. Diese Interaktion bestimmt den Aktionsradius des Wachstumsfaktors bezogen auf den Ort und den Zeitpunkt der Freisetzung. Es ist vorstellbar, dass die Bindung von APRIL an GAGs auf MΦ und DCs dessen Diffusion verhindert, wodurch APRIL lokal verfügbar bleibt und auf kurzer Distanz mit benachbarten Zellen interagieren kann. Dies erlaubt möglicherweise eine effizientere Präsentation und Interaktion von APRIL mit TACI und BCMA (siehe Schema **Abb.23A**).

APRIL-defiziente Mäuse zeigen eine normale Struktur der Lymphorgane (Castigli et al., 2004; Varfolomeev et al., 2004) und keinen Phänotyp, der auf eine Rolle von APRIL als Differenzierungsfaktor von Monozyten zu MΦ bzw. DCs schliessen lässt. Dies liegt möglicherweise darin begründet, dass weitere redundante heparinbindende Wachstumsfaktoren die Funktion von APRIL übernehmen können.
Zukünftig soll durch Bestimmung der Zelloberflächenmarker und der sezernierten Zytokine, sowie durch Untersuchung der Phagozytosefähigkeit und der Fähigkeit Proliferation allogener T-Zellen in einer gemischten Lymphozytenreaktion auslösen zu können, ein Hinweis auf eine mögliche Differenzierung der auf APRIL adhärierten Monoyzten zu MΦ oder DCs erhalten werden.

Adhäsive Interaktionen zwischen Zellen und der EZM regulieren eine Vielzahl biologischer Prozesse, die die Zellmorphologie, die Proliferation, die Differenzierung, die Migration und das Überleben von Zellen beeinflussen (Adams and Watt, 1993; Ashkenas et al., 1996; Giancotti, 1997; Gumbiner, 1996; Howe et al., 1998).
Verschiedene Wachstumsfaktoren wie M-CSF, SCF und TGF-α (Anklesaria et al., 1990; Flanagan et al., 1991; Uemura et al., 1993) können Adhäsion von Zellen auslösen. Es wird angenommen, dass der membranverankerte Wachstumsfaktor auf einer Zelle mit seinem Transmembran-Rezeptor auf einer anderen Zelle interagiert und so die Zell-Zell-Interaktion fördert. So bewirken die Transmembran-Formen von TGF-α und M-CSF die Anlagerung von Zellen die ihren spezifischen Rezeptor exprimieren (Anklesaria et al., 1990; Flanagan et al., 1991). In diesem Fall sind sowohl der Ligand als auch der Rezeptor transmembrangebunden. Es ist beschrieben, dass heparinbindende lösliche Wachstumsfaktoren wie FGF-2 eine Zell-Zell-Anlagerung bewirken können, indem z.B. FGF-2 simultan HSPG auf der einen Zelle und FGF-Rezeptor auf einer zweiten Zelle bindet (Clasper et al., 1999; Richard et al., 1995). Weiterhin induziert auf Endothelzellen via Proteoglykane immobilisiertes MIP-1β durch Bindung an VCAM-1 Adhäsion von T-Zellen (Tanaka et al., 1993).
Zukünftig kann nun getestet werden, ob die Bindung von rekombinantem APRIL an Proteoglykane auf Tag 1 Monozyten, MΦ und DCs zu dessen Bindung an eine TACI- oder BCMA- exprimierende Zelle führt, und ob zellgebundenes TACI bzw. BCMA Differenzierung von Monozyten zu MΦ oder DCs induziert. Dazu werden in Ba/F3 Zellen, welche über keine Zelloberflächen-GAGs verfügen, TACI und BCMA

ektopisch exprimiert. Die Verwendung GAG-negativer, rezeptorexprimierender Zellen ist wichtig, da APRIL sonst möglicherweise von GAGs auf den myeloiden Zellen dissoziieren würde. Möglicherweise kann APRIL durch gleichzeitige Bindung der GAGs auf myeloiden Zellen und TACI bzw. BCMA auf den Ba/F3-Zellen Zell-Zell-Anlagerung und ein Differenzierungssignal in Monozyten auslösen.

Vor kurzem wurden in den TNF-R-Familienmitgliedern DcR3 und OPG HBD identifiziert (Chang et al., 2006; Standal et al., 2002; Yamaguchi et al., 1998), die in Monozyten und der monozytären Zelllinie THP-1 Adhäsion auslösen (Chang et al., 2006). Es konnte gezeigt werdem, dass HS-Ketten von Syndekan-2 und CD44v3 für die Adhäsion verantwortlich waren (Chang et al., 2006).
Ebenso wie DcR3 und OPG induziert auch TACI-Fc Adhäsion humaner Monozyten innerhalb von einer Stunde (**Abb.27A**). Im Gegensatz dazu adhärieren keine Monozyten auf mit BCMA-Fc beschichteten Zellkulturplatten (**Abb.27A**), so dass ausgeschlossen werden kann, dass die Monozyten via membrangebundenem APRIL oder BAFF an TACI adhärierten. Daher wird vermutet, dass das Adhäsionssignal via GAG-Ketten von Proteoglykanen auf diesen Zellen vermittelt wird. Um eindeutig zu zeigen, dass die Adhäsion auf TACI via GAG-Ketten von Proteoglykanen induziert wird, sind weitere Experimente erforderlich. Dies kann durch Verdau der Zelloberflächen GAGs mit Heparitinase und C-ABC Lyase sowie Kompetition mit löslichen GAGs und Peptiden der HBD von TACI untersucht werden.

Interessanterweise führte die Behandlung von humanen RA-Synovium-SCID-Maus-Chimären mit TACI-Fc in den Mäusen, die Synovia-Gewebe mit ektopischen Keimzentren implantiert bekamen, zu einer Zerstörung des FDC-Netzwerkes und dadurch bedingter Reduktion der Infiltrate (Seyler et al., 2005). Weiterhin führt TACI-Fc-Behandlung zur Zerstörung der Keimzentren immunisierter Mäuse (Yan et al., 2000). Im Gegensatz dazu können BCMA-Fc-behandelte Mäuse Keimzentren bilden, die allerdings nicht aufrechterhalten werden (Vora et al., 2003). TACI-Fc-tg Mäuse zeigen im Gegensatz zu BCMA-Fc-tg Mäusen eine stark verminderte Anzahl an B-Zellen (T2-, MZ- und FO-B-Zellen), sowie eine verminderte Anzahl an FDCs, DCs und MΦ in den Keimzentren (Schneider et al., 2001). Weiterhin sind in $TACI^{-/-}$-Mäusen DCs in der T-Zell-Zone und MZ der Milz vermehrt (Yan et al., 2001b), und die B-Zellen in diesen Mäusen hyperproliferieren.
Dass mit TACI-Fc-behandelte Mäuse keine Keimzentren bilden bzw. TACI-Fc-tg Mäuse eine stark verminderte Anzahl an B-Zellen und FDCs, DCs und MΦ in den Keimzentren aufweisen, und in $TACI^{-/-}$-Mäusen DCs in der T-Zell-Zone und MZ vermehrt sind und B-Zellen hyperproliferieren, kann unterschiedliche Ursachen haben.
Bisher wird angenommen, dass TACI-Fc das von MΦ und DCs sezernierte BAFF neutralisiert, welches dadurch nicht mehr als Überlebensfaktor für B-Zellen verfügbar ist. Dies führt zu einer Verminderung der B-Zell-Population in den Keimzentren, wodurch weniger LT-α vorhanden ist, welches wiederum einen kritischen Überlebensfaktor für FDCs darstellt. Da TACI-Fc-Behandlung in einem RA- und einem SLE-Mausmodell das Fortschreiten der Autoimmunerkrankungen blockieren konnte (Gross et al., 2000; 2001), befindet sich TACI-Fc in klinischen Studien der Phase I

(ZymoGenetics, Seattle und Serono, Genf) zur Behandlung von SLE, RA und B-Zell Tumoren (Kalled, 2005).
Allerdings erklärt die durch TACI-Fc vermittelte Neutralisation von BAFF nur zum Teil den oben beschriebenen Phänotyp von TACI-Fc-tg und TACI-Fc-behandelten Mäusen, da BCMA-Fc-tg Mäuse keinen Phänotyp zeigen (Schneider et al., 2001) und in mit BCMA-Fc-behandelten Mäusen die Keimzentren länger aufrecht erhalten werden (Vora et al., 2003). Dies führte zu der Vermutung, dass ein weiterer TACI-spezifischer Ligand existieren könnte (Vora et al., 2003). Möglicherweise handelt es sich bei diesem Liganden um die in dieser Arbeit und von Bischof *et al.* identifizierten GAG-Ketten von Proteoglykanen.

In dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass TACI-Fc Zelltod in Monozyten auslöst, obwohl diese in Medium mit Wachstumsfaktoren kultiviert wurden (**Abb.27**), und dieser Zelltod höchstwahrscheinlich via Zelloberflächen-Proteoglykane vermittelt wird, da BCMA-Fc keinen Effekt zeigte und nur TACI auf Monozyten und DCs GAG-Ketten von Proteoglykanen bindet (**Abb.26**). Ob TACI auch Zelltod in DCs auslöst, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.
Es ist auffällig, dass in den Keimzentren der Milz und in ektopischen Keimzentren bisher keine Zellen detektiert wurden, die TACI exprimieren (Ng et al., 2004; Seyler et al., 2005). Durch die Überexpression und Injektion von TACI-Fc gelangt TACI jedoch in die Keimzentren und induziert möglicherweise durch direkte Bindung an Zelloberflächen-Proteoglykane auf FDCs in den B-Zell-Follikeln, auf DCs in der T-Zell-Zone und MZ sowie auf MΦ in den Keimzentren Zelltod in diesen Zellen.
FDCs, DCs und MΦ exprimieren sowohl APRIL als auch BAFF (Litinskiy et al., 2002; Nardelli et al., 2001; Seyler et al., 2005). Es wäre daher weiterhin denkbar, dass TACI via membrangebundenem BAFF oder via an Proteoglykane gebundenem APRIL ein Todessignal in die Monozyten leitet. Obwohl Liganden traditionell Signalwege durch Bindung an ihren Rezeptor auslösen, gibt es in der TNF-/TNF-R-Familie einige Beispiele reverser bzw. bidirektionaler Signalweiterleitung, wobei der Rezeptor durch Bindung und Aktivierung des Liganden, ein Signal in die Liganden-exprimierende Zelle induziert (Eissner et al., 2004).

Bisher wird angenommen, dass Adhäsion von Zellen via Komponenten der EZM (Proteoglykane oder Integrine) das Überleben von Zellen fördert (Grossmann, 2002; Ilic et al., 1998). Allerdings konnte vor kurzem für das Matrix Protein CCN1 (CYR61) gezeigt werden, dass dieses Apoptose in Fibroblasten durch gleichzeitige Bindung an das Integrin $\alpha_6\beta_1$ und das Proteoglykan Syndekan-4 vermittelt (Todorovicc et al., 2005).
Die Adhäsion von Zellen ist ein komplexer Prozess, vermittelt von verschiedenen Zell-Oberflächen und Zell-Matrix assoziierten Proteinen, die zeitlich und räumlich miteinander interagieren. So ist beschrieben, dass die initale Adhäsion von Chondrozyten auf Fibronektin via das GAG Hyaluronsäure erfolgt (Cohen et al., 2006). In der zweiten Phase der Adhäsion kollabiert die stark hydratisierte Hyaluronsäure-Hülle wodurch Integrine in die Nähe ihrer Matrix-assoziierten Liganden (wie Fibronektin, Kollagen und Laminin) gebracht werden (Geiger and Bershadsky, 2002; Zimmerman et al., 2002) und so Integrin-vermittelte Adhäsion erfolgen kann (Cohen et

al., 2006). Es ist daher vorstellbar, dass die initiale Bindung von APRIL bzw. TACI an Monozyten via Zelloberflächen-GAGs erfolgt, dieses initiale Ereignis jedoch eine Veränderung in der EZM induziert, durch die weitere adhäsive EZM-Proteine wie Integrine aktiviert werden und so ein verstärktes Adhäsionssignal bewirken.

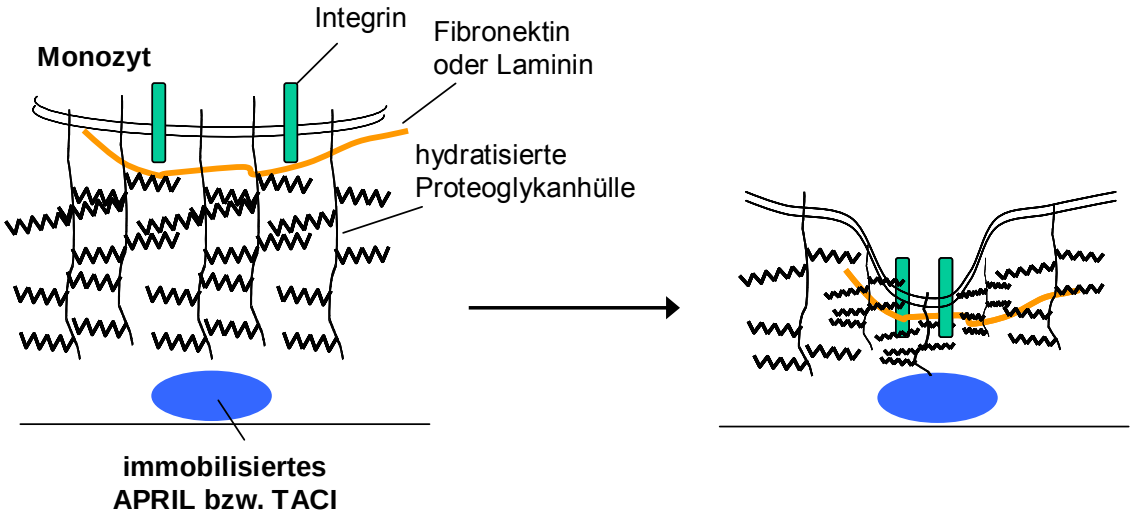


Abbildung 29: Mögliches Szenario der durch APRIL und TACI induzierten Adhäsion von Monozyten.
Nach initialem Kontakt der GAG-Ketten von Proteoglykanen auf Monozyten mit Heparinbindedomänen in APRIL und TACI kollabiert die hydratisierte Proteoglykanhülle. Dies Ereignis induziert Veränderungen in der EZM, die möglicherweise eine verstärkte Bindung multiadhäsiver Matrixproteine wie Fibronektin oder Laminin an Integrine bewirken, wodurch Signale in die Monozyten geleitet werden, die zu einer stabilen Adhäsion führen.

B-Zell-defiziente Mäuse, die mit TACI$^{-/-}$-B-Zellen rekonstituiert wurden, sind nicht in der Lage, nach Immunisierung die Expansion zytotoxischer T-Zellen (CTLs) auszulösen, allerdings kann die Expansion der CTLs durch geringe Mengen an löslichem TACI-Fc wiederhergestellt werden (Diaz-de-Durana et al., 2005). Weiterhin führt TACI-Fc-Behandlung von DCs zur deren Akivierung (Diaz-de-Durana et al., 2005). Dies deutet darauf hin, dass TACI auf B-Zellen *in vivo* eine wichtige Rolle bei der Induktion einer Immunantwort spielt, indem es die Reifung von DCs auslöst. Es wird angenommen, dass TACI den Liganden BAFF auf DCs bindet, da dieser transmembrangebunden ist und somit ein Signal in die DC nach TACI-Bindung leiten könnte (Diaz-de-Durana et al., 2005). In dieser Doktorarbeit konnte festgestellt werden, dass TACI v.a. mit GAG-Ketten von Proteoglykanen auf Monozyten und DCs interagiert. Daher wäre es ebenso möglich, dass TACI durch direkte Bindung an Proteoglykane auf DCs bzw. durch Bindung an APRIL, welches wiederum mit Proteoglykanen auf DCs interagiert, ein Differenzierungssignal in DCs auslöst.
Führt Injektion grosser Mengen TACI-Fc in Mäusen zur Zerstörung der Keimzentren

(Seyler et al., 2005; Yan et al., 2000) und Behandlung von Monozyten mit TACI-Fc zu deren Tod (**Abb.27**), so scheinen geringe Mengen TACI-Fc ein Aktivierungssignal in DCs auszulösen (Diaz-de-Durana et al., 2005).
Diese gegensätzliche Wirkung von TACI wird weiterhin sichtbar bei der Behandlung von humanem RA-Synovium-SCID-Maus-Chimären mit TACI-Fc. So unterscheiden sich die Immunzell-Infiltrate in Patienten mit RA. Zeigen ~25% der RA-Patienten Immunzell-Infiltrate, die ektopische Keimzentren bilden, so weisen 25% T-/B-Zell Aggregate und 50% diffuse T-/B-Zell Infiltrate auf (Seyler et al., 2005). Interessanterweise führte TACI-Fc-Behandlung nur in RA-Synovium-SCID-Maus-Chimären, denen Synovium mit ektopischen Keimzentren implantiert wurde, zu einer Zerstörung der Keimzentren. Im Gegensatz dazu erhöhte TACI-Fc-Behandlung die Inflammation in Mäusen denen Synovium mit T-/B-Zell Aggregaten bzw. Synovium mit diffusen T-/B-Zell Infiltraten implantiert wurde (Seyler et al., 2005).
Um diese unterschiedlichen Ergebnisse zu klären, soll in zukünftigen Experimenten untersucht werden, wie sich TACI-Fc auf das Überleben und die Differenzierung/Aktivierung von Monozyten, MΦ und DCs unter Betrachtung einer Wechselwirkung mit Proteoglykanen auf diesen Zellen, auswirkt. Dies könnte von Bedeutung sein, nicht nur für das Verständnis des dem Zelltod von Monozyten zugrundeliegenden Mechanismus, sondern auch aufgrund des erwähnten Einsatzes von TACI-Fc in klinischen Studien für die Behandlung von SLE, RA und B-Zell Tumoren von klinischer Relevanz sein.

V Anhang

1 Abkürzungen

Abb.	*Abb*ildung
Acc.No	engl.: Accession Number
AK	*Anti*körper
APRIL	engl.: *A* p*r*oliferation *i*nducing *l*igand
AS	*A*minos*ä*ure
ATP	*A*denosin*tri*p*h*osphat
B	*B*asische Aminosäure
BAFF	engl.: *B* cell *a*ctivating *f*actor belonging to the TNF *f*amily
BCMA	engl.: *B c*ell *m*aturation *a*ntigen
bp	*B*asen*p*aare
BSA	*B*ovines *S*eruma*l*bumin
D	Donor
DC	engl.: *D*endritic *c*ell
DS	*D*ermatansulfat
CAML	*Ca*lcium *m*odulator and cyclophilin *l*igand
CD	engl.: *C*luster of *d*ifferentiation
CRD	*C*ysteinreiche *D*omäne
CS	*C*hondroitinsulfat
CSPG	*C*hondroitinsulfat-*P*roteo*g*lykan
cDNA	Komplementäre DNA (engl.: *c*omplementary *DNA*)
DC	Dendritische Zelle (engl.: *d*endritic *c*ell)
DcR3	engl.: *dec*oy *r*eceptor *3*
DMSO	*Dim*ethylsulf*o*xid
EST	engl.: *E*xpressed *S*equence *T*ag
et al.	*et alii*
F(ab)2	*F*ragment *a*ntigen *b*inding
FACS	engl.: *F*luorescence *a*ctivated *c*ell sorter
Fc	engl.: *F*ragment *c*rystallisable
FCS	Fetales Kälberserum (engl.: *F*etal *C*alf *S*erum)
FDC	engl.: *F*ollicular *D*endritic *C*ell
FITC	*F*luorescein-*I*so*th*io*c*yanat
Fn14	engl.: fibroblast growth factor-inducible 14
g	*G*ramm
GAG	*G*lykos*a*mino*g*lykan
GC	Germinales Zentrum (engl.: *g*erminal *c*enter)
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
h	Stunde
HA	Hyaluronsäure (engl.: *H*yaluronic *a*cid)
HBD	*H*eparin*b*inde*d*omäne
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl.: *h*orse*r*adish-*p*eroxidase)
HS	*H*eparansulfat
HSPG	*H*eparansulfat-*P*roteo*g*lykan
IFN	*I*nter*f*ero*n*
Ig	*I*mmun*g*lobulin
IP	*I*mmun*p*räzipitation
IL	*I*nter*l*eukin

kDa	*K*ilo*da*lton
KS	*K*eratan*s*ulfat
λ	Wellenlänge
LT	*L*ympho*t*oxin
M	*M*olar
m	*M*urin
MΦ	*M*akrophage
MACS	engl.: *Ma*gnetic *C*ell *S*orting
min	*Min*uten
mRNA	engl.: *m*essenger *R*NA
MW	Molekulargewicht (engl.: *m*olecular *w*eight)
MZ	*M*arginalzone
OD	*O*ptische *D*ichte
OPG	*O*steo*p*rote*g*erin
PBL	*P*eriphere *B*lut *L*eukozyten
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (engl.: *P*hosphate *B*uffered *S*aline)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl.: *P*olymerase *C*hain *R*eaction)
PE	*P*hyco*e*rythrin
PG	*P*roteo*g*lykan
pH	*p*otentia *h*ydrogenii
PI	*P*ropidium *I*odid
pI	*i*soelektrischer *P*unkt
RNA	Ribonucleinsäure (engl.: *R*ibo*n*ucleid *A*cid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: *r*ounds *p*er *m*inute)
RSB	engl.: *r*educing *s*ample *b*uffer
RT	*R*aum*t*emperatur
s.u.	*s*iehe *u*nten
sek	*Sek*unde
SA-PE	*S*trept*a*vidin-*PE*
SDF-1	Engl.: *s*tromal cell-*d*erived factor 1
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: *S*odium *d*odecyl *S*ulphate)
SDS-PA-Gel	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gel
SP	*S*ignal*p*eptid
TACI	engl.: *t*ransmembran *a*ctivator and *C*AML *i*nteractor
tg	*trans*g*e*n
THD	*T*NF *H*omologie*d*omäne
TNF	*T*umor *N*ekrose *F*aktor
TNF-R	*T*umor *N*ekrose *F*aktor-*R*ezeptor
TNF/TNF-R-SF	*T*umor *N*ekrose *F*aktor/ *T*umor *N*ekrose *F*aktor-*R*ezeptor *S*uper*f*amilie
TRAF	*T*NF-*R*ezeptor *a*ssoziierter *F*aktor
TRAIL	engl.: *T*NF *r*elated *A*poptosis-*i*nducing *l*igand
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	*u*ltra*v*iolett
üN	*ü*ber *N*acht
v/v	Volumenprozent (engl.: *v*olume per *v*olume)
wt	*w*ild*t*yp
w/v	Gewichtsprozent (engl.: *w*eight per *v*olume)
X	unbestimmte Aminosäure

Für die Bezeichnung von Aminosäuren wurde der Ein-Buchstabencode verwendet.

2 Literaturverzeichnis

Adams, J.C. and Watt, F.M. (1993) Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development*, **117**, 1183-1198.

Ali, S., Fritchley, S.J., Chaffey, B.T. and Kirby, J.A. (2002) Contribution of the putative heparan sulfate-binding motif BBXB of RANTES to transendothelial migration. *Glycobiology*, **12**, 535-543.

Ali, S., Palmer, A.C., Banerjee, B., Fritchley, S.J. and Kirby, J.A. (2000) Examination of the function of RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta following interaction with heparin-like glycosaminoglycans. *J Biol Chem*, **275**, 11721-11727.

Allavena, P., Piemonti, L., Longoni, D., Bernasconi, S., Stoppacciaro, A., Ruco, L. and Mantovani, A. (1998) IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *Eur J Immunol*, **28**, 359-369.

Anklesaria, P., Teixido, J., Laiho, M., Pierce, J.H., Greenberger, J.S. and Massague, J. (1990) Cell-cell adhesion mediated by binding of membrane-anchored transforming growth factor alpha to epidermal growth factor receptors promotes cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 3289-3293.

Armitage, R.J. (1994) Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands. *Curr Opin Immunol*, **6**, 407-413.

Ashkenas, J., Muschler, J. and Bissell, M.J. (1996) The extracellular matrix in epithelial biology: shared molecules and common themes in distant phyla. *Dev Biol*, **180**, 433-444.

Avery, D.T., Kalled, S.L., Ellyard, J.I., Ambrose, C., Bixler, S.A., Thien, M., Brink, R., Mackay, F., Hodgkin, P.D. and Tangye, S.G. (2003) BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *J Clin Invest*, **112**, 286-297.

Ayotte, L. and Perlin, A.S. (1986) N.m.r. spectroscopic observations related to the function of sulfate groups in heparin. Calcium binding vs. biological activity. *Carbohydr Res*, **145**, 267-277.

Balazs, M., Martin, F., Zhou, T. and Kearney, J. (2002) Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity*, **17**, 341-352.

Batten, M., Fletcher, C., Ng, L.G., Groom, J., Wheway, J., Laabi, Y., Xin, X., Schneider, P., Tschopp, J., Mackay, C.R. and Mackay, F. (2004) TNF deficiency fails to protect BAFF transgenic mice against autoimmunity and reveals a predisposition to B cell lymphoma. *J Immunol*, **172**, 812-822.

Batten, M., Groom, J., Cachero, T.G., Qian, F., Schneider, P., Tschopp, J., Browning, J.L. and Mackay, F. (2000) BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. *J Exp Med*, **192**, 1453-1466.

Beauvais, D.M., Burbach, B.J. and Rapraeger, A.C. (2004) The syndecan-1 ectodomain regulates alphavbeta3 integrin activity in human mammary carcinoma cells. *J Cell Biol*, **167**, 171-181.

Beauvais, D.M. and Rapraeger, A.C. (2004) Syndecans in tumor cell adhesion and signaling. *Reprod Biol Endocrinol*, **2**, 3.

Beavan, L.A., Davies, M., Couchman, J.R., Williams, M.A. and Mason, R.M. (1989) In vivo turnover of the basement membrane and other heparan sulfate proteoglycans of rat glomerulus. *Arch Biochem Biophys*, **269**, 576-585.

Becker, S., Warren, M.K. and Haskill, S. (1987) Colony-stimulating factor-induced monocyte survival and differentiation into macrophages in serum-free cultures. *J Immunol*, **139**, 3703-3709.

Belting, M. (2003) Heparan sulfate proteoglycan as a plasma membrane carrier. *Trends Biochem Sci*, **28**, 145-151.

Bernfield, M., Gotte, M., Park, P.W., Reizes, O., Fitzgerald, M.L., Lincecum, J. and Zako, M. (1999) Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem*, **68**, 729-777.

Berrier, A.L., Mastrangelo, A.M., Downward, J., Ginsberg, M. and LaFlamme, S.E. (2000) Activated R-ras, Rac1, PI 3-kinase and PKCepsilon can each restore cell spreading inhibited by isolated integrin beta1 cytoplasmic domains. *J Cell Biol*, **151**, 1549-1560.

Beutler, B., Greenwald, D., Hulmes, J.D., Chang, M., Pan, Y.C., Mathison, J., Ulevitch, R. and Cerami, A. (1985) Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature*, **316**, 552-554.

Bienkowski, M.J. and Conrad, H.E. (1984) Kinetics of proteoheparan sulfate synthesis, secretion, endocytosis, and catabolism by a hepatocyte cell line. *J Biol Chem*, **259**, 12989-12996.

Bischof, D., Elsawa, S.F., Mantchev, G., Yoon, J., Michels, G.E., Nilson, A., Sutor, S., Platt, J.L., Ansell, S.M., von Bulow, G. and Bram, R.J. (2005) Selective activation of TACI by syndecan-2. *Blood*.

Blanco, P., Palucka, A.K., Gill, M., Pascual, V. and Banchereau, J. (2001) Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. *Science*, **294**, 1540-1543.

Bloom, L., Ingham, K.C. and Hynes, R.O. (1999) Fibronectin regulates assembly of actin filaments and focal contacts in cultured cells via the heparin-binding site in repeat III13. *Mol Biol Cell*, **10**, 1521-1536.

Bohme, C., Nimtz, M., Grabenhorst, E., Conradt, H.S., Strathmann, A. and Ragg, H. (2002) Tyrosine sulfation and N-glycosylation of human heparin cofactor II from plasma and recombinant Chinese hamster ovary cells and their effects on heparin binding. *Eur J Biochem*, **269**, 977-988.

Bonci, D., Hahne, M., Felli, N., Peschle, C. and De Maria, R. (2004) Potential role of APRIL as autocrine growth factor for megakaryocytopoiesis. *Blood*, **104**, 3169-3172.

Brennan, S.O., George, P.M. and Jordan, R.E. (1987) Physiological variant of antithrombin-III lacks carbohydrate sidechain at Asn 135. *FEBS Lett*, **219**, 431-436.

Burridge, K. and Chrzanowska-Wodnicka, M. (1996) Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **12**, 463-518.

Caldwell, E.E., Nadkarni, V.D., Fromm, J.R., Linhardt, R.J. and Weiler, J.M. (1996) Importance of specific amino acids in protein binding sites for heparin and heparan sulfate. *Int J Biochem Cell Biol*, **28**, 203-216.

Canfield, S.M. and Morrison, S.L. (1991) The binding affinity of human IgG for its high affinity Fc

receptor is determined by multiple amino acids in the CH2 domain and is modulated by the hinge region. *J Exp Med*, **173**, 1483-1491.

Capila, I., VanderNoot, V.A., Mealy, T.R., Seaton, B.A. and Linhardt, R.J. (1999) Interaction of heparin with annexin V. *FEBS Lett*, **446**, 327-330.

Cardin, A.D. and Weintraub, H.J. (1989) Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis*, **9**, 21-32.

Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N. and Williamson, B. (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **72**, 3666-3670.

Castigli, E., Scott, S., Dedeoglu, F., Bryce, P., Jabara, H., Bhan, A.K., Mizoguchi, E. and Geha, R.S. (2004) Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 3903-3908.

Castigli, E., Wilson, S.A., Scott, S., Dedeoglu, F., Xu, S., Lam, K.P., Bram, R.J., Jabara, H. and Geha, R.S. (2005) TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. *J Exp Med*, **201**, 35-39.

Cha, S.S., Shin, H.C., Choi, K.Y. and Oh, B.H. (1999) Expression, purification and crystallization of recombinant human TRAIL. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **55**, 1101-1104.

Chang, Y.C., Chan, Y.H., Jackson, D.G. and Hsieh, S.L. (2006) The glycosaminoglycan-binding domain of decoy receptor 3 is essential for induction of monocyte adhesion. *J Immunol*, **176**, 173-180.

Chapuis, F., Rosenzwajg, M., Yagello, M., Ekman, M., Biberfeld, P. and Gluckman, J.C. (1997) Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *Eur J Immunol*, **27**, 431-441.

Cheung, W.F., Eriksson, I., Kusche-Gullberg, M., Lindhal, U. and Kjellen, L. (1996) Expression of the mouse mastocytoma glucosaminyl N-deacetylase/ N-sulfotransferase in human kidney 293 cells results in increased N-sulfation of heparan sulfate. *Biochemistry*, **35**, 5250-5256.

Chicheportiche, Y., Bourdon, P.R., Xu, H., Hsu, Y.M., Scott, H., Hession, C., Garcia, I. and Browning, J.L. (1997) TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem*, **272**, 32401-32410.

Choay, J., Petitou, M., Lormeau, J.C., Sinay, P., Casu, B. and Gatti, G. (1983) Structure-activity relationship in heparin: a synthetic pentasaccharide with high affinity for antithrombin III and eliciting high anti-factor Xa activity. *Biochem Biophys Res Commun*, **116**, 492-499.

Chomarat, P., Banchereau, J., Davoust, J. and Palucka, A.K. (2000) IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol*, **1**, 510-514.

Chomarat, P., Dantin, C., Bennett, L., Banchereau, J. and Palucka, A.K. (2003) TNF skews monocyte differentiation from macrophages to dendritic cells. *J Immunol*, **171**, 2262-2269.

Chung, J.Y., Park, Y.C., Ye, H. and Wu, H. (2002) All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *J Cell Sci*, **115**, 679-688.

Clarke, D., Katoh, O., Gibbs, R.V., Griffiths, S.D. and Gordon, M.Y. (1995) Interaction of interleukin 7 (IL-7) with glycosaminoglycans and its biological relevance. *Cytokine*, **7**, 325-330.

Clasper, S., Vekemans, S., Fiore, M., Plebanski, M., Wordsworth, P., David, G. and Jackson, D.G. (1999) Inducible expression of the cell surface heparan sulfate proteoglycan syndecan-2 (fibroglycan) on human activated macrophages can regulate fibroblast growth factor action. *J Biol Chem*, **274**,

24113-24123.

Cohen, M., Kam, Z., Addadi, L. and Geiger, B. (2006) Dynamic study of the transition from hyaluronan- to integrin-mediated adhesion in chondrocytes. *Embo J*, **25**, 302-311.

Cole, G.J. and Glaser, L. (1986) A heparin-binding domain from N-CAM is involved in neural cell-substratum adhesion. *J Cell Biol*, **102**, 403-412.

Cole, G.J., Loewy, A. and Glaser, L. (1986) Neuronal cell-cell adhesion depends on interactions of N-CAM with heparin-like molecules. *Nature*, **320**, 445-447.

Coley, W.B. (1991) The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop Relat Res*, 3-11.

Colin, S., Jeanny, J.C., Mascarelli, F., Vienet, R., Al-Mahmood, S., Courtois, Y. and Labarre, J. (1999) In vivo involvement of heparan sulfate proteoglycan in the bioavailability, internalization, and catabolism of exogenous basic fibroblast growth factor. *Mol Pharmacol*, **55**, 74-82.

Conrad, HE. (1998) Heparin-Binding Proteins. *Academic Press*

Couchman, J.R., Kapoor, R., Sthanam, M. and Wu, R.R. (1996) Perlecan and basement membrane-chondroitin sulfate proteoglycan (bamacan) are two basement membrane chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans in the Engelbreth-Holm-Swarm tumor matrix. *J Biol Chem*, **271**, 9595-9602.

Couchman, J.R. and Woods, A. (1996) Syndecans, signaling, and cell adhesion. *J Cell Biochem*, **61**, 578-584.

Craxton, A., Magaletti, D., Ryan, E.J. and Clark, E.A. (2003) Macrophage- and dendritic cell--dependent regulation of human B-cell proliferation requires the TNF family ligand BAFF. *Blood*, **101**, 4464-4471.

Dalton, B.A., McFarland, C.D., Underwood, P.A. and Steele, J.G. (1995) Role of the heparin binding domain of fibronectin in attachment and spreading of human bone-derived cells. *J Cell Sci*, **108 (Pt 5)**, 2083-2092.

de Vinuesa, C.G., Cook, M.C., Ball, J., Drew, M., Sunners, Y., Cascalho, M., Wabl, M., Klaus, G.G. and MacLennan, I.C. (2000) Germinal centers without T cells. *J Exp Med*, **191**, 485-494.

Dehio, C., Freissler, E., Lanz, C., Gomez-Duarte, O.G., David, G. and Meyer, T.F. (1998) Ligation of cell surface heparan sulfate proteoglycans by antibody-coated beads stimulates phagocytic uptake into epithelial cells: a model for cellular invasion by Neisseria gonorrhoeae. *Exp Cell Res*, **242**, 528-539.

Dementiev, A., Petitou, M., Herbert, J.M. and Gettins, P.G. (2004) The ternary complex of antithrombin-anhydrothrombin-heparin reveals the basis of inhibitor specificity. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 863-867.

Dhein, J., Walczak, H., Baumler, C., Debatin, K.M. and Krammer, P.H. (1995) Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature*, **373**, 438-441.

Diaz-de-Durana, Y., Mantchev, G.T., Bram, R.J. and Franco, A. (2005) TACI-BLyS signaling via B cell-dendritic cell cooperation is required for CD8+ T cell priming in vivo. *Blood*.

Do, R.K., Hatada, E., Lee, H., Tourigny, M.R., Hilbert, D. and Chen-Kiang, S. (2000) Attenuation of

apoptosis underlies B lymphocyte stimulator enhancement of humoral immune response. *J Exp Med*, **192**, 953-964.

Dong, J., Peters-Libeu, C.A., Weisgraber, K.H., Segelke, B.W., Rupp, B., Capila, I., Hernaiz, M.J., LeBrun, L.A. and Linhardt, R.J. (2001) Interaction of the N-terminal domain of apolipoprotein E4 with heparin. *Biochemistry*, **40**, 2826-2834.

Durandy, A. (2001) Terminal defects of B lymphocyte differentiation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, **1**, 519-524.

Eck, M.J. and Sprang, S.R. (1989) The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding. *J Biol Chem*, **264**, 17595-17605.

Eck, M.J., Ultsch, M., Rinderknecht, E., de Vos, A.M. and Sprang, S.R. (1992) The structure of human lymphotoxin (tumor necrosis factor-beta) at 1.9-A resolution. *J Biol Chem*, **267**, 2119-2122.

Edwards, I.J., Xu, H., Obunike, J.C., Goldberg, I.J. and Wagner, W.D. (1995a) Differentiated macrophages synthesize a heparan sulfate proteoglycan and an oversulfated chondroitin sulfate proteoglycan that bind lipoprotein lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **15**, 400-409.

Edwards, P.R., Gill, A., Pollard-Knight, D.V., Hoare, M., Buckle, P.E., Lowe, P.A. and Leatherbarrow, R.J. (1995b) Kinetics of protein-protein interactions at the surface of an optical biosensor. *Anal Biochem*, **231**, 210-217.

Eissner, G., Kolch, W. and Scheurich, P. (2004) Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. *Cytokine Growth Factor Rev*, **15**, 353-366.

Esko, J.D. and Lindahl, U. (2001) Molecular diversity of heparan sulfate. *J Clin Invest*, **108**, 169-173.

Esko, J.D. and Selleck, S.B. (2002) Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu Rev Biochem*, **71**, 435-471.

Eslick, J., Scatizzi, J.C., Albee, L., Bickel, E., Bradley, K. and Perlman, H. (2004) IL-4 and IL-10 inhibition of spontaneous monocyte apoptosis is associated with Flip upregulation. *Inflammation*, **28**, 139-145.

Farley, J.R., Nakayama, G., Cryns, D. and Segel, I.H. (1978) Adenosine triphosphate sulfurylase from Penicillium chrysogenum equilibrium binding, substrate hydrolysis, and isotope exchange studies. *Arch Biochem Biophys*, **185**, 376-390.

Fernandez-Botran, R., Yan, J. and Justus, D.E. (1999) Binding of interferon gamma by glycosaminoglycans: a strategy for localization and/or inhibition of its activity. *Cytokine*, **11**, 313-325.

Fernig, D.G. (2001) Optical biosensor techniques to analyze protein-polysaccharide interactions. *Methods Mol Biol*, **171**, 505-518.

Flanagan, J.G., Chan, D.C. and Leder, P. (1991) Transmembrane form of the kit ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the Sld mutant. *Cell*, **64**, 1025-1035.

Fuki, I.I., Iozzo, R.V. and Williams, K.J. (2000a) Perlecan heparan sulfate proteoglycan. A novel receptor that mediates a distinct pathway for ligand catabolism. *J Biol Chem*, **275**, 31554.

Fuki, I.V., Kuhn, K.M., Lomazov, I.R., Rothman, V.L., Tuszynski, G.P., Iozzo, R.V., Swenson, T.L.,

Fisher, E.A. and Williams, K.J. (1997) The syndecan family of proteoglycans. Novel receptors mediating internalization of atherogenic lipoproteins in vitro. *J Clin Invest*, **100**, 1611-1622.

Fuki, I.V., Meyer, M.E. and Williams, K.J. (2000b) Transmembrane and cytoplasmic domains of syndecan mediate a multi-step endocytic pathway involving detergent-insoluble membrane rafts. *Biochem J*, **351 Pt 3**, 607-612.

Gallagher, J.T. (2001) Heparan sulfate: growth control with a restricted sequence menu. *J Clin Invest*, **108**, 357-361.

Gallagher, J.T. and Walker, A. (1985) Molecular distinctions between heparan sulphate and heparin. Analysis of sulphation patterns indicates that heparan sulphate and heparin are separate families of N-sulphated polysaccharides. *Biochem J*, **230**, 665-674.

Gan, Z.R., Li, Y., Chen, Z., Lewis, S.D. and Shafer, J.A. (1994) Identification of basic amino acid residues in thrombin essential for heparin-catalyzed inactivation by antithrombin III. *J Biol Chem*, **269**, 1301-1305.

Gannoun-Zaki, L., Pieri, I., Badet, J., Moenner, M. and Barritault, D. (1991) Internalization of basic fibroblast growth factor by CCL39 fibroblast cells. Involvement of heparan sulfate glycosaminoglycans. *Ann N Y Acad Sci*, **638**, 431-433.

Gavin, A.L., Ait-Azzouzene, D., Ware, C.F. and Nemazee, D. (2003) DeltaBAFF, an alternate splice isoform that regulates receptor binding and biopresentation of the B cell survival cytokine, BAFF. *J Biol Chem*, **278**, 38220-38228.

Gearing, A.J., Beckett, P., Christodoulou, M., Churchill, M., Clements, J., Davidson, A.H., Drummond, A.H., Galloway, W.A., Gilbert, R., Gordon, J.L. and et al. (1994) Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature*, **370**, 555-557.

Geiger, B. and Bershadsky, A. (2002) Exploring the neighborhood: adhesion-coupled cell mechanosensors. *Cell*, **110**, 139-142.

Geissmann, F., Prost, C., Monnet, J.P., Dy, M., Brousse, N. and Hermine, O. (1998) Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. *J Exp Med*, **187**, 961-966.

Giancotti, F.G. (1997) Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 691-700.

Giancotti, F.G. and Ruoslahti, E. (1999) Integrin signaling. *Science*, **285**, 1028-1032.

Goerges, A.L. and Nugent, M.A. (2004) pH regulates vascular endothelial growth factor binding to fibronectin: a mechanism for control of extracellular matrix storage and release. *J Biol Chem*, **279**, 2307-2315.

Gordon, S. and Taylor, P.R. (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, **5**, 953-964.

Gorelik, L., Cutler, A.H., Thill, G., Miklasz, S.D., Shea, D.E., Ambrose, C., Bixler, S.A., Su, L., Scott, M.L. and Kalled, S.L. (2004) Cutting edge: BAFF regulates CD21/35 and CD23 expression independent of its B cell survival function. *J Immunol*, **172**, 762-766.

Grage-Griebenow, E., Flad, H.D. and Ernst, M. (2001) Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol*, **69**, 11-20.

Gras, M.P., Laabi, Y., Linares-Cruz, G., Blondel, M.O., Rigaut, J.P., Brouet, J.C., Leca, G., Haguenauer-Tsapis, R. and Tsapis, A. (1995) BCMAp: an integral membrane protein in the Golgi apparatus of human mature B lymphocytes. *Int Immunol*, **7**, 1093-1106.

Gray, P.W., Aggarwal, B.B., Benton, C.V., Bringman, T.S., Henzel, W.J., Jarrett, J.A., Leung, D.W., Moffat, B., Ng, P., Svedersky, L.P. and et al. (1984) Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity. *Nature*, **312**, 721-724.

Greene, D.K., Tumova, S., Couchman, J.R. and Woods, A. (2003) Syndecan-4 associates with alpha-actinin. *J Biol Chem*, **278**, 7617-7623.

Gross, J.A., Dillon, S.R., Mudri, S., Johnston, J., Littau, A., Roque, R., Rixon, M., Schou, O., Foley, K.P., Haugen, H., McMillen, S., Waggie, K., Schreckhise, R.W., Shoemaker, K., Vu, T., Moore, M., Grossman, A. and Clegg, C.H. (2001) TACI-Ig neutralizes molecules critical for B cell development and autoimmune disease. impaired B cell maturation in mice lacking BLyS. *Immunity*, **15**, 289-302.

Gross, J.A., Johnston, J., Mudri, S., Enselman, R., Dillon, S.R., Madden, K., Xu, W., Parrish-Novak, J., Foster, D., Lofton-Day, C., Moore, M., Littau, A., Grossman, A., Haugen, H., Foley, K., Blumberg, H., Harrison, K., Kindsvogel, W. and Clegg, C.H. (2000) TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. *Nature*, **404**, 995-999.

Grossmann, J. (2002) Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis". *Apoptosis*, **7**, 247-260.

Gualandris, A., Urbinati, C., Rusnati, M., Ziche, M. and Presta, M. (1994) Interaction of high-molecular-weight basic fibroblast growth factor with endothelium: biological activity and intracellular fate of human recombinant M(r) 24,000 bFGF. *J Cell Physiol*, **161**, 149-159.

Gumbiner, B.M. (1996) Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*, **84**, 345-357.

Hahne, M., Kataoka, T., Schroter, M., Hofmann, K., Irmler, M., Bodmer, J.L., Schneider, P., Bornand, T., Holler, N., French, L.E., Sordat, B., Rimoldi, D. and Tschopp, J. (1998) APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. *J Exp Med*, **188**, 1185-1190.

Hall, M.D., Flickinger, K.S., Cutolo, M., Zardi, L. and Culp, L.A. (1988) Adhesion of human dermal reticular fibroblasts on complementary fragments of fibronectin: aging in vivo or in vitro. *Exp Cell Res*, **179**, 115-136.

Halvorsen, B., Aas, U.K., Kulseth, M.A., Drevon, C.A., Christiansen, E.N. and Kolset, S.O. (1998) Proteoglycans in macrophages: characterization and possible role in the cellular uptake of lipoproteins. *Biochem J*, **331 (Pt 3)**, 743-752.

Handel, T.M., Johnson, Z., Crown, S.E., Lau, E.K. and Proudfoot, A.E. (2005) Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines. *Annu Rev Biochem*, **74**, 385-410.

Hasan, M., Najjam, S., Gordon, M.Y., Gibbs, R.V. and Rider, C.C. (1999) IL-12 is a heparin-binding

cytokine. *J Immunol*, **162**, 1064-1070.

Hatzoglou, A., Roussel, J., Bourgeade, M.F., Rogier, E., Madry, C., Inoue, J., Devergne, O. and Tsapis, A. (2000) TNF receptor family member BCMA (B cell maturation) associates with TNF receptor-associated factor (TRAF) 1, TRAF2, and TRAF3 and activates NF-kappa B, elk-1, c-Jun N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Immunol*, **165**, 1322-1330.

Haugen, P.K., McCarthy, J.B., Skubitz, A.P., Furcht, L.T. and Letourneau, P.C. (1990) Recognition of the A chain carboxy-terminal heparin binding region of fibronectin involves multiple sites: two contiguous sequences act independently to promote neural cell adhesion. *J Cell Biol*, **111**, 2733-2745.

Hendriks, J., Planelles, L., de Jong-Odding, J., Hardenberg, G., Pals, S.T., Hahne, M., Spaargaren, M. and Medema, J.P. (2005) Heparan sulfate proteoglycan binding promotes APRIL-induced tumor cell proliferation. *Cell Death Differ*, **12**, 637-648.

Hileman, R.E., Fromm, J.R., Weiler, J.M. and Linhardt, R.J. (1998) Glycosaminoglycan-protein interactions: definition of consensus sites in glycosaminoglycan binding proteins. *Bioessays*, **20**, 156-167.

Hirschberg, C.B., Robbins, P.W. and Abeijon, C. (1998) Transporters of nucleotide sugars, ATP, and nucleotide sulfate in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu Rev Biochem*, **67**, 49-69.

Hoag, K.A., Clise-Dwyer, K., Lim, Y.H., Nashold, F.E., Gestwicki, J., Cancro, M.P. and Hayes, C.E. (2000) A quantitative-trait locus controlling peripheral B-cell deficiency maps to mouse Chromosome 15. *Immunogenetics*, **51**, 924-929.

Holler, N., Tardivel, A., Kovacsovics-Bankowski, M., Hertig, S., Gaide, O., Martinon, F., Tinel, A., Deperthes, D., Calderara, S., Schulthess, T., Engel, J., Schneider, P. and Tschopp, J. (2003) Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol Cell Biol*, **23**, 1428-1440.

Hoogewerf, A.J., Kuschert, G.S., Proudfoot, A.E., Borlat, F., Clark-Lewis, I., Power, C.A. and Wells, T.N. (1997) Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. *Biochemistry*, **36**, 13570-13578.

Horowitz, A., Tkachenko, E. and Simons, M. (2002) Fibroblast growth factor-specific modulation of cellular response by syndecan-4. *J Cell Biol*, **157**, 715-725.

Howe, A., Aplin, A.E., Alahari, S.K. and Juliano, R.L. (1998) Integrin signaling and cell growth control. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 220-231.

Huard, B., Arlettaz, L., Ambrose, C., Kindler, V., Mauri, D., Roosnek, E., Tschopp, J., Schneider, P. and French, L.E. (2004) BAFF production by antigen-presenting cells provides T cell co-stimulation. *Int Immunol*, **16**, 467-475.

Humphries, M.J., Olden, K. and Yamada, K.M. (1986) A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells. *Science*, **233**, 467-470.

Hymowitz, S.G., Compaan, D.M., Yan, M., Wallweber, H.J., Dixit, V.M., Starovasnik, M.A. and de Vos, A.M. (2003) The crystal structures of EDA-A1 and EDA-A2: splice variants with distinct

receptor specificity. *Structure*, **11**, 1513-1520.

Hymowitz, S.G., O'Connell, M.P., Ultsch, M.H., Hurst, A., Totpal, K., Ashkenazi, A., de Vos, A.M. and Kelley, R.F. (2000) A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL. *Biochemistry*, **39**, 633-640.

Hymowitz, S.G., Patel, D.R., Wallweber, H.J., Runyon, S., Yan, M., Yin, J., Shriver, S.K., Gordon, N.C., Pan, B., Skelton, N.J., Kelley, R.F. and Starovasnik, M.A. (2005) Structures of APRIL-receptor complexes: like BCMA, TACI employs only a single cysteine-rich domain for high affinity ligand binding. *J Biol Chem*, **280**, 7218-7227.

Ilic, D., Almeida, E.A., Schlaepfer, D.D., Dazin, P., Aizawa, S. and Damsky, C.H. (1998) Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis. *J Cell Biol*, **143**, 547-560.

Ingold, K., Zumsteg, A., Tardivel, A., Huard, B., Steiner, Q.G., Cachero, T.G., Qiang, F., Gorelik, L., Kalled, S.L., Acha-Orbea, H., Rennert, P.D., Tschopp, J. and Schneider, P. (2005) Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners. *J Exp Med*, **201**, 1375-1383.

Itoh, N. and Nagata, S. (1993) A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem*, **268**, 10932-10937.

Izzard, C.S., Radinsky, R. and Culp, L.A. (1986) Substratum contacts and cytoskeletal reorganization of BALB/c 3T3 cells on a cell-binding fragment and heparin-binding fragments of plasma fibronectin. *Exp Cell Res*, **165**, 320-336.

Jalkanen, M., Elenius, K. and Salmivirta, M. (1992) Syndecan--a cell surface proteoglycan that selectively binds extracellular effector molecules. *Adv Exp Med Biol*, **313**, 79-85.

Jemth, P., Kreuger, J., Kusche-Gullberg, M., Sturiale, L., Gimenez-Gallego, G. and Lindahl, U. (2002) Biosynthetic oligosaccharide libraries for identification of protein-binding heparan sulfate motifs. Exploring the structural diversity by screening for fibroblast growth factor (FGF)1 and FGF2 binding. *J Biol Chem*, **277**, 30567-30573.

Jones, E.Y., Stuart, D.I. and Walker, N.P. (1989) Structure of tumour necrosis factor. *Nature*, **338**, 225-228.

Jumper, M.D., Nishioka, Y., Davis, L.S., Lipsky, P.E. and Meek, K. (1995) Regulation of human B cell function by recombinant CD40 ligand and other TNF-related ligands. *J Immunol*, **155**, 2369-2378.

Kalled, S.L. (2005) The role of BAFF in immune function and implications for autoimmunity. *Immunol Rev*, **204**, 43-54.

Kalled, S.L., Ambrose, C. and Hsu, Y.M. (2005) The biochemistry and biology of BAFF, APRIL and their receptors. *Curr Dir Autoimmun*, **8**, 206-242.

Kan, M., Wang, F., To, B., Gabriel, J.L. and McKeehan, W.L. (1996) Divalent cations and heparin/heparan sulfate cooperate to control assembly and activity of the fibroblast growth factor receptor complex. *J Biol Chem*, **271**, 26143-26148.

Karpusas, M., Cachero, T.G., Qian, F., Boriack-Sjodin, A., Mullen, C., Strauch, K., Hsu, Y.M. and Kalled, S.L. (2002) Crystal structure of extracellular human BAFF, a TNF family member that

stimulates B lymphocytes. *J Mol Biol*, **315**, 1145-1154.

Karpusas, M., Hsu, Y.M., Wang, J.H., Thompson, J., Lederman, S., Chess, L. and Thomas, D. (1995) 2 A crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand. *Structure*, **3**, 1426.

Kawashima, H., Watanabe, N., Hirose, M., Sun, X., Atarashi, K., Kimura, T., Shikata, K., Matsuda, M., Ogawa, D., Heljasvaara, R., Rehn, M., Pihlajaniemi, T. and Miyasaka, M. (2003) Collagen XVIII, a basement membrane heparan sulfate proteoglycan, interacts with L-selectin and monocyte chemoattractant protein-1. *J Biol Chem*, **278**, 13069-13076.

Kelly, K., Manos, E., Jensen, G., Nadauld, L. and Jones, D.A. (2000) APRIL/TRDL-1, a tumor necrosis factor-like ligand, stimulates cell death. *Cancer Res*, **60**, 1021-1027.

Keogh, S.A., Walczak, H., Bouchier-Hayes, L. and Martin, S.J. (2000) Failure of Bcl-2 to block cytochrome c redistribution during TRAIL-induced apoptosis. *FEBS Lett*, **471**, 93-98.

Kern, C., Cornuel, J.F., Billard, C., Tang, R., Rouillard, D., Stenou, V., Defrance, T., Ajchenbaum-Cymbalista, F., Simonin, P.Y., Feldblum, S. and Kolb, J.P. (2004) Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway. *Blood*, **103**, 679-688.

Kiener, P.A., Davis, P.M., Rankin, B.M., Klebanoff, S.J., Ledbetter, J.A., Starling, G.C. and Liles, W.C. (1997a) Human monocytic cells contain high levels of intracellular Fas ligand: rapid release following cellular activation. *J Immunol*, **159**, 1594-1598.

Kiener, P.A., Davis, P.M., Starling, G.C., Mehlin, C., Klebanoff, S.J., Ledbetter, J.A. and Liles, W.C. (1997b) Differential induction of apoptosis by Fas-Fas ligand interactions in human monocytes and macrophages. *J Exp Med*, **185**, 1511-1516.

Kireeva, M.L., Mo, F.E., Yang, G.P. and Lau, L.F. (1996) Cyr61, a product of a growth factor-inducible immediate-early gene, promotes cell proliferation, migration, and adhesion. *Mol Cell Biol*, **16**, 1326-1334.

Kolset, S.O. and Gallagher, J.T. (1990) Proteoglycans in haemopoietic cells. *Biochim Biophys Acta*, **1032**, 191-211.

Kolset, S.O., Kjellen, L., Seljelid, R. and Lindahl, U. (1983) Changes in glycosaminoglycan biosynthesis during differentiation in vitro of human monocytes. *Biochem J*, **210**, 661-667.

Kolset, S.O., Sakurai, K., Ivhed, I., Overvatn, A. and Suzuki, S. (1990) The effect of beta-D-xylosides on the proliferation and proteoglycan biosynthesis of monoblastic U-937 cells. *Biochem J*, **265**, 637-645.

Koopmann, W., Ediriwickrema, C. and Krangel, M.S. (1999) Structure and function of the glycosaminoglycan binding site of chemokine macrophage-inflammatory protein-1 beta. *J Immunol*, **163**, 2120-2127.

Koopmann, W. and Krangel, M.S. (1997) Identification of a glycosaminoglycan-binding site in chemokine macrophage inflammatory protein-1alpha. *J Biol Chem*, **272**, 10103-10109.

Kreuger, J., Jemth, P., Sanders-Lindberg, E., Eliahu, L., Ron, D., Basilico, C., Salmivirta, M. and Lindahl, U. (2005) Fibroblast growth factors share binding sites in heparan sulphate. *Biochem J*, **389**, 145-150.

Kreuzer, J., Denger, S., Schmidts, A., Jahn, L., Merten, M. and von Hodenberg, E. (1996) Fibrinogen promotes monocyte adhesion via a protein kinase C dependent mechanism. *J Mol Med*, **74**, 161-165.

Krumbholz, M., Theil, D., Derfuss, T., Rosenwald, A., Schrader, F., Monoranu, C.M., Kalled, S.L., Hess, D.M., Serafini, B., Aloisi, F., Wekerle, H., Hohlfeld, R. and Meinl, E. (2005) BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. *J Exp Med*, **201**, 195-200.

Laabi, Y., Gras, M.P., Brouet, J.C., Berger, R., Larsen, C.J. and Tsapis, A. (1994) The BCMA gene, preferentially expressed during B lymphoid maturation, is bidirectionally transcribed. *Nucleic Acids Res*, **22**, 1147-1154.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

Lam, J., Nelson, C.A., Ross, F.P., Teitelbaum, S.L. and Fremont, D.H. (2001) Crystal structure of the TRANCE/RANKL cytokine reveals determinants of receptor-ligand specificity. *J Clin Invest*, **108**, 971-979.

Lander, A.D., Nie, Q. and Wan, F.Y. (2002) Do morphogen gradients arise by diffusion? *Dev Cell*, **2**, 785-796.

Lardner, A. (2001) The effects of extracellular pH on immune function. *J Leukoc Biol*, **69**, 522-530.

Lau, E.K., Paavola, C.D., Johnson, Z., Gaudry, J.P., Geretti, E., Borlat, F., Kungl, A.J., Proudfoot, A.E. and Handel, T.M. (2004) Identification of the glycosaminoglycan binding site of the CC chemokine, MCP-1: implications for structure and function in vivo. *J Biol Chem*, **279**, 22294-22305.

Lee, P.H., Trowbridge, J.M., Taylor, K.R., Morhenn, V.B. and Gallo, R.L. (2004) Dermatan sulfate proteoglycan and glycosaminoglycan synthesis is induced in fibroblasts by transfer to a three-dimensional extracellular environment. *J Biol Chem*, **279**, 48640-48646.

Levitt, D. and Ho, P.L. (1983) Induction of chondroitin sulfate proteoglycan synthesis and secretion in lymphocytes and monocytes. *J Cell Biol*, **97**, 351-358.

Li, W., Johnson, D.J., Esmon, C.T. and Huntington, J.A. (2004) Structure of the antithrombin-thrombin-heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 857-862.

Lindahl, U., Kusche-Gullberg, M. and Kjellen, L. (1998) Regulated diversity of heparan sulfate. *J Biol Chem*, **273**, 24979-24982.

Lipscombe, R.J., Nakhoul, A.M., Sanderson, C.J. and Coombe, D.R. (1998) Interleukin-5 binds to heparin/heparan sulfate. A model for an interaction with extracellular matrix. *J Leukoc Biol*, **63**, 342-350.

Litinskiy, M.B., Nardelli, B., Hilbert, D.M., He, B., Schaffer, A., Casali, P. and Cerutti, A. (2002) DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. *Nat Immunol*, **3**, 822-829.

Liu, J., Shworak, N.W., Sinay, P., Schwartz, J.J., Zhang, L., Fritze, L.M. and Rosenberg, R.D. (1999)

Expression of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase isoforms reveals novel substrate specificities. *J Biol Chem*, **274**, 5185-5192.

Liu, Y., Hong, X., Kappler, J., Jiang, L., Zhang, R., Xu, L., Pan, C.H., Martin, W.E., Murphy, R.C., Shu, H.B., Dai, S. and Zhang, G. (2003) Ligand-receptor binding revealed by the TNF family member TALL-1. *Nature*, **423**, 49-56.

Liu, Y., Xu, L., Opalka, N., Kappler, J., Shu, H.B. and Zhang, G. (2002) Crystal structure of sTALL-1 reveals a virus-like assembly of TNF family ligands. *Cell*, **108**, 383-394.

Locksley, R.M., Killeen, N. and Lenardo, M.J. (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, **104**, 487-501.

Loder, F., Mutschler, B., Ray, R.J., Paige, C.J., Sideras, P., Torres, R., Lamers, M.C. and Carsetti, R. (1999) B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J Exp Med*, **190**, 75-89.

Lopez-Fraga, M., Fernandez, R., Albar, J.P. and Hahne, M. (2001) Biologically active APRIL is secreted following intracellular processing in the Golgi apparatus by furin convertase. *EMBO Rep*, **2**, 945-951.

Lortat-Jacob, H., Garrone, P., Banchereau, J. and Grimaud, J.A. (1997) Human interleukin 4 is a glycosaminoglycan-binding protein. *Cytokine*, **9**, 101-105.

Lortat-Jacob, H. and Grimaud, J.A. (1991) Interferon-gamma C-terminal function: new working hypothesis. Heparan sulfate and heparin, new targets for IFN-gamma, protect, relax the cytokine and regulate its activity. *Cell Mol Biol*, **37**, 253-260.

Lortat-Jacob, H. and Grimaud, J.A. (1992) Binding of interferon-gamma to heparan sulfate is restricted to the heparin-like domains and involves carboxylic--but not N-sulfated--groups. *Biochim Biophys Acta*, **1117**, 126-130.

Lortat-Jacob, H., Turnbull, J.E. and Grimaud, J.A. (1995) Molecular organization of the interferon gamma-binding domain in heparan sulphate. *Biochem J*, **310 (Pt 2)**, 497-505.

Luikart, S.D. (1988) Degradation of cartilage proteoglycans by myeloid leukemia cells. *Exp Hematol*, **16**, 102-105.

Luster, A.D., Greenberg, S.M. and Leder, P. (1995) The IP-10 chemokine binds to a specific cell surface heparan sulfate site shared with platelet factor 4 and inhibits endothelial cell proliferation. *J Exp Med*, **182**, 219-231.

Mackay, F. and Kalled, S.L. (2002) TNF ligands and receptors in autoimmunity: an update. *Curr Opin Immunol*, **14**, 783-790.

Mackay, F., Schneider, P., Rennert, P. and Browning, J. (2003) BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol*, **21**, 231-264.

Makabe, T., Saiki, I., Murata, J., Ohdate, Y., Kawase, Y., Taguchi, Y., Shimojo, T., Kimizuka, F., Kato, I. and Azuma, I. (1990) Modulation of haptotactic migration of metastatic melanoma cells by the interaction between heparin and heparin-binding domain of fibronectin. *J Biol Chem*, **265**, 14270-14276.

Mangan, D.F. and Wahl, S.M. (1991) Differential regulation of human monocyte programmed cell death

(apoptosis) by chemotactic factors and pro-inflammatory cytokines. *J Immunol*, **147**, 3408-3412.

Mangan, D.F., Welch, G.R. and Wahl, S.M. (1991) Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and IL-1 beta prevent programmed cell death (apoptosis) in human peripheral blood monocytes. *J Immunol*, **146**, 1541-1546.

Margalit, H., Fischer, N. and Ben-Sasson, S.A. (1993) Comparative analysis of structurally defined heparin binding sequences reveals a distinct spatial distribution of basic residues. *J Biol Chem*, **268**, 19228-19231.

Marsters, S.A., Yan, M., Pitti, R.M., Haas, P.E., Dixit, V.M. and Ashkenazi, A. (2000) Interaction of the TNF homologues BLyS and APRIL with the TNF receptor homologues BCMA and TACI. *Curr Biol*, **10**, 785-788.

Martin, F., Oliver, A.M. and Kearney, J.F. (2001) Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity*, **14**, 617-629.

Massia, S.P. and Hubbell, J.A. (1992) Immobilized amines and basic amino acids as mimetic heparin-binding domains for cell surface proteoglycan-mediated adhesion. *J Biol Chem*, **267**, 10133-10141.

Matsumoto, M., Lo, S.F., Carruthers, C.J., Min, J., Mariathasan, S., Huang, G., Plas, D.R., Martin, S.M., Geha, R.S., Nahm, M.H. and Chaplin, D.D. (1996) Affinity maturation without germinal centres in lymphotoxin-alpha-deficient mice. *Nature*, **382**, 462-466.

Medema, J.P., Planelles-Carazo, L., Hardenberg, G. and Hahne, M. (2003) The uncertain glory of APRIL. *Cell Death Differ*, **10**, 1121-1125.

Miller, D.J. and Hayes, C.E. (1991) Phenotypic and genetic characterization of a unique B lymphocyte deficiency in strain A/WySnJ mice. *Eur J Immunol*, **21**, 1123-1130.

Mocellin, S., Rossi, C.R., Pilati, P. and Nitti, D. (2005) Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev*, **16**, 35-53.

Mohamadzadeh, M., Berard, F., Essert, G., Chalouni, C., Pulendran, B., Davoust, J., Bridges, G., Palucka, A.K. and Banchereau, J. (2001) Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells. *J Exp Med*, **194**, 1013-1020.

Moore, P.A., Belvedere, O., Orr, A., Pieri, K., LaFleur, D.W., Feng, P., Soppet, D., Charters, M., Gentz, R., Parmelee, D., Li, Y., Galperina, O., Giri, J., Roschke, V., Nardelli, B., Carrell, J., Sosnovtseva, S., Greenfield, W., Ruben, S.M., Olsen, H.S., Fikes, J. and Hilbert, D.M. (1999) BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science*, **285**, 260-263.

Moreaux, J., Cremer, F.W., Reme, T., Raab, M., Mahtouk, K., Kaukel, P., Pantesco, V., De Vos, J., Jourdan, E., Jauch, A., Legouffe, E., Moos, M., Fiol, G., Goldschmidt, H., Rossi, J.F., Hose, D. and Klein, B. (2005) The level of TACI gene expression in myeloma cells is associated with a signature of microenvironment dependence versus a plasmablastic signature. *Blood*, **106**, 1021-1030.

Moreaux, J., Legouffe, E., Jourdan, E., Quittet, P., Reme, T., Lugagne, C., Moine, P., Rossi, J.F., Klein, B. and Tarte, K. (2004) BAFF and APRIL protect myeloma cells from apoptosis induced by

interleukin 6 deprivation and dexamethasone. *Blood*, **103**, 3148-3157.

Morris, A.E., Remmele, R.L., Jr., Klinke, R., Macduff, B.M., Fanslow, W.C. and Armitage, R.J. (1999) Incorporation of an isoleucine zipper motif enhances the biological activity of soluble CD40L (CD154). *J Biol Chem*, **274**, 418-423.

Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, **65**, 55-63.

Moyano, J.V., Maqueda, A., Albar, J.P. and Garcia-Pardo, A. (2003) A synthetic peptide from the heparin-binding domain III (repeats III4-5) of fibronectin promotes stress-fibre and focal-adhesion formation in melanoma cells. *Biochem J*, **371**, 565-571.

Mukhopadhyay, A., Ni, J., Zhai, Y., Yu, G.L. and Aggarwal, B.B. (1999) Identification and characterization of a novel cytokine, THANK, a TNF homologue that activates apoptosis, nuclear factor-kappaB, and c-Jun NH2-terminal kinase. *J Biol Chem*, **274**, 15978-15981.

Mulloy, B. and Forster, M.J. (2000) Conformation and dynamics of heparin and heparan sulfate. *Glycobiology*, **10**, 1147-1156.

Mulloy, B. and Linhardt, R.J. (2001) Order out of complexity--protein structures that interact with heparin. *Curr Opin Struct Biol*, **11**, 623-628.

Mummery, R.S. and Rider, C.C. (2000) Characterization of the heparin-binding properties of IL-6. *J Immunol*, **165**, 5671-5679.

Murphy-Ullrich, J.E., Westrick, L.G., Esko, J.D. and Mosher, D.F. (1988) Altered metabolism of thrombospondin by Chinese hamster ovary cells defective in glycosaminoglycan synthesis. *J Biol Chem*, **263**, 6400-6406.

Nadkarni, V.D., Toida, T., Van Gorp, C.L., Schubert, R.L., Weiler, J.M., Hansen, K.P., Caldwell, E.E. and Linhardt, R.J. (1996) Preparation and biological activity of N-sulfonated chondroitin and dermatan sulfate derivatives. *Carbohydr Res*, **290**, 87-96.

Naismith, J.H. and Sprang, S.R. (1995) Tumor necrosis factor receptor superfamily. *J Inflamm*, **47**, 1-7.

Najjam, S., Mulloy, B., Theze, J., Gordon, M., Gibbs, R. and Rider, C.C. (1998) Further characterization of the binding of human recombinant interleukin 2 to heparin and identification of putative binding sites. *Glycobiology*, **8**, 509-516.

Nardelli, B., Belvedere, O., Roschke, V., Moore, P.A., Olsen, H.S., Migone, T.S., Sosnovtseva, S., Carrell, J.A., Feng, P., Giri, J.G. and Hilbert, D.M. (2001) Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. *Blood*, **97**, 198-204.

Netelenbos, T., Zuijderduijn, S., Van Den Born, J., Kessler, F.L., Zweegman, S., Huijgens, P.C. and Drager, A.M. (2002) Proteoglycans guide SDF-1-induced migration of hematopoietic progenitor cells. *J Leukoc Biol*, **72**, 353-362.

Ng, L.G., Sutherland, A.P., Newton, R., Qian, F., Cachero, T.G., Scott, M.L., Thompson, J.S., Wheway, J., Chtanova, T., Groom, J., Sutton, I.J., Xin, C., Tangye, S.G., Kalled, S.L., Mackay, F. and Mackay, C.R. (2004) B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells. *J Immunol*, **173**, 807-817.

Ni, C.Z., Oganesyan, G., Welsh, K., Zhu, X., Reed, J.C., Satterthwait, A.C., Cheng, G. and Ely, K.R. (2004) Key molecular contacts promote recognition of the BAFF receptor by TNF receptor-associated factor 3: implications for intracellular signaling regulation. *J Immunol*, **173**, 7394-7400.

Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F. and Riccardi, C. (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*, **139**, 271-279.

Novak, A.J., Bram, R.J., Kay, N.E. and Jelinek, D.F. (2002) Aberrant expression of B-lymphocyte stimulator by B chronic lymphocytic leukemia cells: a mechanism for survival. *Blood*, **100**, 2973-2979.

Novak, A.J., Darce, J.R., Arendt, B.K., Harder, B., Henderson, K., Kindsvogel, W., Gross, J.A., Greipp, P.R. and Jelinek, D.F. (2004) Expression of BCMA, TACI, and BAFF-R in multiple myeloma: a mechanism for growth and survival. *Blood*, **103**, 689-694.

O'Connor, B.P., Raman, V.S., Erickson, L.D., Cook, W.J., Weaver, L.K., Ahonen, C., Lin, L.L., Mantchev, G.T., Bram, R.J. and Noelle, R.J. (2004) BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *J Exp Med*, **199**, 91-98.

Olson, S.T., Halvorson, H.R. and Bjork, I. (1991) Quantitative characterization of the thrombin-heparin interaction. Discrimination between specific and nonspecific binding models. *J Biol Chem*, **266**, 6342-6352.

Oren, D.A., Li, Y., Volovik, Y., Morris, T.S., Dharia, C., Das, K., Galperina, O., Gentz, R. and Arnold, E. (2002) Structural basis of BLyS receptor recognition. *Nat Struct Biol*, **9**, 288-292.

Osmond, R.I., Kett, W.C., Skett, S.E. and Coombe, D.R. (2002) Protein-heparin interactions measured by BIAcore 2000 are affected by the method of heparin immobilization. *Anal Biochem*, **310**, 199-207.

Owens, R.T. and Wagner, W.D. (1991) Metabolism and turnover of cell surface-associated heparan sulfate proteoglycan and chondroitin sulfate proteoglycan in normal and cholesterol-enriched macrophages. *Arterioscler Thromb*, **11**, 1752-1758.

Paquette, R.L., Hsu, N.C., Kiertscher, S.M., Park, A.N., Tran, L., Roth, M.D. and Glaspy, J.A. (1998) Interferon-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor differentiate peripheral blood monocytes into potent antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol*, **64**, 358-367.

Park, H., Kim, Y., Lim, Y., Han, I. and Oh, E.S. (2002) Syndecan-2 mediates adhesion and proliferation of colon carcinoma cells. *J Biol Chem*, **277**, 29730-29736.

Park, P.W., Reizes, O. and Bernfield, M. (2000) Cell surface heparan sulfate proteoglycans: selective regulators of ligand-receptor encounters. *J Biol Chem*, **275**, 29923-29926.

Pennica, D., Nedwin, G.E., Hayflick, J.S., Seeburg, P.H., Derynck, R., Palladino, M.A., Kohr, W.J., Aggarwal, B.B. and Goeddel, D.V. (1984) Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature*, **312**, 724-729.

Perlman, H., Pagliari, L.J., Georganas, C., Mano, T., Walsh, K. and Pope, R.M. (1999) FLICE-inhibitory protein expression during macrophage differentiation confers resistance to fas-mediated

apoptosis. *J Exp Med*, **190**, 1679-1688.

Perlman, H., Pagliari, L.J., Liu, H., Koch, A.E., Haines, G.K., 3rd and Pope, R.M. (2001a) Rheumatoid arthritis synovial macrophages express the Fas-associated death domain-like interleukin-1beta-converting enzyme-inhibitory protein and are refractory to Fas-mediated apoptosis. *Arthritis Rheum*, **44**, 21-30.

Perlman, H., Pagliari, L.J., Nguyen, N., Bradley, K., Liu, H. and Pope, R.M. (2001b) The Fas-FasL death receptor and PI3K pathways independently regulate monocyte homeostasis. *Eur J Immunol*, **31**, 2421-2430.

Peterson, J.A., Sheibani, N., David, G., Garcia-Pardo, A. and Peters, D.M. (2005) Heparin II domain of fibronectin uses alpha4beta1 integrin to control focal adhesion and stress fiber formation, independent of syndecan-4. *J Biol Chem*, **280**, 6915-6922.

Petitou, M., Herault, J.P., Bernat, A., Driguez, P.A., Duchaussoy, P., Lormeau, J.C. and Herbert, J.M. (1999) Synthesis of thrombin-inhibiting heparin mimetics without side effects. *Nature*, **398**, 417-422.

Picard, V., Ersdal-Badju, E. and Bock, S.C. (1995) Partial glycosylation of antithrombin III asparagine-135 is caused by the serine in the third position of its N-glycosylation consensus sequence and is responsible for production of the beta-antithrombin III isoform with enhanced heparin affinity. *Biochemistry*, **34**, 8433-8440.

Piemonti, L., Bernasconi, S., Luini, W., Trobonjaca, Z., Minty, A., Allavena, P. and Mantovani, A. (1995) IL-13 supports differentiation of dendritic cells from circulating precursors in concert with GM-CSF. *Eur Cytokine Netw*, **6**, 245-252.

Pikas, D.S., Eriksson, I. and Kjellen, L. (2000) Overexpression of different isoforms of glucosaminyl N-deacetylase/N-sulfotransferase results in distinct heparan sulfate N-sulfation patterns. *Biochemistry*, **39**, 4552-4558.

Planelles, L., Carvalho-Pinto, C.E., Hardenberg, G., Smaniotto, S., Savino, W., Gomez-Caro, R., Alvarez-Mon, M., de Jong, J., Eldering, E., Martinez, A.C., Medema, J.P. and Hahne, M. (2004) APRIL promotes B-1 cell-associated neoplasm. *Cancer Cell*, **6**, 399-408.

Powell, A.K., Yates, E.A., Fernig, D.G. and Turnbull, J.E. (2004) Interactions of heparin/heparan sulfate with proteins: appraisal of structural factors and experimental approaches. *Glycobiology*, **14**, 17R-30R.

Pradet-Balade, B., Medema, J.P., Lopez-Fraga, M., Lozano, J.C., Kolfschoten, G.M., Picard, A., Martinez, A.C., Garcia-Sanz, J.A. and Hahne, M. (2002) An endogenous hybrid mRNA encodes TWE-PRIL, a functional cell surface TWEAK-APRIL fusion protein. *Embo J*, **21**, 5711-5720.

Rabenstein, D.L., Robert, J.M. and Peng, J. (1995) Multinuclear magnetic resonance studies of the interaction of inorganic cations with heparin. *Carbohydr Res*, **278**, 239-256.

Rahman, Z.S., Rao, S.P., Kalled, S.L. and Manser, T. (2003) Normal induction but attenuated progression of germinal center responses in BAFF and BAFF-R signaling-deficient mice. *J Exp Med*, **198**, 1157-1169.

Raman, R., Venkataraman, G., Ernst, S., Sasisekharan, V. and Sasisekharan, R. (2003) Structural

specificity of heparin binding in the fibroblast growth factor family of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 2357-2362.

Ramsden, L. and Rider, C.C. (1992) Selective and differential binding of interleukin (IL)-1 alpha, IL-1 beta, IL-2 and IL-6 to glycosaminoglycans. *Eur J Immunol*, **22**, 3027-3031.

Randolph, G.J., Inaba, K., Robbiani, D.F., Steinman, R.M. and Muller, W.A. (1999) Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity*, **11**, 753-761.

Rapraeger, A.C., Krufka, A. and Olwin, B.B. (1991) Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science*, **252**, 1705-1708.

Reddig, P.J. and Juliano, R.L. (2005) Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival. *Cancer Metastasis Rev*, **24**, 425-439.

Rennert, P., Schneider, P., Cachero, T.G., Thompson, J., Trabach, L., Hertig, S., Holler, N., Qian, F., Mullen, C., Strauch, K., Browning, J.L., Ambrose, C. and Tschopp, J. (2000) A soluble form of B cell maturation antigen, a receptor for the tumor necrosis factor family member APRIL, inhibits tumor cell growth. *J Exp Med*, **192**, 1677-1684.

Richard, C., Liuzzo, J.P. and Moscatelli, D. (1995) Fibroblast growth factor-2 can mediate cell attachment by linking receptors and heparan sulfate proteoglycans on neighboring cells. *J Biol Chem*, **270**, 24188-24196.

Robinson, C.J., Harmer, N.J., Goodger, S.J., Blundell, T.L. and Gallagher, J.T. (2005) Cooperative dimerization of fibroblast growth factor 1 (FGF1) upon a single heparin saccharide may drive the formation of 2:2:1 FGF1.FGFR2c.heparin ternary complexes. *J Biol Chem*, **280**, 42274-42282.

Roghani, M. and Moscatelli, D. (1992) Basic fibroblast growth factor is internalized through both receptor-mediated and heparan sulfate-mediated mechanisms. *J Biol Chem*, **267**, 22156-22162.

Rolink, A.G., Tschopp, J., Schneider, P. and Melchers, F. (2002) BAFF is a survival and maturation factor for mouse B cells. *Eur J Immunol*, **32**, 2004-2010.

Romani, N., Reider, D., Heuer, M., Ebner, S., Kampgen, E., Eibl, B., Niederwieser, D. and Schuler, G. (1996) Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods*, **196**, 137-151.

Rong, J., Habuchi, H., Kimata, K., Lindahl, U. and Kusche-Gullberg, M. (2001) Substrate specificity of the heparan sulfate hexuronic acid 2-O-sulfotransferase. *Biochemistry*, **40**, 5548-5555.

Rosenberg, R.D., Shworak, N.W., Liu, J., Schwartz, J.J. and Zhang, L. (1997) Heparan sulfate proteoglycans of the cardiovascular system. Specific structures emerge but how is synthesis regulated? *J Clin Invest*, **99**, 2062-2070.

Roth, W., Wagenknecht, B., Klumpp, A., Naumann, U., Hahne, M., Tschopp, J. and Weller, M. (2001) APRIL, a new member of the tumor necrosis factor family, modulates death ligand-induced apoptosis. *Cell Death Differ*, **8**, 403-410.

Rucinski, B., Niewiarowski, S., Strzyzewski, M., Holt, J.C. and Mayo, K.H. (1990) Human platelet factor 4 and its C-terminal peptides: heparin binding and clearance from the circulation. *Thromb Haemost*, **63**, 493-498.

Ruoslahti, E. and Yamaguchi, Y. (1991) Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell*, **64**, 867-869.

Rusnati, M., Urbinati, C. and Presta, M. (1993) Internalization of basic fibroblast growth factor (bFGF) in cultured endothelial cells: role of the low affinity heparin-like bFGF receptors. *J Cell Physiol*, **154**, 152-161.

Sadir, R., Baleux, F., Grosdidier, A., Imberty, A. and Lortat-Jacob, H. (2001) Characterization of the stromal cell-derived factor-1alpha-heparin complex. *J Biol Chem*, **276**, 8288-8296.

Salek-Ardakani, S., Arrand, J.R., Shaw, D. and Mackett, M. (2000) Heparin and heparan sulfate bind interleukin-10 and modulate its activity. *Blood*, **96**, 1879-1888.

Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. (1994) Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*, **179**, 1109-1118.

Saoncella, S., Echtermeyer, F., Denhez, F., Nowlen, J.K., Mosher, D.F., Robinson, S.D., Hynes, R.O. and Goetinck, P.F. (1999) Syndecan-4 signals cooperatively with integrins in a Rho-dependent manner in the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 2805-2810.

Savion, N., Disatnik, M.H. and Nevo, Z. (1987) Murine macrophage heparanase: inhibition and comparison with metastatic tumor cells. *J Cell Physiol*, **130**, 77-84.

Scapini, P., Nardelli, B., Nadali, G., Calzetti, F., Pizzolo, G., Montecucco, C. and Cassatella, M.A. (2003) G-CSF-stimulated neutrophils are a prominent source of functional BLyS. *J Exp Med*, **197**, 297-302.

Scheuerer, B., Ernst, M., Durrbaum-Landmann, I., Fleischer, J., Grage-Griebenow, E., Brandt, E., Flad, H.D. and Petersen, F. (2000) The CXC-chemokine platelet factor 4 promotes monocyte survival and induces monocyte differentiation into macrophages. *Blood*, **95**, 1158-1166.

Schiemann, B., Gommerman, J.L., Vora, K., Cachero, T.G., Shulga-Morskaya, S., Dobles, M., Frew, E. and Scott, M.L. (2001) An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science*, **293**, 2111-2114.

Schlessinger, J., Lax, I. and Lemmon, M. (1995) Regulation of growth factor activation by proteoglycans: what is the role of the low affinity receptors? *Cell*, **83**, 357-360.

Schlessinger, J., Plotnikov, A.N., Ibrahimi, O.A., Eliseenkova, A.V., Yeh, B.K., Yayon, A., Linhardt, R.J. and Mohammadi, M. (2000) Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol Cell*, **6**, 743-750.

Schneider, P. (2005) The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol*, **17**, 282-289.

Schneider, P., Holler, N., Bodmer, J.L., Hahne, M., Frei, K., Fontana, A. and Tschopp, J. (1998) Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med*, **187**, 1205-1213.

Schneider, P., MacKay, F., Steiner, V., Hofmann, K., Bodmer, J.L., Holler, N., Ambrose, C., Lawton, P.,

Bixler, S., Acha-Orbea, H., Valmori, D., Romero, P., Werner-Favre, C., Zubler, R.H., Browning, J.L. and Tschopp, J. (1999) BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med*, **189**, 1747-1756.

Schneider, P., Takatsuka, H., Wilson, A., Mackay, F., Tardivel, A., Lens, S., Cachero, T.G., Finke, D., Beermann, F. and Tschopp, J. (2001) Maturation of marginal zone and follicular B cells requires B cell activating factor of the tumor necrosis factor family and is independent of B cell maturation antigen. *J Exp Med*, **194**, 1691-1697.

Schofield, K.P., Gallagher, J.T. and David, G. (1999) Expression of proteoglycan core proteins in human bone marrow stroma. *Biochem J*, **343 Pt 3**, 663-668.

Schofield, L. and Grau, G.E. (2005) Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol*, **5**, 722-735.

Schuck, P. (1997) Use of surface plasmon resonance to probe the equilibrium and dynamic aspects of interactions between biological macromolecules. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **26**, 541-566.

Seeberger, P.H. and Haase, W.C. (2000) Solid-phase oligosaccharide synthesis and combinatorial carbohydrate libraries. *Chem Rev*, **100**, 4349-4394.

Seshasayee, D., Valdez, P., Yan, M., Dixit, V.M., Tumas, D. and Grewal, I.S. (2003) Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BLyS receptor. *Immunity*, **18**, 279-288.

Seyler, T.M., Park, Y.W., Takemura, S., Bram, R.J., Kurtin, P.J., Goronzy, J.J. and Weyand, C.M. (2005) BLyS and APRIL in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*, **115**, 3083-3092.

Shu, H.B., Hu, W.H. and Johnson, H. (1999) TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens. *J Leukoc Biol*, **65**, 680-683.

Shukla, D. and Spear, P.G. (2001) Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry. *J Clin Invest*, **108**, 503-510.

Shulga-Morskaya, S., Dobles, M., Walsh, M.E., Ng, L.G., MacKay, F., Rao, S.P., Kalled, S.L. and Scott, M.L. (2004) B cell-activating factor belonging to the TNF family acts through separate receptors to support B cell survival and T cell-independent antibody formation. *J Immunol*, **173**, 2331-2341.

Sigurskjold, B.W. (2000) Exact analysis of competition ligand binding by displacement isothermal titration calorimetry. *Anal Biochem*, **277**, 260-266.

Smith, S.H. and Cancro, M.P. (2003) Cutting edge: B cell receptor signals regulate BLyS receptor levels in mature B cells and their immediate progenitors. *J Immunol*, **170**, 5820-5823.

Spillmann, D., Witt, D. and Lindahl, U. (1998) Defining the interleukin-8-binding domain of heparan sulfate. *J Biol Chem*, **273**, 15487-15493.

Sporn, M.B. and Todaro, G.J. (1980) Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *N Engl J Med*, **303**, 878-880.

Standal, T., Seidel, C., Hjertner, O., Plesner, T., Sanderson, R.D., Waage, A., Borset, M. and Sundan, A. (2002) Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells. *Blood*, **100**, 3002-3007.

Stanley, M.J., Liebersbach, B.F., Liu, W., Anhalt, D.J. and Sanderson, R.D. (1995) Heparan sulfate-mediated cell aggregation. Syndecans-1 and -4 mediate intercellular adhesion following their transfection into human B lymphoid cells. *J Biol Chem*, **270**, 5077-5083.

Stavnezer, J. (1996) Immunoglobulin class switching. *Curr Opin Immunol*, **8**, 199-205.

Stein, J.V., Lopez-Fraga, M., Elustondo, F.A., Carvalho-Pinto, C.E., Rodriguez, D., Gomez-Caro, R., De Jong, J., Martinez, A.C., Medema, J.P. and Hahne, M. (2002) APRIL modulates B and T cell immunity. *J Clin Invest*, **109**, 1587-1598.

Stringer, S.E., Nelson, M.S. and Gupta, P. (2003) Identification of an MIP-1alpha -binding heparan sulfate oligosaccharide that supports long-term in vitro maintenance of human LTC-ICs. *Blood*, **101**, 2243-2245.

Suzuki, K., Hiroaki, H., Kohda, D. and Tanaka, T. (1998) An isoleucine zipper peptide forms a native-like triple stranded coiled coil in solution. *Protein Eng*, **11**, 1051-1055.

Szwajkajzer, D. and Carey, J. (1997) Molecular and biological constraints on ligand-binding affinity and specificity. *Biopolymers*, **44**, 181-198.

Takeuchi, Y., Yanagishita, M. and Hascall, V.C. (1992a) Metabolic pathways of heparan sulfate proteoglycans in a rat parathyroid cell line. *J Biol Chem*, **267**, 14677-14684.

Takeuchi, Y., Yanagishita, M. and Hascall, V.C. (1992b) Recycling of transferrin receptors and heparan sulfate proteoglycans in a rat parathyroid cell line. *J Biol Chem*, **267**, 14685-14690.

Tan, S.M., Xu, D., Roschke, V., Perry, J.W., Arkfeld, D.G., Ehresmann, G.R., Migone, T.S., Hilbert, D.M. and Stohl, W. (2003) Local production of B lymphocyte stimulator protein and APRIL in arthritic joints of patients with inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum*, **48**, 982-992.

Tanaka, Y., Adams, D.H. and Shaw, S. (1993) Regulation of leukocyte recruitment by proadhesive cytokines immobilized on endothelial proteoglycan. *Curr Top Microbiol Immunol*, **184**, 99-106.

Tanaka, Y., Kimata, K., Adams, D.H. and Eto, S. (1998) Modulation of cytokine function by heparan sulfate proteoglycans: sophisticated models for the regulation of cellular responses to cytokines. *Proc Assoc Am Physicians*, **110**, 118-125.

Tapanadechopone, P., Tumova, S., Jiang, X. and Couchman, J.R. (2001) Epidermal transformation leads to increased perlecan synthesis with heparin-binding-growth-factor affinity. *Biochem J*, **355**, 517-527.

Tartaglia, L.A., Ayres, T.M., Wong, G.H. and Goeddel, D.V. (1993) A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*, **74**, 845-853.

Thompson, J.S., Bixler, S.A., Qian, F., Vora, K., Scott, M.L., Cachero, T.G., Hession, C., Schneider, P., Sizing, I.D., Mullen, C., Strauch, K., Zafari, M., Benjamin, C.D., Tschopp, J., Browning, J.L. and Ambrose, C. (2001) BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. *Science*, **293**, 2108-2111.

Thompson, L.D., Pantoliano, M.W. and Springer, B.A. (1994) Energetic characterization of the basic fibroblast growth factor-heparin interaction: identification of the heparin binding domain. *Biochemistry*, **33**, 3831-3840.

Todorovicc, V., Chen, C.C., Hay, N. and Lau, L.F. (2005) The matrix protein CCN1 (CYR61) induces

apoptosis in fibroblasts. *J Cell Biol*, **171**, 559-568.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4354.

Tufvesson, E. and Westergren-Thorsson, G. (2002) Tumour necrosis factor-alpha interacts with biglycan and decorin. *FEBS Lett*, **530**, 124-128.

Tumova, S., Woods, A. and Couchman, J.R. (2000) Heparan sulfate proteoglycans on the cell surface: versatile coordinators of cellular functions. *Int J Biochem Cell Biol*, **32**, 269-288.

Turnbull, J.E. and Gallagher, J.T. (1991a) Distribution of iduronate 2-sulphate residues in heparan sulphate. Evidence for an ordered polymeric structure. *Biochem J*, **273 (Pt 3)**, 553-559.

Turnbull, J.E. and Gallagher, J.T. (1991b) Sequence analysis of heparan sulphate indicates defined location of N-sulphated glucosamine and iduronate 2-sulphate residues proximal to the protein-linkage region. *Biochem J*, **277 (Pt 2)**, 297-303.

Turnbull, J.E., Hopwood, J.J. and Gallagher, J.T. (1999) A strategy for rapid sequencing of heparan sulfate and heparin saccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 2698-2703.

Tyagi, M., Rusnati, M., Presta, M. and Giacca, M. (2001) Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem*, **276**, 3254-3261.

Uemura, N., Ozawa, K., Takahashi, K., Tojo, A., Tani, K., Harigaya, K., Suzu, S., Motoyoshi, K., Matsuda, H., Yagita, H. and et al. (1993) Binding of membrane-anchored macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) to its receptor mediates specific adhesion between stromal cells and M-CSF receptor-bearing hematopoietic cells. *Blood*, **82**, 2634-2640.

Uhlin-Hansen, L., Eskeland, T. and Kolset, S.O. (1989) Modulation of the expression of chondroitin sulfate proteoglycan in stimulated human monocytes. *J Biol Chem*, **264**, 14916-14922.

Uhlin-Hansen, L. and Kolset, S.O. (1988) Cell density-dependent expression of chondroitin sulfate proteoglycan in cultured human monocytes. *J Biol Chem*, **263**, 2526-2531.

Uhlin-Hansen, L., Wik, T., Kjellen, L., Berg, E., Forsdahl, F. and Kolset, S.O. (1993) Proteoglycan metabolism in normal and inflammatory human macrophages. *Blood*, **82**, 2880-2889.

van Furth, R. and Cohn, Z.A. (1968) The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med*, **128**, 415-435.

Varfolomeev, E., Kischkel, F., Martin, F., Seshasayee, D., Wang, H., Lawrence, D., Olsson, C., Tom, L., Erickson, S., French, D., Schow, P., Grewal, I.S. and Ashkenazi, A. (2004) APRIL-deficient mice have normal immune system development. *Mol Cell Biol*, **24**, 997-1006.

Vives, R.R., Sadir, R., Imberty, A., Rencurosi, A. and Lortat-Jacob, H. (2002) A kinetics and modeling study of RANTES(9-68) binding to heparin reveals a mechanism of cooperative oligomerization. *Biochemistry*, **41**, 14779-14789.

Vlodavsky, I., Goldshmidt, O., Zcharia, E., Atzmon, R., Rangini-Guatta, Z., Elkin, M., Peretz, T. and Friedmann, Y. (2002) Mammalian heparanase: involvement in cancer metastasis, angiogenesis and normal development. *Semin Cancer Biol*, **12**, 121-129.

von Bulow, G.U. and Bram, R.J. (1997) NF-AT activation induced by a CAML-interacting member of

the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Science*, **278**, 138-141.

von Bulow, G.U., van Deursen, J.M. and Bram, R.J. (2001) Regulation of the T-independent humoral response by TACI. *Immunity*, **14**, 573-582.

Vora, K.A., Wang, L.C., Rao, S.P., Liu, Z.Y., Majeau, G.R., Cutler, A.H., Hochman, P.S., Scott, M.L. and Kalled, S.L. (2003) Cutting edge: germinal centers formed in the absence of B cell-activating factor belonging to the TNF family exhibit impaired maturation and function. *J Immunol*, **171**, 547-551.

Wagner, L., Yang, O.O., Garcia-Zepeda, E.A., Ge, Y., Kalams, S.A., Walker, B.D., Pasternack, M.S. and Luster, A.D. (1998) Beta-chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans. *Nature*, **391**, 908-911.

Wahl, S.M., Allen, J.B., Weeks, B.S., Wong, H.L. and Klotman, P.E. (1993) Transforming growth factor beta enhances integrin expression and type IV collagenase secretion in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 4577-4581.

Walczak, H., Degli-Esposti, M.A., Johnson, R.S., Smolak, P.J., Waugh, J.Y., Boiani, N., Timour, M.S., Gerhart, M.J., Schooley, K.A., Smith, C.A., Goodwin, R.G. and Rauch, C.T. (1997) TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *Embo J*, **16**, 5386-5397.

Wallweber, H.J., Compaan, D.M., Starovasnik, M.A. and Hymowitz, S.G. (2004) The crystal structure of a proliferation-inducing ligand, APRIL. *J Mol Biol*, **343**, 283-290.

Walton, K.J., Duncan, J.M., Deschamps, P. and Shaughnessy, S.G. (2002) Heparin acts synergistically with interleukin-11 to induce STAT3 activation and in vitro osteoclast formation. *Blood*, **100**, 2530-2536.

Wang, H., Marsters, S.A., Baker, T., Chan, B., Lee, W.P., Fu, L., Tumas, D., Yan, M., Dixit, V.M., Ashkenazi, A. and Grewal, I.S. (2001) TACI-ligand interactions are required for T cell activation and collagen-induced arthritis in mice. *Nat Immunol*, **2**, 632-637.

Wang, L., Fuster, M., Sriramarao, P. and Esko, J.D. (2005) Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin- and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory responses. *Nat Immunol*, **6**, 902-910.

Webb, L.M., Ehrengruber, M.U., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M. and Rot, A. (1993) Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil responses to interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 7158-7162.

Wegrowski, Y. and Maquart, F.X. (2004) Involvement of stromal proteoglycans in tumour progression. *Crit Rev Oncol Hematol*, **49**, 259-268.

Wettreich, A., Sebollela, A., Carvalho, M.A., Azevedo, S.P., Borojevic, R., Ferreira, S.T. and Coelho-Sampaio, T. (1999) Acidic pH modulates the interaction between human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and glycosaminoglycans. *J Biol Chem*, **274**, 31468-31475.

Whitelock, J.M. and Iozzo, R.V. (2005) Heparan sulfate: a complex polymer charged with biological activity. *Chem Rev*, **105**, 2745-2764.

Woods, A. and Couchman, J.R. (1994) Syndecan 4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component. *Mol Biol Cell*, **5**, 183-192.

Woods, A. and Couchman, J.R. (1996) Signaling from the matrix to the cytoskeleton: role of cell surface proteoglycans in matrix assembly. *Kidney Int Suppl*, **54**, S64-67.

Woods, A., Longley, R.L., Tumova, S. and Couchman, J.R. (2000) Syndecan-4 binding to the high affinity heparin-binding domain of fibronectin drives focal adhesion formation in fibroblasts. *Arch Biochem Biophys*, **374**, 66-72.

Woods, A., McCarthy, J.B., Furcht, L.T. and Couchman, J.R. (1993) A synthetic peptide from the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin promotes focal adhesion formation. *Mol Biol Cell*, **4**, 605-613.

Woods, A., Oh, E.S. and Couchman, J.R. (1998) Syndecan proteoglycans and cell adhesion. *Matrix Biol*, **17**, 477-483.

Wu, Y., Bressette, D., Carrell, J.A., Kaufman, T., Feng, P., Taylor, K., Gan, Y., Cho, Y.H., Garcia, A.D., Gollatz, E., Dimke, D., LaFleur, D., Migone, T.S., Nardelli, B., Wei, P., Ruben, S.M., Ullrich, S.J., Olsen, H.S., Kanakaraj, P., Moore, P.A. and Baker, K.P. (2000) Tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily member TACI is a high affinity receptor for TNF family members APRIL and BLyS. *J Biol Chem*, **275**, 35478-35485.

Wu, Z.L., Zhang, L., Yabe, T., Kuberan, B., Beeler, D.L., Love, A. and Rosenberg, R.D. (2003) The involvement of heparan sulfate (HS) in FGF1/HS/FGFR1 signaling complex. *J Biol Chem*, **278**, 17121-17129.

Xia, X.Z., Treanor, J., Senaldi, G., Khare, S.D., Boone, T., Kelley, M., Theill, L.E., Colombero, A., Solovyev, I., Lee, F., McCabe, S., Elliott, R., Miner, K., Hawkins, N., Guo, J., Stolina, M., Yu, G., Wang, J., Delaney, J., Meng, S.Y., Boyle, W.J. and Hsu, H. (2000) TACI is a TRAF-interacting receptor for TALL-1, a tumor necrosis factor family member involved in B cell regulation. *J Exp Med*, **192**, 137-143.

Xu, L.G. and Shu, H.B. (2002) TNFR-associated factor-3 is associated with BAFF-R and negatively regulates BAFF-R-mediated NF-kappa B activation and IL-10 production. *J Immunol*, **169**, 6883-6889.

Xu, S. and Lam, K.P. (2001) B-cell maturation protein, which binds the tumor necrosis factor family members BAFF and APRIL, is dispensable for humoral immune responses. *Mol Cell Biol*, **21**, 4067-4074.

Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Goto, M., Kobayashi, F., Tsuda, E., Morinaga, T. and Higashio, K. (1998) Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor. *J Biol Chem*, **273**, 5117-5123.

Yan, M., Brady, J.R., Chan, B., Lee, W.P., Hsu, B., Harless, S., Cancro, M., Grewal, I.S. and Dixit, V.M. (2001a) Identification of a novel receptor for B lymphocyte stimulator that is mutated in a mouse strain with severe B cell deficiency. *Curr Biol*, **11**, 1547-1552.

Yan, M., Marsters, S.A., Grewal, I.S., Wang, H., Ashkenazi, A. and Dixit, V.M. (2000) Identification of a receptor for BLyS demonstrates a crucial role in humoral immunity. *Nat Immunol*, **1**, 37-41.

Yan, M., Wang, H., Chan, B., Roose-Girma, M., Erickson, S., Baker, T., Tumas, D., Grewal, I.S. and Dixit, V.M. (2001b) Activation and accumulation of B cells in TACI-deficient mice. *Nat*

Immunol, **2**, 638-643.

Yates, E.A., Guimond, S.E. and Turnbull, J.E. (2004) Highly diverse heparan sulfate analogue libraries: providing access to expanded areas of sequence space for bioactivity screening. *J Med Chem*, **47**, 277-280.

Yeaman, C. and Rapraeger, A.C. (1993a) Membrane-anchored proteoglycans of mouse macrophages: P388D1 cells express a syndecan-4-like heparan sulfate proteoglycan and a distinct chondroitin sulfate form. *J Cell Physiol*, **157**, 413-425.

Yeaman, C. and Rapraeger, A.C. (1993b) Post-transcriptional regulation of syndecan-1 expression by cAMP in peritoneal macrophages. *J Cell Biol*, **122**, 941-950.

Yoneda, J., Saiki, I., Igarashi, Y., Kobayashi, H., Fujii, H., Ishizaki, Y., Kimizuka, F., Kato, I. and Azuma, I. (1995) Role of the heparin-binding domain of chimeric peptides derived from fibronectin in cell spreading and motility. *Exp Cell Res*, **217**, 169-179.

Yu, G., Boone, T., Delaney, J., Hawkins, N., Kelley, M., Ramakrishnan, M., McCabe, S., Qiu, W.R., Kornuc, M., Xia, X.Z., Guo, J., Stolina, M., Boyle, W.J., Sarosi, I., Hsu, H., Senaldi, G. and Theill, L.E. (2000) APRIL and TALL-I and receptors BCMA and TACI: system for regulating humoral immunity. *Nat Immunol*, **1**, 252-256.

Zamir, E., Katz, M., Posen, Y., Erez, N., Yamada, K.M., Katz, B.Z., Lin, S., Lin, D.C., Bershadsky, A., Kam, Z. and Geiger, B. (2000) Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nat Cell Biol*, **2**, 191-196.

Zhang, G. (2004) Tumor necrosis factor family ligand-receptor binding. *Curr Opin Struct Biol*, **14**, 154-160.

Zhang, Z., Coomans, C. and David, G. (2001) Membrane heparan sulfate proteoglycan-supported FGF2-FGFR1 signaling: evidence in support of the "cooperative end structures" model. *J Biol Chem*, **276**, 41921-41929.

Zhou, L.J. and Tedder, T.F. (1996) CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 2588-2592.

Zimmerman, E., Geiger, B. and Addadi, L. (2002) Initial stages of cell-matrix adhesion can be mediated and modulated by cell-surface hyaluronan. *Biophys J*, **82**, 1848-1857.

Zimmermann, P. and David, G. (1999) The syndecans, tuners of transmembrane signaling. *Faseb J*, **13 Suppl**, S91-S100.

3 Publikation

Buchbeitrag:

Willen, D., Schader, M., Walczak, H., *Physiological role of TRAIL in Apoptosis & Cancer Therapy,* Debatin, K.M. and Fulda, S., Editors. 2005 Wiley-VCH Verlag, Weinheim. p.61-73.

Publikation in Vorbereitung:

Willen, D., Walczak, H., (2006) APRIL and TACI interact with proteoglycans on monocytes and dendritic cells – with different functional outcomes.

4 Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Universität oder einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

Weiterhin erkläre ich, dass die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit eingereicht wurde.

Heidelberg, März 2006

.....
(Daniela Willen)