

Untersuchungen humaner natürlicher Killer-Zellen und ihrer Sialyltransferasen nach Dicarbonyl-Stress

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –
der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn Philip Rosenstock

geb. am 23.12.1989 in Hannover

Gutachter:

PD Dr. Iris Thondorf

Prof. Dr. Rüdiger Horstkorte

Prof. Dr. Lars-Oliver Klotz (Friedrich-Schiller-Universität Jena)

Datum der Verteidigung:

01.07.2020

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------------|
| Abbildungsverzeichnis | I |
| Tabellenverzeichnis | II |
| Abkürzungsverzeichnis | III |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Glykierung und Dicarbonyl-Stress | 1 |
| 1.1.1 Glykierung..... | 1 |
| 1.1.2 Dicarbonyl-Verbindungen und Dicarbonyl-Stress | 2 |
| 1.1.3 Glykierung und Dicarbonyl-Stress im Alter und bei altersbedingten Erkrankungen..... | 5 |
| 1.1.4 Auswirkungen von Glykierung und Dicarbonyl-Stress auf das Immunsystem ... | 6 |
| 1.2 Sialinsäuren | 8 |
| 1.2.1 Sialyltransferasen..... | 9 |
| 1.3 Natürliche Killer-Zellen | 12 |
| 1.3.1 Rezeptoren auf NK-Zellen | 12 |
| 1.3.2 Lyse von Zielzellen durch NK-Zellen | 14 |
| 1.3.3 Humane NK-Zelllinien | 16 |
| 1.3.4 Sialinsäuren auf NK-Zellen..... | 17 |
| 1.3.5 NK-Zellen im Alter und bei altersbedingten Erkrankungen | 18 |
| 1.4 Zielstellung der Arbeit..... | 21 |
| 2 Material und Methoden | 22 |
| 2.1 Material | 22 |
| 2.1.1 Chemikalien | 22 |
| 2.1.2 Molekularbiologische Reagenzien und Kits | 23 |
| 2.1.3 Hergestellte Lösungen | 24 |
| 2.1.4 Zellkultur-Reagenzien | 25 |
| 2.1.5 Primer | 26 |
| 2.1.6 Antikörper..... | 27 |
| 2.1.7 Verbrauchsmaterialien | 27 |
| 2.1.8 Geräte..... | 28 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.1.9 | Software..... | 30 |
| 2.2 | Methoden..... | 31 |
| 2.2.1 | Zellkultur..... | 31 |
| 2.2.1.1 | Zellkultivierung..... | 31 |
| 2.2.1.2 | Behandlung mit Methylglyoxal und Glyoxal..... | 31 |
| 2.2.1.3 | Stimulation mit Interleukin-2 (IL-2)..... | 32 |
| 2.2.1.4 | Mikroskopie..... | 32 |
| 2.2.1.5 | MTT-Assay..... | 32 |
| 2.2.2 | Durchflusszytometrie..... | 33 |
| 2.2.2.1 | Viabilitäts-Assay..... | 34 |
| 2.2.2.2 | Konjugat-Assay..... | 36 |
| 2.2.2.3 | Zytotoxizitäts-Assay..... | 37 |
| 2.2.3 | Protein-Analyse..... | 39 |
| 2.2.3.1 | Protein-Isolation..... | 39 |
| 2.2.3.2 | Konzentrationsbestimmung..... | 39 |
| 2.2.3.3 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese..... | 39 |
| 2.2.3.4 | Western-Blot..... | 39 |
| 2.2.4 | RNA-Analyse..... | 40 |
| 2.2.4.1 | RNA-Isolation..... | 40 |
| 2.2.4.2 | Reverse Transkription..... | 41 |
| 2.2.4.3 | Primer..... | 41 |
| 2.2.4.4 | Polymerase Kettenreaktion..... | 41 |
| 2.2.4.5 | Agarose-Gel-Elektrophorese..... | 42 |
| 2.2.4.6 | Semiquantitative Real-Time PCR..... | 42 |
| 2.2.5 | Datenanalyse..... | 43 |
| 3 | Ergebnisse..... | 44 |
| 3.1 | Einfluss von Dicarbonyl-Stress und Glykierung auf die Funktion von NK-Zellen..... | 44 |
| 3.1.1 | Glykierung von NK-Zellen..... | 44 |
| 3.1.1.1 | Nachweis der Glykierung..... | 44 |
| 3.1.1.2 | Viabilität und metabolische Aktivität..... | 45 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.1.1.3 | Zellmorphologie..... | 47 |
| 3.1.1.4 | Konjugat-Assay | 48 |
| 3.1.1.5 | Zytotoxizitäts-Assay | 51 |
| 3.1.2 | Glykierung von K562-Zellen | 53 |
| 3.1.2.1 | Nachweis der Glykierung | 54 |
| 3.1.2.2 | Viabilität | 55 |
| 3.1.2.3 | Konjugatbildung | 55 |
| 3.1.2.4 | Zytotoxizität..... | 56 |
| 3.2 | Analyse der Sialyltransferasen in NK-Zellen..... | 57 |
| 3.2.1 | Primer Design und Test..... | 58 |
| 3.2.2 | Expression der Sialyltransferasen in NK-Zellen..... | 59 |
| 3.2.3 | Expression der Sialyltransferasen nach Stimulation mit IL-2 | 62 |
| 3.2.4 | Expression der Sialyltransferasen nach MGO-Behandlung | 64 |
| 4 | Diskussion..... | 66 |
| 4.1 | Einfluss von Dicarbonyl-Stress und Glykierung auf die Funktion von NK-Zellen..... | 66 |
| 4.1.1 | Glykierung von NK-Zellen | 66 |
| 4.1.1.1 | Verwendete Zelllinie | 66 |
| 4.1.1.2 | Verwendete Konzentrationen | 66 |
| 4.1.1.3 | Viabilität und metabolische Aktivität | 67 |
| 4.1.1.4 | Unterschiedliche starke Effekte durch MGO oder GO | 68 |
| 4.1.1.5 | Mögliche Mechanismen..... | 70 |
| 4.1.1.6 | Bedeutung für die reduzierte NK-Zell-Aktivität <i>in vivo</i> | 70 |
| 4.1.2 | Glykierung von K562-Zellen | 71 |
| 4.1.2.1 | Unterschiede zur Glykierung der NK-Zellen | 71 |
| 4.1.2.2 | Bedeutung für die Krebsentstehung und Behandlung | 72 |
| 4.2 | Analyse der Sialyltransferasen in NK-Zellen..... | 74 |
| 4.2.1 | Charakterisierung der NK-Zellen basierend auf ihrer Expression der Sialyltransferasen..... | 74 |
| 4.2.2 | Veränderung durch Aktivierung | 75 |
| 4.2.3 | Veränderung durch Dicarbonyl-Stress..... | 75 |

| | | |
|----------|---------------------------------------|------------|
| 5 | Ausblick | 77 |
| 6 | Zusammenfassung..... | 79 |
| 7 | Abstract | 80 |
| 8 | Literaturverzeichnis | 81 |
| | Anhang..... | 102 |
| | Publikationsliste..... | 104 |
| | Lebenslauf | 106 |
| | Danksagung..... | 107 |
| | Eidesstattliche Erklärung..... | 108 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Abbildung 1: Erste Schritte der Glykierung | 1 |
| Abbildung 2: Methylglyoxal und Glyoxal | 2 |
| Abbildung 3: AGEs die aus MGO entstehen können | 3 |
| Abbildung 4: AGEs die aus GO entstehen können | 4 |
| Abbildung 5: Struktur der Sialinsäuren | 8 |
| Abbildung 6: Biosynthese der Sialinsäuren..... | 9 |
| Abbildung 7: Gruppen der humanen Sialyltransferasen..... | 10 |
| Abbildung 8: Erkennung von Zellen durch NK-Zellen | 14 |
| Abbildung 9: Degranulierung von NK-Zellen..... | 15 |
| Abbildung 10: Durchflusszytometer | 33 |
| Abbildung 11: Funktionsweise des Viabilitäts-Assays..... | 35 |
| Abbildung 12: <i>Gates</i> beim Viabilitäts-Assay | 36 |
| Abbildung 13: <i>Gates</i> beim Konjugat-Assay..... | 37 |
| Abbildung 14: <i>Gates</i> beim Zytotoxizitäts-Assay | 38 |
| Abbildung 15: Nachweis der Glykierung der NK-92-Zellen | 45 |
| Abbildung 16: Viabilität der NK-92-Zellen | 46 |
| Abbildung 17: Metabolische Aktivität der NK-92-Zellen | 47 |
| Abbildung 18: Mikroskopie | 48 |
| Abbildung 19: Zeitabhängigkeit des Konjugat-Assays | 49 |
| Abbildung 20: Konjugatbildung der NK-92-Zellen nach MGO- und GO-Behandlung..... | 50 |
| Abbildung 21: Zytotoxizitäts-Assay nach Stimulation mit IL-2 | 52 |
| Abbildung 22: Zytotoxische Aktivität der NK-Zellen nach MGO- und GO-Behandlung | 53 |
| Abbildung 23: Nachweis der Glykierung der K56-Zellen..... | 54 |
| Abbildung 24: Viabilität der K562-Zellen..... | 55 |
| Abbildung 25: Konjugat-Assay mit glykierten K562-Zellen..... | 56 |
| Abbildung 26: Zytotox-Assay mit glykierten K562-Zellen | 57 |
| Abbildung 27: Test der Primer..... | 59 |
| Abbildung 28: Expression der Sialyltransferasen in NK-Zelllinien | 60 |
| Abbildung 29: Expression der Sialyltransferasen in primären NK-Zellen | 61 |
| Abbildung 30: INF- γ -Expression nach Stimulation mit IL-2 | 63 |
| Abbildung 31: Expression der Sialyltransferasen nach Stimulation mit IL-2..... | 64 |
| Abbildung 32: Expression der Sialyltransferasen nach MGO-Behandlung..... | 65 |
| Abbildung 33: An-, Mono- und Dihydrate von MGO und GO..... | 69 |
| Abbildung 34: Ponceau-Färbung (Anhang)..... | 102 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Tabelle 1: Humane Sialytransferasen (Daten aus Takashima et al. (2002b)) | 11 |
| Tabelle 2: Verwendete Fluorophore..... | 34 |
| Tabelle 3: Positivkontrollen für die Primer..... | 58 |
| Tabelle 4: Expression der Sialyltransferasen in NK-Zellen | 62 |
| Tabelle 5: Amplifikationseffizienzen der verwendeten Primer (Anhang)..... | 103 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------|--|
| 7-AAD | 7-Aminoactinomycin |
| AGE | <i>Advanced Glycation Endproduct</i> |
| APC | Allophycocyanin |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| CD | <i>Cluster of Differentiation</i> |
| cDNA | komplementäre DNA, von engl. <i>complementary DNA</i> |
| CFSE | Carboxyfluorescein-Succinimidylester |
| CMP | Cytidinmonophosphat |
| CTP | Cytidintriphosphat |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DTT | Dithiothreitol |
| E:T Ratio | <i>Effector:Target Ratio</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| Fc-Region | <i>Fragment crystallizable Region</i> |
| FKS | Fetales Kälberserum |
| FSC | Vorwärtstreulicht, von engl. <i>forward scatter</i> |
| Gal | Galaktose |
| GalNAc | N-Acetylgalaktosamin |
| GD | Disialo-Gangliosid |
| GlcNAc | N-Acetylglukosamin |
| GM | Monosialo-Gangliosid |
| GNE | UDP-N-Acetylglukosamin-2-epimerase / N-Acetylmannosamin-Kinase |
| GO | Glyoxal |
| GT | Trisialo-Gangliosid |
| HRP | <i>Horseradish Peroxidase</i> |
| IL | Interleukin |
| INF | Interferon |
| LFA-1 | <i>Lymphocyte Function-Associated Antigen 1</i> |
| ManNAc | N-Acetylmannosamin |
| MGO | Methylglyoxal |
| MHC | <i>Major Histocompatibility Complex</i> |
| MTOC | Mikrotubuli-organisierendes Zentrum, von engl. <i>Microtubule Organizing Center</i> |
| MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid |
| NCAM | Neurales Zelladhäsion Molekül, von engl. <i>Neural Cell Adhesion Molecule</i> |
| NCR | <i>Natural Cytotoxic Receptor</i> |
| Neu5Ac | N-Acetylneuraminsäure |
| NK-Zelle | natürliche Killer-Zelle |
| PBMCs | mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, von engl. <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> |
| PBS | <i>Phosphate-Buffered Saline</i> |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| polySia | Polysialinsäure |
| RAGE | <i>Receptor for Advanced Glycation Endproducts</i> |
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |

| | |
|---------------|--|
| SDS | Natriumdodecylsulfat ,von engl. <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> |
| Siglecs | <i>Sialic Acid-binding Immunoglobulin-like Lectin</i> |
| SNARE | <i>Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive-Factor Attachment Receptor</i> |
| SSC | Seitwärtstreulicht, von engl. <i>sideward scatter</i> |
| ST3Gal | β -Galaktosid α 2,3-Sialyltransferase |
| ST6Gal | β -Galaktosid α 2,6-Sialyltransferase |
| ST6GalNAc6 | GalNAc α 2,6-Sialyltransferase |
| ST8Sia | α 2,8-Sialyltransferase |
| TAE-Puffer | TRIS-Acetat-EDTA-Puffer |
| TEMED | Tetramethylethylen iamin |
| TNF- α | <i>Tumor Necrosis Factor α</i> |
| TRAIL | <i>Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand</i> |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| UDP | Uridindiphosphat |

1 Einleitung

1.1 Glykierung und Dicarbonyl-Stress

1.1.1 Glykierung

Glykierung beschreibt die nicht-enzymatische Reaktion von Aminogruppen mit Carbonyl-Verbindungen, z.B. Zuckern, wie Fruktose oder Glukose. Diese Reaktion läuft unter anderem beim Erhitzen von Lebensmitteln ab und sorgt für eine Bräunung beim Braten oder Frittieren. Der Vorgang wird auch als Maillard-Reaktion bezeichnet, nach dem französischen Chemiker Louis Maillard, der 1912 zum ersten Mal die Reaktion von Zuckern mit Aminosäuren unter Hitzezufuhr beschrieb (Maillard 1912). Es handelt sich nicht um eine einzelne Reaktion, sondern um ein komplexes Zusammenspiel verschiedener nicht-enzymatischer Reaktionen. Glykierung tritt allerdings nicht nur in der Lebensmittelzubereitung auf, sondern kann auch *in vivo* in verschiedenen Organismen ablaufen. Im menschlichen Körper reagiert beispielsweise freie Glukose mit Aminosäuren von Proteinen. Die Carbonyl-Gruppe von Glukose oder anderen Aldosen reagiert dabei mit einer freien Aminogruppe eines Proteins, wobei ein spezielles Imin, die sogenannte Schiffsche Base, entsteht. Aus dieser relativ instabilen Verbindung wird dann mittels Amadori-Umlagerung ein stabileres sogenanntes Amadori-Produkt gebildet (Abbildung 1 A). Bei der Reaktion mit einer Ketose, wie zum Beispiel Fruktose, erfolgt ebenfalls eine Reaktion an der Carbonyl-Gruppe. Die Schiffsche Base wird dann durch Heyns-Umlagerung in ein sogenanntes Heyns-Produkt umgewandelt (Abbildung 1 B; Takahashi 2015).

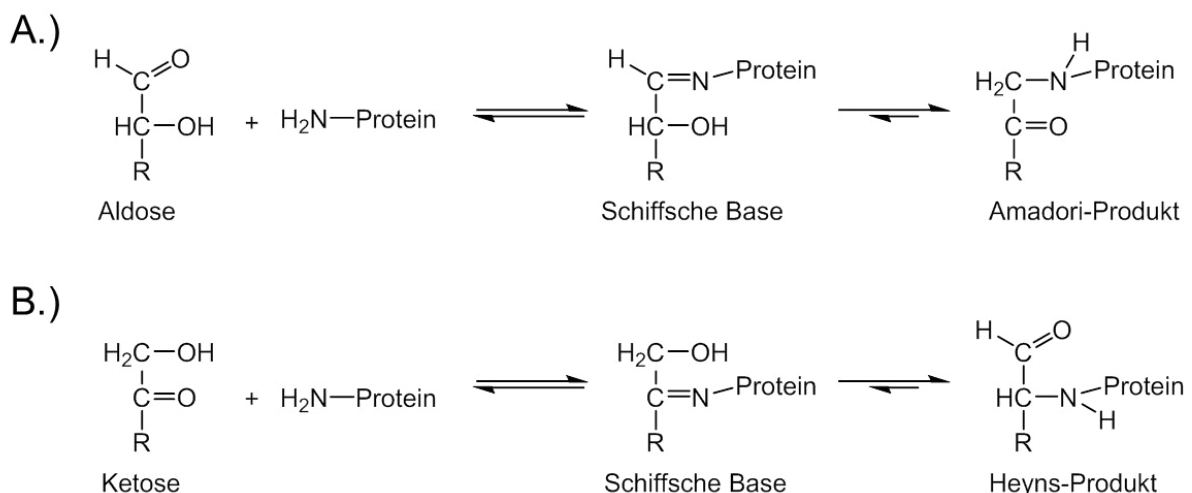


Abbildung 1: Erste Schritte der Glykierung

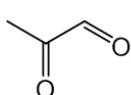
Gezeigt ist die Reaktion von Aldosen (A.) und Ketosen (B.) mit einer freien Aminogruppe eines Proteins. Zuerst entsteht eine Schiffsche Base, die dann in einer Amadori- oder Heyns-Umlagerung zu einem sogenannten Amadori- oder Heyns-Produkt umgewandelt wird. Abbildung erstellt mit Chem Draw nach Shan et al. (2013) und Takahashi (2015).

Das Amadori- bzw. Heyns-Produkt kann dann weiter reagieren, wobei sich verschiedene Verbindungen, z.B. Reduktone und Furfurale, bilden können. Außerdem können Spaltprodukte wie Carbonyl- oder Hydroxycarbonyl-Verbindungen entstehen, die dann ebenfalls mit freien Aminogruppen reagieren können. Die finalen Produkte dieser verschiedenen Reaktionen, die nicht mehr weiter reagieren können, werden als *Advanced Glycation Endproducts* (AGEs) bezeichnet (Zhang et al. 2009). AGEs sind posttranslationale Modifikationen und finden sich hauptsächlich an Lysin- oder Arginin-Seitenketten von Proteinen. Neben der Glykierung von Proteinen können allerdings auch Aminophospholipide glykiert werden (Bucala et al. 1993). Außerdem kann auch eine Glykierung von Nukleotiden der DNA stattfinden, was zu DNA-Schäden und Mutationen führen kann (Thornalley 2008).

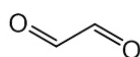
AGEs können zelluläre Prozesse auf verschiedene Arten beeinflussen. Zum einen kann eine intrazelluläre Glykierung stattfinden, was intrazelluläre Signal- und Biosynthesewege behindern kann. Außerdem können AGEs an Oberflächenrezeptoren und extrazellulären Matrixproteinen gebildet werden. Dadurch können Zell-Adhäsion und Signaltransduktion beeinflusst werden. Des Weiteren können extrazelluläre AGEs an bestimmte Rezeptoren binden und so Signale in die Zellen weiterleiten (Brownlee 2001; Schalkwijk und Miyata 2012). Einer der am häufigsten beschriebenen AGE-bindenden Rezeptoren ist der *Receptor for Advanced Glycation Endproducts* (RAGE). Es handelt sich bei RAGE um einen Rezeptor aus der Immunoglobulin-Superfamilie. RAGE ist ein Multi-Ligand-Rezeptor und kann neben AGEs auch an verschiedene andere Liganden, wie das *High-Mobility-Group-Protein B1* (HMGB1) oder verschiedene S-100-Proteine binden. Bei der Bindung von Liganden kommt es zu einer Multimerisierung von RAGE, wodurch verschiedene Kinasen oder Rho-GTPasen aktiviert werden. AGEs können somit über die Bindung an RAGE z.B. die Zytokin-Produktion, Zell-Migration oder Proliferation auslösen (Hudson und Lippman 2018).

1.1.2 Dicarbonyl-Verbindungen und Dicarbonyl-Stress

Neben reduzierenden Zuckern können auch Dicarbonyl-Verbindungen eine Glykierungsreaktion auslösen. *In vivo* sind dies vor allem die Dicarbonyl-Verbindungen Methylglyoxal (MGO) und Glyoxal (GO) (Abbildung 2), welche im Vergleich mit Glukose deutlich reaktiver sind (Brings et al. 2017).



Methylglyoxal (MGO)



Glyoxal (GO)

Abbildung 2: Methylglyoxal und Glyoxal

Abgebildet sind die häufig vorkommenden Dicarbonyl-Verbindungen, Methylglyoxal und Glyoxal. Abbildung erstellt mit Chem Draw.

Dicarbonyl-Verbindungen können, wie bereits beschrieben, als Spaltprodukte des Amadori- bzw. Heyns-Produkts, der Schiff'schen Base oder direkt bei der Autooxidation von Glukose entstehen (Thornalley et al. 1999). Ferner können sie auch als Nebenprodukte von verschiedenen Biosynthesewegen gebildet werden. MGO entsteht z.B. bei der Glykolyse aus Glycerinaldehyd-3-phosphat und Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) in einer nicht-enzymatischen Reaktion (Phillips und Thornalley 1993). MGO und GO werden außerdem aus Produkten der Lipidperoxidation gebildet (Wetzels et al. 2017). Des Weiteren können Dicarbonyl-Verbindungen durch die Oxidation von Aminosäuren entstehen (Semchyshyn 2014). Dicarbonyl-Verbindungen stellen die wichtigsten Intermediate bei der nicht-enzymatischen Protein-Modifikation dar (Henning und Glomb 2016). Die Reaktionen von Aminosäuren mit Dicarbonyl-Verbindungen sorgen für eine Vielzahl unterschiedlicher AGEs. Neben Lysin und Arginin-Seitenketten können MGO und GO auch mit der Thiolgruppe von Cystein reagieren (Vistoli et al. 2013). Einige der am häufigsten vorkommenden Produkte, die bei der Reaktion von Aminosäuren mit MGO und GO entstehen, sind in Abbildung 3 und Abbildung 4 dargestellt.

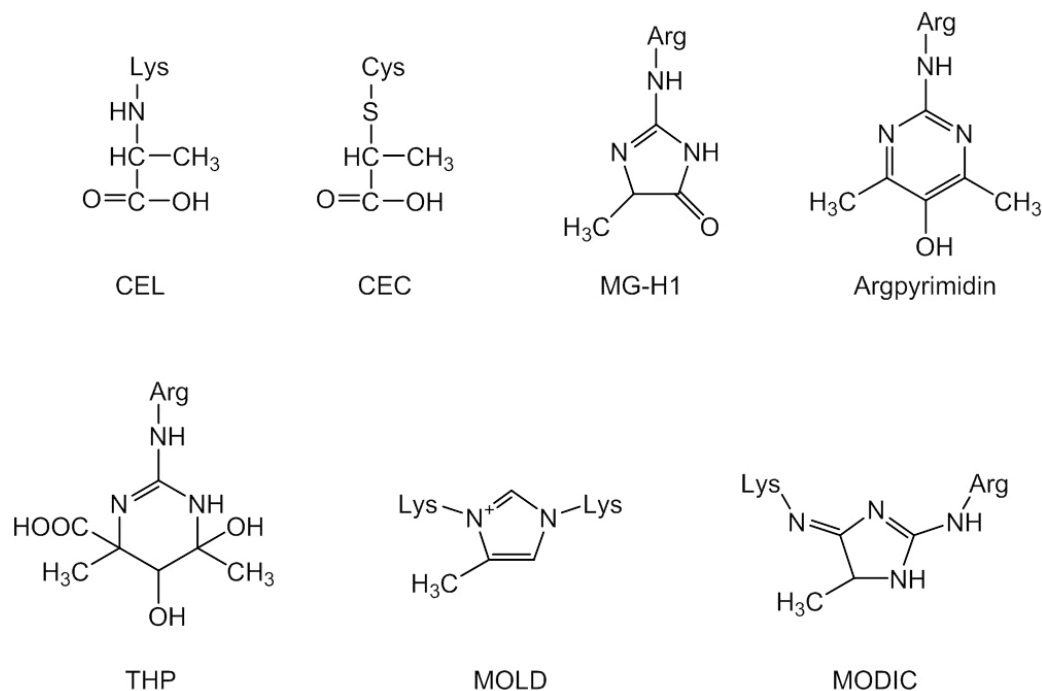


Abbildung 3: AGEs die aus MGO entstehen können

Gezeigt sind einige AGEs, die aus der Reaktion von MGO mit Arginin-, Lysin- oder Cystein-Seitenketten entstehen können. Aus Gründen der Übersicht sind die Reste der Aminosäuren mit Arg, Lys und Cys abgekürzt. Carboxyethyllysine (CEL), Carboxyethylcystein (CEC) und *Methylglyoxal-derived Hydroimidazolone* (MG-H1) entstehen bei der Reaktion eines MGO-Moleküls mit der entsprechenden Aminosäure. Für die Bildung von Argpyrimidin und Tetrahydropyrimidin (THP) sind zwei MGO-Moleküle notwendig. Bei Methylglyoxal-Lysin-Dimer (MOLD) und *Methylglyoxal-derived-imidazoline-crosslink* (MODIC) handelt es sich um zwei Aminosäuren, die mit einem MGO-Molekül reagieren und dadurch miteinander verbunden werden. Abbildung erstellt mit Chem Draw nach Vistoli et al. (2013), Henning und Glomb (2016) und Sadowska-Bartosz und Bartosz (2016).

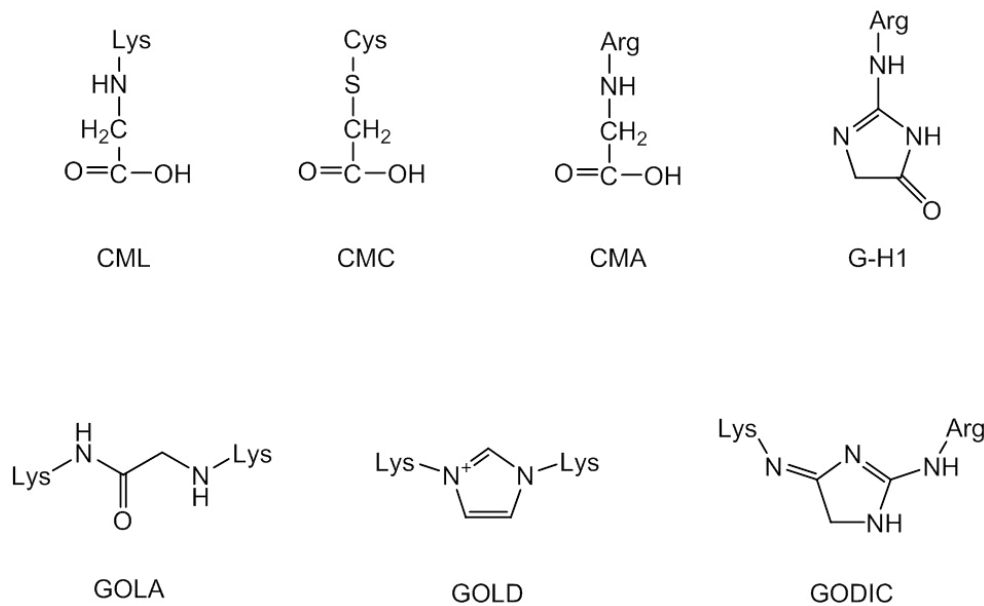


Abbildung 4: AGEs die aus GO entstehen können

Gezeigt sind einige AGEs, die aus der Reaktion von GO mit Arginin-, Lysin- oder Cystein-Seitenketten entstehen können. Die Reste der Aminosäuren sind aus Gründen der Übersicht mit Arg, Lys und Cys abgekürzt. Carboxymethyllysine (CML), Carboxymethylcystein (CMC), Carboxymethylarginin (CMA), und *Glyoxal-derived Hydroimidazolone* (G-H1) entstehen bei der Reaktion eines GO-Moleküls mit der entsprechenden Aminosäure. Bei Glyoxal-Lysine-Amide (GOLA), Glyoxal-Lysin-Dimer (GOLD) und *Glyoxal-derived-imidazoline-crosslink* (GODIC) handelt es sich um zwei Aminosäuren, die mit einem GO-Molekül reagieren und dadurch miteinander verbunden werden. Abbildung erstellt mit Chem Draw nach Vistoli et al. (2013), Henning und Glomb (2016) und Sadowska-Bartosz und Bartosz (2016).

Eine Anreicherung von hochreaktiven Dicarboxyl-Verbindungen ist schädlich für Zellen, da es zu einer vermehrten Glykierung kommen kann. Deshalb müssen diese entstehenden Verbindungen wieder abgebaut werden. Dies geschieht mit Hilfe des Glyoxalase-Systems, welches aus zwei Enzymen, Glyoxalase I (EC: 4.4.1.5) und Glyoxalase II (EC: 3.1.2.6), besteht. Diese beiden Enzyme, welche im Zytoplasma und den Mitochondrien lokalisiert sind, kommen in allen Geweben eukaryotischer Zellen vor. Glutathion dient dabei als Co-Faktor und reagiert mit den Dicarboxyl-Verbindungen, sodass ein Hemiacetal entsteht. Durch die Glyoxalase I wird dann daraus ein S-2-Hydroxyacyl-Glutathione-Derivat gebildet. Die Glyoxalase II wandelt dann dieses Derivat wieder in Glutathion um, wobei eine Hydroxycarbonsäure entsteht. MGO wird so beispielsweise in Laktat umgewandelt (Thornalley 1990). Eine erhöhte Ansammlung von Dicarboxyl-Verbindungen wird auch als Dicarboxyl-Stress bezeichnet. Dies geschieht, wenn viel mehr Dicarboxyl-Verbindungen gebildet werden als die Zelle abbauen kann, beispielsweise bei erhöhtem Glukose-Metabolismus. Außerdem kann eine reduzierte Expression der Glyoxalase I und II sowie eine verringerte Menge des Co-Faktors Glutathion für Dicarboxyl-Stress sorgen. Entstehende Dicarboxyl-Verbindungen können dann schlechter abgebaut werden (Rabbani et al. 2016).

1.1.3 Glykierung und Dicarbonyl-Stress im Alter und bei altersbedingten Erkrankungen

Im Alter kommt es zu einer Verringerung von physiologischen Funktionen. Auf zellulärer Ebene sind eine Veränderung der Protein-Homöostase, eine schlechtere intrazelluläre Kommunikation, die Ansammlung von DNA-Schäden, mitochondriale Dysfunktionen und verschiedene epigenetische Veränderungen zu beobachten. Außerdem kommt es zu einer Akkumulation von seneszenten Zellen, die ihre Fähigkeit zu proliferieren verloren haben. All diese Veränderungen sorgen für ein erhöhtes Risiko von kardiovaskulären Erkrankungen, Typ-2 Diabetes, neurodegenerativen Erkrankungen und Krebs (López-Otín et al. 2013). Im Alter kommt es zudem zu einer reduzierten Expression der Glyoxalase I, was zu Dicarbonyl-Stress und einer vermehrten Entstehung und Akkumulation von AGEs führt (Xue et al. 2011). Auch in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) konnte mit steigendem Alter eine Reduzierung der orthologen Glyoxalase I und ein erhöhtes AGE-Level nachgewiesen werden. Außerdem wirkte sich die Expression direkt auf die Lebenserwartung aus. So sorgte ein *knockdown* der Glyoxalase I für eine Verringerung, eine Überexpression hingegen für eine Verlängerung der Lebensspanne (Morcos et al. 2008). Die vermehrte Glykierung im Alter kann direkt mit den zellulären Dysfunktionen in Verbindung gebracht werden. So kann die Glykierung von mitochondrialen Proteinen deren Funktion reduzieren und für oxidativen Stress sorgen. Allgemein kann die Protein-Glykierung zu einer geringeren Proteolyse führen, was die Protein-Homöostase beeinträchtigt. Glykierung der DNA kann DNA-Schäden und epigenetische Veränderungen zur Folge haben (Nigro et al. 2019). Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation mit MGO und GO für Seneszenz in vaskulären Endothelzellen sorgen kann (Navarrete Santos et al. 2017). Somit sind Dicarbonyl-Stress und Glykierung nicht nur eine Konsequenz von altersbedingten zellulären Veränderungen, sondern tragen auch maßgeblich zu diesen bei. Ein gesundes Altern hängt deshalb auch damit zusammen, wie gut der Körper Dicarbonyl-Verbindungen abbauen kann (Nigro et al. 2019).

Glykierung und Dicarbonyl-Stress spielen auch bei vielen altersbedingten Krankheiten eine entscheidende Rolle, wie z.B. bei Typ-2 Diabetes. Diese Erkrankung zeichnet sich durch eine chronische Hyperglykämie aus. Durch die erhöhte Menge an Glukose werden mehr Dicarbonyl-Verbindungen gebildet (Brownlee 2001). Es kommt daher zu Dicarbonyl-Stress, wodurch im Plasma sowie im Speichel von Patienten mit Typ-2 Diabetes eine erhöhte Menge an MGO und GO nachgewiesen werden konnte (Lapolla et al. 2005; Kong et al. 2014; Wang et al. 2019). Die vermehrte Bildung von hochreaktiven Dicarbonyl-Verbindungen resultiert in erhöhten AGE-Konzentrationen (Ono et al. 1998). So kommt es beispielsweise zu einem erhöhten Auftreten von glykiertem Hämoglobin (HbA1c), welches auch zur Diagnose und Verlaufskontrolle von Diabetes genutzt werden kann (World Health Organization 2011). Die direkte Verbindung von Hyperglykämie und erhöhter AGE-Bildung

konnte auch in Zellkultur-Experimenten bestätigt werden. Dazu wurden Endothelzellen mit hohen (30 mM) und niedrigen (5 mM) Glukose-Konzentrationen inkubiert. Eine Inkubation mit 30 mM Glukose hatte einen starken Anstieg der intrazellulären Glukosekonzentration zur Folge. Dies führte dazu, dass mehr AGEs gebildet wurden (Giardino et al. 1994). Auch kardiovaskulären Erkrankungen hängen mit Glykierung zusammen. In einer Genom-Studie mit über 90.000 Patienten konnte gezeigt werden, dass Defizite im Gen der Glyoxalase I mit dem Auftreten der koronaren Herzkrankheit assoziiert sind (Mäkinen et al. 2014). In Maus-Versuchen konnte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen Glykierung und kardiovaskulären Erkrankungen gezeigt werden. So sorgte eine Inhibierung der Glyoxalase I oder eine externe Zufuhr von MGO in Mäusen für die Entstehung von Atherosklerose (Tikellis et al. 2014). Bei Adipositas kommt es ebenfalls zu einer verringerten Aktivität des Glyoxalase-Systems (Rabbani und Thornalley 2019). Die Folge sind eine erhöhte Menge an MGO, welche wiederum zu Dicarbonyl-Stress führt (Masania et al. 2016).

1.1.4 Auswirkungen von Glykierung und Dicarbonyl-Stress auf das Immunsystem

Dicarbonyl-Stress und Glykierung haben auch einen Einfluss auf verschiedene Bereiche des Immunsystems. So können beispielsweise Antikörpern vom Typ IgG glykiert werden, die mit einer Halblebenszeit von über 20 Tagen relativ lange im Körper verbleiben (Goetze et al. 2012). Es konnte gezeigt werden, dass eine Glykierung die Bindung eines Antikörpers an sein Antigen reduzieren kann (Mo et al. 2018). Außerdem kann eine Glykierung die Bindung von anderen Molekülen, wie dem C1-Komplex des Komplementsystems, an die Fc-Region (*Fragment crystallizable Region*) des Antikörpers reduzieren (Dolhofer-Bliesener und Gerbitz 1990). Des Weiteren können vom Körper auch Autoantikörper gegen verschiedene AGE-Strukturen gebildet werden, über deren Einfluss allerdings noch wenig bekannt ist (Turk et al. 2001).

AGEs können auch direkt auf die Immunzellen wirken. Werden die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs, von engl. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) mit AGEs inkubiert, so findet eine erhöhte Produktion der proinflammatorischen Zytokine Interferon- γ (INF- γ) und *Tumor Necrosis Factor α* (TNF- α) statt. Außerdem werden durch die AGEs bestimmte Adhäsionsmoleküle in Makrophagen vermehrt exprimiert (Takahashi et al. 2009). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung von murinen Makrophagen mit AGEs zu einer verminderten Immunantwort führte. Zudem war die Polarisation der Makrophagen nach AGE-Behandlung eingeschränkt. All diese Effekte waren unabhängig von der Aktivierung von RAGE (Son et al. 2017). Auch eine direkte Inkubation von Makrophagen mit MGO wurde bereits untersucht. Diese sorgt für eine Glykierung der Zellen und resultiert in einer erhöhten Expression von proinflammatorischen Zytokinen. Eine reine

Inkubation mit AGEs hatte hingegen keine erhöhte Expression dieser Zytokine zur Folge. Außerdem war die Phagozytose bei glykierten Zellen eingeschränkt (Bezold et al. 2019). In Mäusen, denen in regelmäßigen Abständen MGO verabreicht wurde, war ebenfalls eine erhöhte Expression von proinflammatorischen Zytokinen zu beobachten (Bhattacharyya et al. 2008).

Glykierung kann zudem einen Einfluss auf die Funktion von neutrophilen Granulozyten haben. Dicarbonyl-Stress, ausgelöst durch eine Inkubation mit Glukose und MGO, sorgt für eine Reduzierung der Phagozytose (Guerra et al. 2012). Auch die Zelladhäsion der neutrophilen Granulozyten kann von Dicarbonyl-Stress beeinflusst werden. So wurde nach einer Behandlung mit AGEs oder MGO das Zelladhäsionsmolekül CD11b vermehrt exprimiert. Dies resultierte in einer erhöhten Bildung von Konjugaten aus Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten, was möglicherweise das erhöhte Thromboserisiko im Alter und bei Typ-2 Diabetes erklären könnte (Gawlowski et al. 2007).

Für die korrekte Funktion des Immunsystems sind das Zusammenspiel und die Kommunikation zwischen verschiedenen Zellarten von entscheidender Bedeutung. Bei Versuchen von Price et al. (2004) wurden dendritische Zellen mit MGO-modifizierten Peptiden inkubiert. Durch diese Behandlung war ihre Fähigkeit, T-Zellen zur Proliferation anzuregen, stark reduziert. Weitere Experimente konnten außerdem zeigen, dass auch eine direkte Inkubation mit MGO einen negativen Einfluss auf die Funktion von T-Zellen und dendritischen Zellen hatte (Price et al. 2010). AGE-modifizierte Matrix-Proteine können zudem die Migration und Zell-Matrix-Interaktion von T-Zellen reduzieren (Haucke et al. 2014).

Im Alter und bei Krankheiten, die vermehrt im Alter auftreten, wie z.B. Typ-2-Diabetes, konnte eine Reduzierung der Immunfunktionen festgestellt werden, was zu verschiedenen Komplikationen führt (Weiskopf et al. 2009; Zhou et al. 2018). Glykierung und Dicarbonyl-Stress beeinflussen unterschiedliche Zellen des Immunsystems und sind ein Faktor, der zu dieser reduzierten Immunaktivität beiträgt (Price und Knight 2009). Aufgrund der Komplexität des Immunsystems ist bei vielen Zellarten und Mechanismen jedoch noch unklar, ob und inwieweit diese durch Glykierung beeinflusst werden.

1.2 Sialinsäuren

Sialinsäuren sind eine Familie von Monosachariden. Es handelt sich um Ketozucker mit einem Grundgerüst aus neun C-Atomen (Abbildung 5 A). Der Name leitet sich von *sialos* dem griechischen Wort für Speichel ab, da Sialinsäuren unter anderem in den Mucinen im Speichel entdeckt wurden. Sialinsäuren finden sich meist als endständige Zucker in N- und O-Glykanen sowie in Glykosphingolipiden. In diesen Glykanstrukturen sind Sialinsäuren meist mittels α 2,3- oder α 2,6-glykosidischer Bindung mit Galaktose (Gal) oder N-Acetylgalaktosamin (GalNAc) verknüpft. Außerdem kann über eine α 2,8-glykosidische Bindung eine Verknüpfung mit einer weiteren Sialinsäure hergestellt werden, wodurch sich Di- und Polysialinsäure-Strukturen bilden können (Varki und Schauer 2009). Im menschlichen Organismus wird, abgesehen von einigen Tumorentitäten, fast ausschließlich N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) gebildet (Abbildung 5 B) (Wang und Brand-Miller 2003).

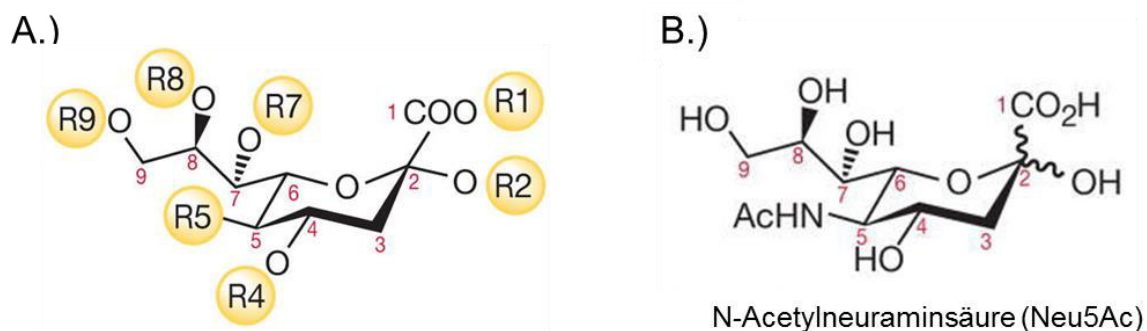


Abbildung 5: Struktur der Sialinsäuren

Das Grundgerüst der Sialinsäuren besteht aus 9 C-Atomen. Über R2 erfolgt die Bindung an andere Zucker, wie Galaktose oder N-Acetylgalaktosamin. Über R8 kann eine Verbindung mit weiteren Sialinsäuren hergestellt werden (A.). Im Menschen kommt fast ausschließlich die N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) vor (B.). Abbildung verändert nach Varki und Schauer (2009).

Als endständige Zucker sind Sialinsäuren an der Außenseite der Zelle lokalisiert und sind wichtig für die Adhäsion und die Zell-Zell-Interaktion (Varki 2007). Sialinsäuren stellen außerdem ein wichtiges Erkennungsmerkmal von körpereigenen Zellen durch das Immunsystem dar. Eine verstärkte Sialylierung von Tumorzellen und Pathogenen kann deshalb dafür sorgen, dass diese schlechter vom Immunsystem erkannt und beseitigt werden können. Des Weiteren nutzen verschiedene Viren Sialinsäuren zur Bindung an entsprechende Wirtszellen (Lübbers et al. 2018). Sialinsäuren spielen zudem bei der Entwicklung des Gehirns und bei der Neuroplastizität eine entscheidende Rolle (Wang 2012).

Die im Menschen vorkommende Sialinsäure Neu5Ac wird aus Uridindiphosphat-N-Acetylglukosamin (UDP-GlcNAc) synthetisiert, welches während der Hexosamin-Biosynthese

gebildet wird (Hinderlich et al. 2015). Der Biosyntheseweg ist in Abbildung 6 dargestellt. Das entstandene Produkt Neu5Ac reagiert dann im Nucleus mit Cytidintriphosphat, wobei Cytidinmonophosphat(CMP)-Neu5Ac entsteht. Diese Reaktion wird von der CMP-Neu5Ac-Synthetase (EC 2.7.7.43) katalysiert (Münster-Kühnel et al. 2004). CMP-Neu5Ac gelangt dann wieder ins Zytosol und wird mit Hilfe von spezifischen Transporter-Proteinen in den Golgi transportiert, wo es als Substrat für verschiedene Sialyltransferasen dient (Nji et al. 2019).

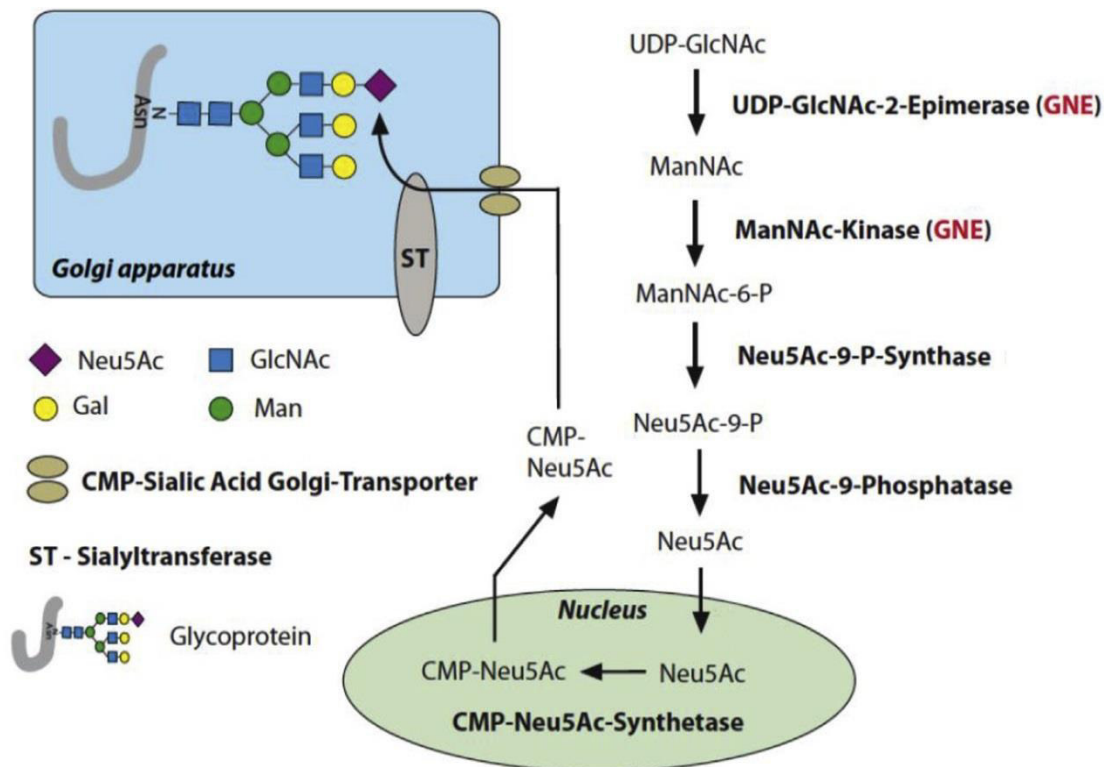


Abbildung 6: Biosynthese der Sialinsäuren

Uridindiphosphat-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) wird im Zytosol in vier Schritten zu N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) umgewandelt. Die UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase / N acetylmannosamine kinase (GNE; EC 3.2.1.183, EC 2.7.1.60) katalysiert die Bildung von N-Acetylmannosamin (ManNAc) und die anschließende Phosphorylierung, die zur Entstehung von ManNAc-6-P führt. Mit Hilfe der Neu5Ac-9-P-Synthase (EC 2.5.1.57) wird im weiteren Verlauf phosphorylierte N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac-9-P) gebildet. Die Neu5Ac-9-Phosphatase (EC 3.1.3.29) sorgt dann für eine Dephosphorylierung, die zur Entstehung von Neu5Ac führt. Anschließend erfolgt im Nucleus die Synthese von Cytidinmonophosphat(CMP)-Neu5Ac, welches dann in den Golgi gelangt, wo es als Substrat für verschiedene Sialyltransferasen (ST) dienen kann. Diese ST sorgen dann für die Verknüpfung mit verschiedenen Glykanstrukturen. Abbildung verändert nach Bork et al. (2017).

1.2.1 Sialyltransferasen

Sialyltransferasen sind spezielle Glykosyltransferasen, die den Transfer von CMP-verknüpften Sialinsäuren auf verschiedene Oligosaccharide katalysieren. Insgesamt gibt es 20 verschiedene humane Sialyltransferasen, die sich in vier Gruppen einteilen lassen. Die α 2,8-Sialyltransferasen (ST8Sia; EC 2.4.99.8) katalysieren die Verknüpfung von Neu5Ac mit anderen Sialinsäuren mittels α 2,8-glykosidischer Bindung. Die GalNAc α 2,6-

Sialyltransferasen (STGalNAc6; EC 2.4.99.3) sind für den Transfer von Neu5Ac auf GalNAc mittels α 2,6-glykosidischer Bindung zuständig. Außerdem existieren noch die β -Galaktosid α 2,6- und β -Galaktosid α 2,3-Sialyltransferasen (ST6Gal, EC 2.4.99.1; ST3Gal, EC 2.4.99.4), die die Verknüpfung von Neu5Ac mit Galaktose (Gal) mittels α 2,6- und α 2,3- glykosidischer Bindung katalysieren (Abbildung 7; Harduin-Lepers et al. 2012).

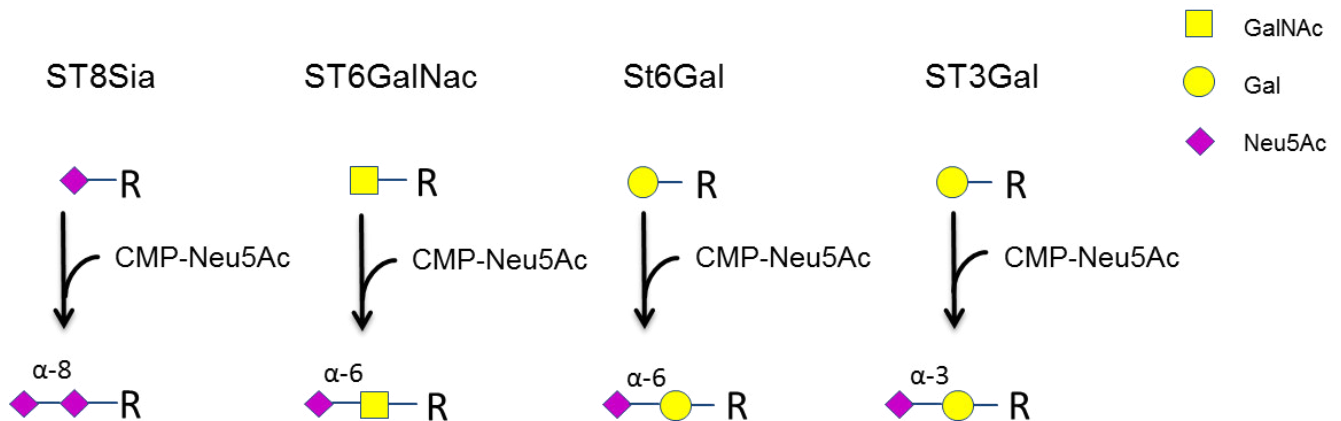


Abbildung 7: Gruppen der humanen Sialyltransferasen

Es existieren vier Gruppen von humanen Sialyltransferasen, die den Transfer von N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) auf verschiedene Glykane katalysieren (vereinfachte Darstellung). Als Substrat dient dabei Cytidinmonophosphat(CMP)-Neu5Ac, welches mit weiteren Neu5Ac-Molekülen, Galaktose (Gal) oder N-Acetylgalaktosamin (GalNAc) verknüpft wird. α 2,8-Sialyltransferasen (ST8Sia) sorgen für die Verknüpfung zweier Neu5Ac-Moleküle mittels α 2,8-glykosidischer Bindung. Die GalNAc α 2,6-Sialyltransferasen (STGalNAc6) verknüpfen Neu5Ac mit GalNAc über eine α 2,6-glykosidische Bindung. β Galaktosid α 2,6- (ST6Gal) und β -Galaktoside α 2,3-Sialyltransferasen (ST3Gal) katalysieren die Reaktion von Neu5Ac mit Gal, sodass α 2,3- und α 2,6-glykosidische Bindungen entstehen. Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint.

Obwohl mehrere Sialyltransferasen die gleiche Reaktion zwischen zwei Kohlenhydraten katalysieren, haben die Sialyltransferasen zum Teil unterschiedliche Funktionen, da sie mit Glykanen von unterschiedlichen Substraten reagieren können. So existieren zum Beispiel sechs verschiedene α 2,8-Sialyltransferasen (ST8Sia I-VI). ST8Sia I und ST8Sia V erkennen vor allem Glykane auf Gangliosiden als Substrat (Sasaki et al. 1994; Kim et al. 1997). ST8Sia VI hingegen bindet bevorzugt an O-Glykane (Takashima et al. 2002a). Eine Besonderheit stellen außerdem ST8Sia II und ST8Sia IV dar, die fast ausschließlich für die Synthese von Polysialinsäure (polySia) auf dem Neuralen Zelladhäsion Molekül (NCAM, von engl. *Neural Cell Adhesion Molecule*) zuständig sind (Mori et al. 2017).

Die Sialyltransferasen zeigen, je nach Zell- und Gewebe-Typ, sehr starke Unterschiede in ihrer Expression (Kitagawa und Paulson 1994; Harduin-Lepers et al. 2001).

Die Gene der Sialyltransferasen sind nicht alle in einer bestimmten Region oder einem Gen-Komplex auf einem einzelnen Chromosom zu finden, sondern verteilen sich auf verschiedene Chromosomen. In Säugetieren sind diese Gene sehr stark konserviert, sodass

beispielsweise auch in Mäusen, analog zum Menschen, 20 verschiedene Sialyltransferasen exprimiert werden (Harduin-Lepers 2010). Die humanen Sialyltransferasen und ihre Substrate sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Humane Sialyltransferasen (Daten aus Takashima et al. (2002b))

| Protein | Aminosäuren | Gen | Chromosom | Substrat |
|---------------|-------------|-------------------|-----------|--|
| ST8Sia I | 356 | <i>ST8SIA1</i> | 12 | GM3 |
| ST8Sia II | 375 | <i>ST8SIA2</i> | 15 | N-glykan on NCAM |
| ST8Sia III | 380 | <i>ST8SIA3</i> | 18 | NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc- |
| ST8Sia IV | 359 | <i>ST8SIA4</i> | 5 | N-glykan on NCAM |
| ST8Sia V | 376 | <i>ST8SIA5</i> | 18 | GM1b, GT1b, GD1a, GD3 |
| ST8Sia VI | 398 | <i>ST8SIA6</i> | 10 | NeuAc α 2,3(6)Gal- |
| ST6GalNAc I | 600 | <i>ST6GALNAC1</i> | 17 | GalNAc α 1,O-Ser/Thr |
| ST6GalNAc II | 374 | <i>ST6GALNAC2</i> | 17 | Gal β 1,3GalNAc α 1,O-Ser/Thr |
| ST6GalNAc III | 305 | <i>ST6GALNAC3</i> | 1 | NeuAc α 2,3Gal β 1,3GalNAc-(Lipid)* |
| ST6GalNAc IV | 302 | <i>ST6GALNAC4</i> | 9 | NeuAc α 2,3Gal β 1,3GalNAc-(Protein)* |
| ST6GalNAc V | 336 | <i>ST6GALNAC5</i> | 1 | GM1b |
| ST6GalNAc VI | 299 | <i>ST6GALNAC6</i> | 9 | GM1b, GT1b, GD1a |
| ST6Gal I | 406 | <i>ST6GAL1</i> | 3 | Gal β 1,4GlcNAc- |
| ST6Gal II | 529 | <i>ST6GAL2</i> | 2 | Gal β 1,4GlcNAc- |
| ST3Gal I | 340 | <i>ST3GAL1</i> | 8 | Gal β 1,3GalNAc-(Protein)* |
| ST3Gal II | 350 | <i>ST3GAL2</i> | 16 | Gal β 1,3GalNAc-(Lipid)* |
| ST3Gal III | 375 | <i>ST3GAL3</i> | 1 | Gal β 1,3(4)GlcNAc- |
| ST3Gal IV | 329 | <i>ST3GAL4</i> | 11 | Gal β 1,4(3)GlcNAc- |
| ST3Gal V | 362 | <i>ST3GAL5</i> | 2 | Lac-Cer |
| ST3Gal VI | 331 | <i>ST3GAL6</i> | 3 | Gal β 1,4GlcNAc- |

*bevorzugtes aber nicht spezifisches Substrat

Lac-Cer (Lactosylceramid), GM (Monosialo-Gangliosid), GD (Disialo-Gangliosid), GT (Trisialo-Gangliosid)

1.3 Natürliche Killer-Zellen

Bei Natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) handelt es sich um Zellen des angeborenen Immunsystems. NK-Zellen sind große granuläre Lymphozyten, die in der Lage sind, veränderte Zellen, wie virusinfizierte Zellen und Tumorzellen zu erkennen und zu lysieren. Außerdem produzieren sie verschiedene Zytokine, um die Funktion anderer Immunzellen zu regulieren. Die Detektion von veränderten Zellen geschieht ohne die Erkennung spezifische Antigene. Ungefähr 10-15 % der humanen Lymphozyten im peripheren Blut sind NK-Zellen. Humane NK-Zellen zeichnen sich generell dadurch aus, dass sie den Oberflächenmarker CD56 exprimieren, jedoch nicht den Marker CD3 (Farag und Caligiuri 2006). CD56 ist eine andere Bezeichnung für NCAM. Basierend auf der Expression von CD56 werden NK-Zellen meist in zwei Populationen eingeteilt. Zellen mit einer hohen CD56-Expression, sogenannte CD56^{bright} NK-Zellen, machen ca. 10 % der gesamten NK-Zellen aus. Diese Zellen produzieren vermehrt Zytokine, wie INF- γ , *Tumor Necrosis Factor β* (TNF- β), Interleukin-10 (IL-10), Interleukin-13 (IL-13) oder *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor* (GM-CSF). Ca. 90 % der NK-Zellen sind sogenannte CD56^{dim} NK-Zellen, mit einer geringeren CD56-Expression. Sie zeichnen sich durch eine höhere zytotoxische Aktivität im natürlichen Zustand aus. Zudem gibt es weitere Unterschiede in der Rezeptor-Expression (Cooper et al. 2001). NK-Zellen entstehen aus lymphatischen Vorläuferzellen im Knochenmark und reifen dort oder in sekundären lymphatischen Organen heran (Abel et al. 2018). Mit ihrer Fähigkeit entartete Zellen zu lysieren, stellen NK-Zellen einen der wichtigsten Zelltypen bei der Tumorbekämpfung dar. Eine niedrige NK-Zell-Aktivität ist deshalb mit einem erhöhten Krebsrisiko assoziiert (Imai et al. 2000). Auch Defekte in den Genen von NK-Zellen können zu einem erhöhten Risiko beitragen, an Krebs zu erkranken (Xu et al. 2019). Außerdem hängt auch der Erfolg von Krebstherapien maßgeblich mit der NK-Zell-Aktivität der Patienten zusammen (Hansen et al. 2019).

1.3.1 Rezeptoren auf NK-Zellen

Wie genau die NK-Zellen veränderte von normalen körpereigenen Zellen unterscheiden, war lange Zeit nicht bekannt. Den Grundstein zur Erklärung der NK-Zell-Funktion stellt die *Missing-self*-Hypothese von Klas Kärre dar. Anders als T-Zellen, bei denen eine einzelne Zelle ein spezifisches Antigen erkennt, erkennen NK-Zellen das Fehlen von bestimmten Liganden, die auf gesunden Zellen vorkommen. Beobachtet wurde dies besonders bei Tumoren, die keine oder veränderte *Major Histocompatibility Complex I* (MHC-1)-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimierten und von NK-Zellen lysiert wurden (Ljunggren und Kärre 1990). Allgemein erfolgt die Erkennung von Zellen durch verschiedene Oberflächen-Rezeptoren auf NK-Zellen. Diese lassen sich grob in zwei Arten, aktivierende und inhibierenden Rezeptoren, einteilen. Aktivierende Rezeptoren haben meist eine kurze

zytoplasmatische Domäne und eine basische Aminosäure in der Transmembran-Region. Über diese Aminosäure sind die Rezeptoren mit Adapter-Molekülen wie z.B. *DNAX-activation protein 10* (DAP10) oder DAP12 verbunden, die für die Signaltransduktion sorgen. Bei einer Bindung an einen Liganden werden durch diese Moleküle verschiedene Kinasen aktiviert, die dann zu einer Aktivierung der NK-Zelle führen. Im Gegensatz dazu haben inhibierende Rezeptoren eine lange zytoplasmatische Domäne mit einem sogenannten *Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory Motif* (ITIM), das einen Tyrosin-Rest enthält. Bindet ein Ligand an einen inhibierenden Rezeptor, wird dieser Tyrosin-Rest phosphoryliert, und stellt dann eine Bindungsstelle für eine Phosphatase dar. Die Phosphatase kann dann dem Signal der Kinasen entgegenwirken. Dies geschieht allerdings nur, wenn aktivierende und inhibierende Rezeptoren in räumlicher Nähe zueinander stehen (Srivastava et al. 2003).

Solange mehr inhibierende als aktivierende Rezeptoren einen Liganden gebunden haben, bleibt die NK-Zelle inaktiv (Abbildung 8 A). Verliert eine Zelle ihre inhibierenden Liganden, sind mehr Liganden für die aktivierenden als für inhibierenden Rezeptoren vorhanden, wodurch es zu einer Aktivierung der NK-Zelle kommt (Abbildung 8 B). Werden aufgrund von zellulärem Stress mehr aktivierende Liganden produziert, kommt es ebenfalls zu einer Aktivierung der NK-Zellen (Abbildung 8 C). Die meisten inhibierenden Rezeptoren binden MHC-1 Moleküle und sind entweder sogenannte *Killer-Cell Immunoglobulin-like Receptors* (KIRs) oder gehören zur Familie der C-Typ-Lektine (Biassoni et al. 2001). Zusätzlich gibt es unterschiedliche aktivierende Rezeptoren wie die *Natural Cytotoxic Receptors* NKp30, NKp44 und NKp46, von denen viele Liganden noch unbekannt sind (Konjević et al. 2017). Beim aktivierenden Rezeptor NKG2D sind hingegen mehrere Liganden bekannt. Diese Liganden werden in verschiedenen Stresssituationen, wie bei DNA-Schäden, Hitzeschock oder erhöhter Proliferation, vermehrt exprimiert und sorgen so für eine Erkennung durch NK-Zellen (Zingoni et al. 2018). Einen weiteren wichtigen Mechanismus zur Erkennung von veränderten Zellen stellt die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC, von engl. *Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity*) dar. NK-Zellen besitzen Fc-Rezeptoren, wie beispielsweise CD16, die an die Fc-Region von Antikörpern binden können. Sind Antikörper an Tumorzellen oder virusinfizierte Zellen gebunden, können NK-Zellen diese Zellen durch ihre Fc-Rezeptoren erkennen und lysieren. Mit der Hilfe von monoklonalen tumorspezifischen Antikörpern könnte dieser Mechanismus auch ein wichtiges Hilfsmittel bei der Krebstherapie darstellen (Wang et al. 2015).

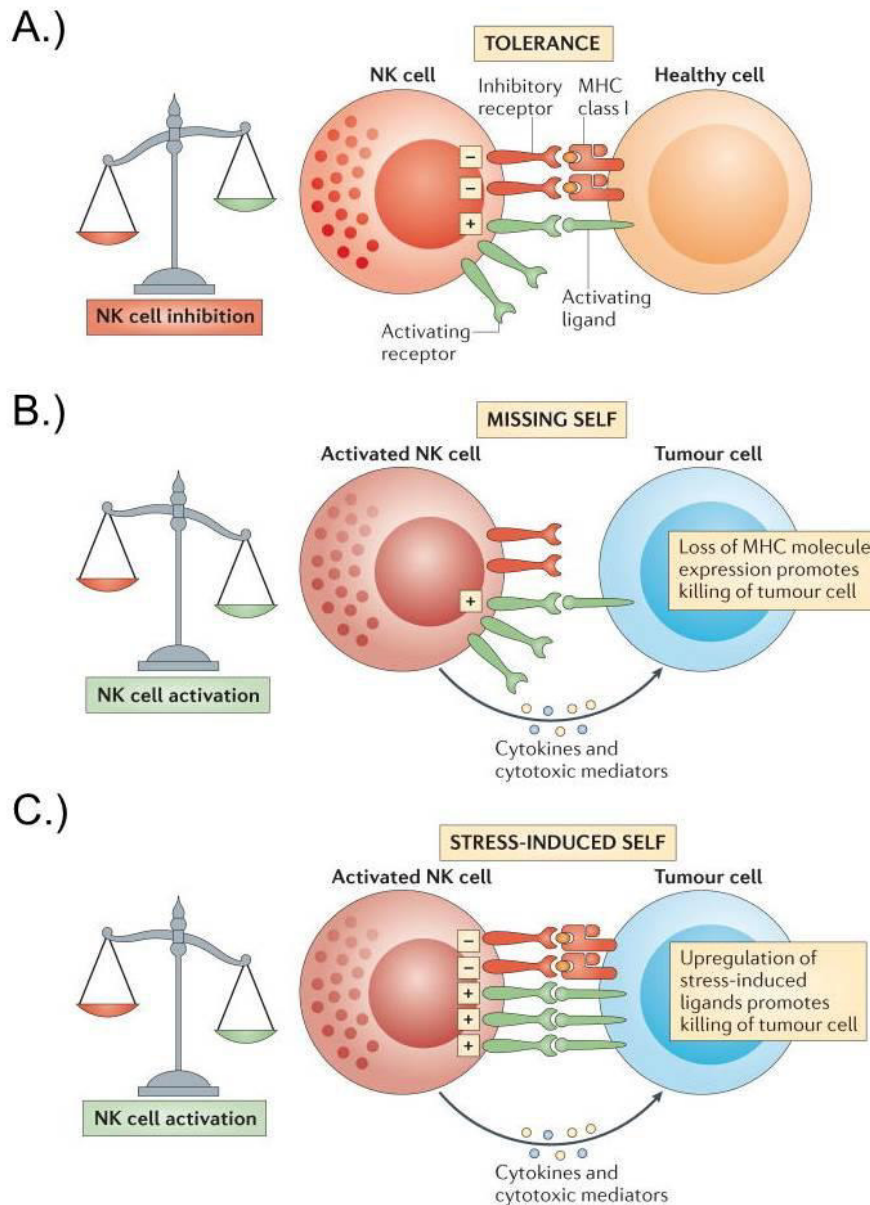


Abbildung 8: Erkennung von Zellen durch NK-Zellen

Gesunde Zellen exprimieren mehr Liganden für inhibierende als für aktivierende Rezeptoren und werden deshalb nicht von NK-Zellen lysiert (A.). Bei einer Zelle, die weniger inhibierende Liganden exprimiert, überwiegt das aktivierende Signal. Es kommt zu einer Aktivierung der NK-Zelle und die Zielzelle wird lysiert (B.). Eine vermehrte Expression von aktivierenden Liganden führt ebenfalls zu einer Aktivierung der NK-Zelle und einer Lyse der Zielzelle (C.). Abbildung aus Vivier et al. (2012)

1.3.2 Lyse von Zielzellen durch NK-Zellen

Die Erkennung und Lyse von veränderten Zellen stellt einen komplexen Mechanismus dar. Zunächst wird eine sogenannte immunologische Synapse zwischen NK-Zelle und Zielzelle gebildet (Orange 2008). Kommt es nach dem ersten Kontakt zu einer Aktivierung der NK-Zelle, sammeln sich verschiedene Adhäsions-Moleküle der NK-Zelle, z.B. *Lymphocyte Function-Associated Antigen 1* (LFA-1), *Macrophage-1 Antigen* oder CD2, an der Synapse.

Diese binden dann an entsprechende Liganden auf den Zielzellen und sorgen somit für eine stärkere Zell-Zell-Verbindung. Dies löst eine Polymerisierung von Aktin aus, was in einer Veränderung des Zytoskeletts resultiert (Abbildung 9 A). Des Weiteren kommt es zu einer Polymerisierung des Mikrotubuli-organisierendes Zentrums (MTOC, von engl. *Microtubule Organizing Center*) an der immunologischen Synapse. Sekretorische Lysosomen, auch lytische Granula genannt, werden dann entlang der Mikrotubuli zur Synapse transportiert (Abbildung 9 B und C). Dort angekommen sorgen verschiedene *Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive-Factor Attachment Receptors* (SNAREs) dafür, dass die sekretorischen Lysosomen mit der Plasmamembran fusionieren und deren Inhalt in den Bereich zwischen NK-Zelle und Zielzelle freigesetzt wird (Abbildung 9 D). Es kommt zu einer Degranulierung der NK-Zelle (Topham und Hewitt 2009).

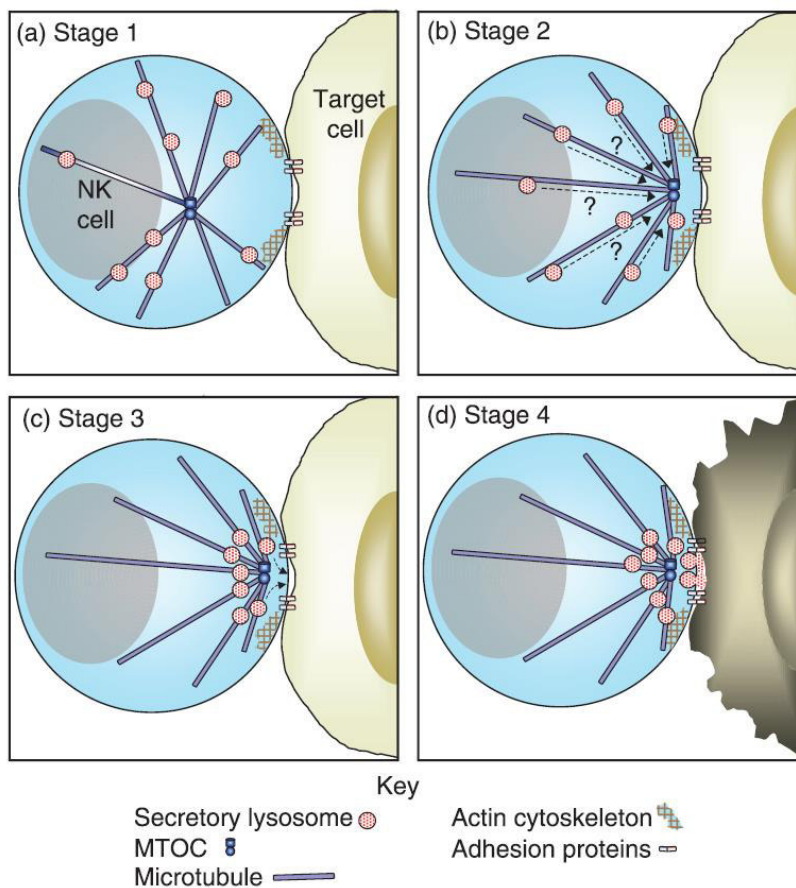


Abbildung 9: Degranulierung von NK-Zellen

Nach der Aktivierung der NK-Zelle binden Adhäsionsproteine an die Zielzelle. Es kommt zu einer Veränderung des Aktin-Zytoskeletts (a.). Das *Microtubule Organizing Center* (MTOC) verschiebt sich in Richtung der immunologischen Synapse. Sekretorische Lysosomen werden dann, entlang der Mikrotubuli, in Richtung der Synapse transportiert (b.). Anschließend werden die Lysosomen in die Nähe der Plasmamembran gebracht (c.). Dort fusionieren sie mit der Plasmamembran und setzen ihren Inhalt frei, was zur Lyse der Zielzelle führt (d.). Abbildung aus Topham und Hewitt (2009).

Die sekretorischen Lysosomen enthalten verschiedene Proteine, darunter Perforin, Granulysin und Granzyme. Perforin ist ein Protein, welches dafür sorgt, dass sich Poren in der Membran der Zielzelle bilden. Durch diese Poren können dann die Granzyme, spezielle Serin-Protease, in die Zelle eindringen und dort Apoptose auslösen. Granulysin sorgt für eine Schädigung der Membran der Zielzellen, was ebenfalls zur Apoptose führt (Krzewski und Coligan 2012). Ein weiterer Mechanismus zur Lyse von Zielzellen erfolgt über bestimmte Liganden, wie TNF- α , *Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand* (TRAIL) oder FAS-Ligand. Diese binden an Todes-Rezeptoren auf den Zielzellen und lösen so Apoptose aus (Chávez-Galán et al. 2009). Während TNF- α nur in löslicher Form vorkommt, werden TRAIL und FAS-Ligand auch membrangebunden exprimiert. Bei einer Aktivierung der NK-Zelle gelangen sie an die Oberfläche der Membran und können dort an die Rezeptoren der Zielzelle binden (Johnsen et al. 1999; Bryceson et al. 2005).

Trifft die NK-Zelle hingegen auf eine gesunde Zelle, überwiegen die inhibierenden Signale. Dadurch werden wichtige Schritte der Lyse, wie der Transport der sekretorischen Lysosomen zur immunologischen Synapse, inhibiert (Das und Long 2010). Außerdem sorgen die inhibierenden Signale auch für eine Destabilisierung der immunologischen Synapse und einer verringerten Adhäsion (Abeyweera et al. 2013). Die Zellen dissoziieren dann, ohne dass die Zielzelle lysiert wird.

1.3.3 Humane NK-Zelllinien

Humane NK-Zellen können mittels magnetischer Zellseparation oder Zellsortierung mit Hilfe der Durchflusszytometrie aus Blut von Patienten isoliert werden. Die NK-Zellen von verschiedenen Spendern können allerdings starke Unterschiede aufweisen, je nach Geschlecht, Alter und Gesundheitszustand des Spenders (Almeida-Oliveira et al. 2011; Al-Attar et al. 2016; Viel et al. 2017). Für viele Versuche wird deshalb auf humane NK-Zelllinien zurückgegriffen. Eine häufig genutzte Zelllinie ist NK-92 mit der auch die meisten Versuche in dieser Arbeit durchgeführt wurden. Es handelt sich hierbei um NK-Zellen, die einem 50-jährigen Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphom, bei dem große granuläre Lymphozyten betroffen waren, entnommen wurden. Die Zelllinie braucht das Zytokin Interleukin-2 (IL-2) um zu proliferieren und zytotoxisch aktiv zu sein (Gong et al. 1994; Törnroos et al. 2019). NK-92-Zellen zeigen typische Merkmale von humanen NK-Zellen, wie die Expression von CD56 bei gleichzeitiger Abwesenheit von CD3, die Expression unterschiedlicher aktivierender und inhibierender Rezeptoren, sowie die Fähigkeit, verschiedene Tumorzellen zu lysieren. Allerdings unterscheiden sich die Zellen auch von primären NK-Zellen zum Beispiel dadurch, dass sie keine CD16-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren (Maki et al. 2001). Aufgrund ihrer Fähigkeit Tumorzellen zu töten, werden NK-92-Zellen oft zur Untersuchung der NK-Zell-Funktionen eingesetzt. Außerdem lassen sich die Zellen einfacher

transfizieren, als primäre NK-Zellen, was sie auch für weitere Studien interessant macht. So wurden beispielsweise NK-92-Zellen hergestellt, die humanes IL-2 exprimieren und somit permanent, auch unabhängig von exogenem IL-2, proliferieren und zytotoxisch aktiv sind (Tam et al. 1999). NK-92 wurden auch bereits in der Tumorthherapie eingesetzt. Dafür wurden die Zellen bestrahlt und anschließend Patienten intravenös verabreicht, die sich im Endstadium ihrer Krebserkrankung befanden. Die Infusion mit NK-92-Zellen wurde von fast allen Patienten gut toleriert. Bei Patienten mit Lungenkarzinom zeigte sich außerdem in derselben Studie teilweise eine Reduzierung des Tumorwachstums (Tonn et al. 2013). In einem anderen Ansatz wurden NK-92-Zellen mit einem Vektor transfiziert, der für einen *Chimeric Antigen Receptor* (CAR) codiert. Dabei handelt es sich um einen Rezeptor, der ein spezielles Tumor-Antigen erkennt. *In vitro* und in einem Maus-Modell konnten die NK-92-Zellen so Tumorzellen lysieren, die sie sonst nicht erkannt hätten. Somit könnte man in Zukunft diese NK-92-Zellen möglicherweise dazu nutzen, Tumorzellen abzutöten, die nicht vom Immunsystem erkannt werden (Uherek et al. 2002).

Eine weitere humane NK-Zelllinie ist NKL, welche aus einem 62-jährigen Patienten stammt, der an einer Leukämie mit großen granulären Lymphozyten (LGL-Leukämie) erkrankt war. Auch diese Zelllinie proliferiert nur bei Stimulation mit IL-2 (Robertson et al. 1996). Auch wenn NKL-Zellen einige Merkmale mit primären Zellen gemein haben, so exprimieren sie, anders als primäre NK-Zellen, nicht den Oberflächenmarker CD56 und zeigen nahezu keine Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen (Matsuo und Drexler 2003). Die NK-Zelllinie KHYG-1 hingegen zeigt, wie auch NK-92, eine lytische Aktivität gegenüber Tumorzellen. Diese Zelllinie stammt aus einer 45-jährigen Patientin mit NK-Zell-Leukämie. Die Zellen exprimieren CD56, wohingegen CD3 nicht exprimiert wird. Außerdem existiert eine Punktmutation im *p53* Gen (Yagita et al. 2000). Darüber hinaus gibt es noch weitere humane NK-Zelllinien, wie NK-YS oder SNK-6. In den meisten Zellkultur-Versuchen wird jedoch entweder auf isolierte primäre NK-Zellen oder auf NK-92-Zellen zurückgegriffen. NK-92 ist sehr gut charakterisiert und zudem auch die einzige NK-Zelllinie, die in klinischen Studien getestet wurde (Klingemann et al. 2016).

1.3.4 Sialinsäuren auf NK-Zellen

Wie alle körpereigenen Zellen tragen auch NK-Zellen Sialinsäuren auf ihrer Oberfläche. Eine besondere Sialylierung findet sich auf CD56. Dieses Molekül ist polysialyliert, besitzt also eine lange Kette von Sialinsäure-Molekülen (polySia), die in α 2,8-glykosidischen Bindungen miteinander verknüpft sind. Die Polysialyltransferase ST8Sia IV sorgt für die Synthese von polySia auf NK-Zellen (Moebius et al. 2007). Die Subpopulationen der NK-Zellen haben zudem eine unterschiedliche Menge an Sialinsäuren auf ihrer Oberfläche. So konnte durch Verwendung eines sialinsäurebindenden Lektins mittels Durchflusszytometrie gezeigt

werden, dass CD56^{bright} NK-Zellen stärker sialyliert sind als CD56^{dim} NK-Zellen (Rosenstock et al. 2017).

NK-Zellen exprimieren außerdem sogenannte *Sialic Acid-binding Immunoglobulin-like Lectins* (Siglecs), spezielle Rezeptoren, die in der Lage sind Sialinsäuren zu binden. Siglec-7 ist ein inhibierender Rezeptor, der auf fast allen NK-Zellen vorkommt. Er bindet hauptsächlich α 2,8-verknüpfte Di-Sialinsäuren und verzweigte, α 2,6-verknüpfte Sialinsäuren, die z.B. auf verschiedenen Gangliosiden vorhanden sind (Yamaji et al. 2002). Siglec-9, ebenfalls ein inhibierender Rezeptor, wird hingegen nur von etwa der Hälfte der CD56^{dim} NK-Zellen exprimiert (Belisle et al. 2010). Der Rezeptor bindet vor allem Sialinsäuren in α 2,3- und α 2,6-glykosidischen Bindungen (Zhang et al. 2000). Da körpereigenen Zellen Sialinsäuren tragen, können mit Hilfe von Siglecs gesunde körpereigene Zellen von fremden oder entarteten Zellen unterschieden werden. Allerdings exprimieren auch viele Tumorzellen Liganden für Siglec-7 und Siglec-9 und sind somit in der Lage, der Detektion und Lyse durch NK-Zellen zu entkommen (Jandus et al. 2014). Siglecs binden nicht nur Sialinsäuren auf anderen Zellen (trans), sondern können auch an Sialinsäuren auf derselben Zelle (cis) binden. Eine solche Verbindung von Siglecs mit zelleigenen Sialinsäuren von Glykoproteinen oder Glykolipiden wird auch als Maskierung bezeichnet. Eine Maskierung reguliert möglicherweise die Aktivität des Rezeptors, da sie die Bindestelle blockiert. Siglec-7 ist mit einem bisher unbekanntem Liganden maskiert, der Sialinsäuren in einer α 2,8-glykosidische Bindung besitzt (Avril et al. 2006). Es wurde vermutet, dass polySia auf NCAM möglicherweise für die Maskierung verantwortlich ist, was sich jedoch nicht bestätigen konnte (Moebius et al. 2007). In Bezug auf NK-Zellen wurden Sialinsäuren vor allem als Liganden auf Tumorzellen untersucht, die von Siglecs auf den NK-Zellen gebunden werden können. Über die Funktion der Sialinsäuren und die Regulierung der Sialylierung auf NK-Zellen ist hingegen nur relativ wenig bekannt.

1.3.5 NK-Zellen im Alter und bei altersbedingten Erkrankungen

Ältere Personen leiden häufiger an Infektionskrankheiten und haben ein höheres Risiko an Krebs zu erkranken als jüngere Menschen. Einer der Gründe für dieses Phänomen ist eine reduzierte Aktivität des Immunsystems im Alter (Weiskopf et al. 2009). Auch die Anzahl und Funktion der NK-Zellen ist im Alter verändert. Insgesamt haben ältere Menschen mehr NK-Zellen als jüngere. Außerdem ändert sich das Verhältnis von CD56^{bright} zu CD56^{dim} NK-Zellen, sodass ältere Personen mehr CD56^{dim} NK-Zellen besitzen (Almeida-Oliveira et al. 2011). Auch wenn bei älteren Menschen mehr NK-Zellen vorhanden sind, so ist die lytische Aktivität der einzelnen NK-Zellen verringert (Di Lorenzo et al. 1999). Durch die höhere Menge an NK-Zellen ist die gesamte NK-Zell-Aktivität von jungen und alten Menschen allerdings vergleichbar. Bei Studien, die alle PBMCs als Effektor-Zellen verwendeten, zeigten

sich deshalb keine Unterschiede in der Aktivität. Wurden allerdings isolierte NK-Zellen verwendet, konnte die beschriebene Reduzierung der lytischen Aktivität der einzelnen NK-Zellen gemessen werden (zusammengefasst von Hazeldine und Lord (2013)). Auch eine Veränderung der Rezeptor-Expression auf NK-Zellen im Alter ist zu beobachten, zum Beispiel eine verringerte Expression der aktivierenden Rezeptoren NKp30, NKp46 und NKG2D (Almeida-Oliveira et al. 2011; Hayhoe et al. 2010). Die Expression von Granzymen und Perforin ändert sich hingegen im Alter nicht. Allerdings wird weniger Perforin in Richtung der immunologischen Synapse freigesetzt, was dann zu einer Reduzierung der Lyserate führt und einen möglichen Grund für die reduzierte Zytotoxizität darstellt (Hazeldine et al. 2012). Auch bei murinen NK-Zellen konnte eine verringerte Zytotoxizität mit zunehmendem Alter gezeigt werden. Außerdem war die Degranulierung der NK-Zellen im Alter eingeschränkt (Shehata et al. 2015).

Isoliert man PBMCs, so können diese in Kultur gebracht werden und die NK-Zellen durch Zugabe verschiedener Zytokine, wie IL-2, zur Proliferation angeregt werden. Man spricht von einer Expansion der primären NK-Zellen. Diese Expansion ist bei NK-Zellen von älteren Menschen reduziert, da mit zunehmendem Alter des Spenders die NK-Zellen langsamer proliferieren (Gounder et al. 2018). In einer anderen Veröffentlichung wurden NK-Zellen von alten und jungen Spendern mittels magnetischer Zellseparation aus PBMCs isoliert und mit IL-2 behandelt. Auch hier zeigten die NK-Zellen der älteren Spender eine deutlich schlechtere Proliferation. Zudem war die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 geringer als bei den Zellen von jüngeren Spendern (Borrego et al. 1999). In Versuchen von Zhang et al. (2007) wurden die NK-Zell-Produktion und Proliferation bei Menschen *in vivo* gemessen. Sowohl die Entstehung neuer NK-Zellen im Knochenmark, als auch die Proliferation vorhandener Zellen waren im Alter eingeschränkt. Es wurde deshalb vermutet, dass die erhöhte Anzahl von NK-Zellen im Alter durch langlebige NK-Zellen zustande kommt, die allerdings nicht mehr in der Lage sind zu proliferieren (Zhang et al. 2007).

Alter hat zudem einen Einfluss auf die Zytokin-Produktion der NK-Zellen. So produzieren NK-Zellen von älteren Menschen, nachdem sie mit IL-2 stimuliert wurden, deutlich weniger INF- γ , als Zellen von jungen Menschen (Krishnaraj und Bhooma 1996). Auch die Produktion des Chemokins IL-8 nach Stimulation der NK-Zellen, war im Alter eingeschränkt (Mariani et al. 2001). In Mäusen zeigen sich ebenfalls altersbedingte Einflüsse auf die INF- γ -Produktion in NK-Zellen. Nach Stimulation mit IL-15 war die Anzahl der INF- γ -produzierenden NK-Zellen in alten Mäusen geringer als in jüngeren (Nogusa et al. 2012). Die NK-Zellen von alten Mäusen sind außerdem schlechter in der Lage zu Lymphknoten zu migrieren (Fang et al. 2010).

Die reduzierte Aktivität der NK-Zellen im Alter hängt mit der metabolischen Umgebung der Zellen zusammen. So konnte in Maus-Versuchen gezeigt werden, dass NK-Zellen von älteren Tieren schlechter auf Stimulation reagierten. Wurden diese Zellen allerdings in junge Tiere transferiert, zeigten sie ein normales Verhalten. NK-Zellen von jungen Tieren, die in alte Mäuse transferiert wurden, zeigten hingegen die gleichen Einschränkungen wie die NK-Zellen von alten Tieren. Auch die Transplantation von Stammzellen aus jungen Mäusen sorgte nicht für eine Verbesserung der NK-Zell-Funktion in alten Tieren. Somit liegt die reduzierte NK-Zell-Aktivität im Alter nicht an veränderten Stammzellen oder intrinsischen Defekten der NK-Zellen, sondern an der metabolischen Umgebung (Chiu et al. 2013).

Verschiedene altersbedingte Erkrankungen haben ebenfalls einen Einfluss auf die NK-Zellen. Patienten mit Typ-2 Diabetes zeigen beispielsweise eine veränderte Rezeptor-Expression und eine verringerte Degranulierung der NK-Zellen (Berrou et al. 2013). Auch die Zytotoxizität der NK-Zellen ist bei Personen mit Typ-2 Diabetes im Vergleich mit gesunden Personen reduziert (Piątkiewicz et al. 2013). Die Aktivität der NK-Zellen bei Diabetes hängt direkt mit der Kontrolle der Glukose-Konzentration zusammen. So konnte gezeigt werden, dass die Glukose-Konzentration im Plasma und die Menge an glykiertem Hämoglobin negativ mit der NK-Zell-Aktivität korreliert (Kim et al. 2019).

Auch bei Adipositas zeigt sich eine Verringerung der NK-Zell-Funktionen. So ist die Expression von verschiedenen Rezeptoren verändert und es kommt zu einer verringerten Produktion von INF- γ . Außerdem ist die Degranulierung bei NK-Zellen von adipösen Patienten eingeschränkt (Viel et al. 2017). Dadurch ist auch die Fähigkeit der NK-Zellen, ihre Zielzellen zu lysieren, bei Adipositas merklich reduziert (O'Shea et al. 2010).

Somit ist im erhöhten Alter und bei altersbedingten Erkrankungen, wie Typ-2 Diabetes und Adipositas, die Funktion der NK-Zellen verringert. Welche Rolle dabei allerdings Dicarbonyl-Stress und Glykierung spielen, ist hingegen noch nicht bekannt.

1.4 Zielstellung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit ist in zwei Teilbereiche gegliedert, die sich beide mit NK-Zellen beschäftigen. NK-Zellen können entartete und virusinfizierte Zellen erkennen und lysieren, weshalb sie von großer Bedeutung bei der Tumorbekämpfung und der Abwehr von Viruserkrankungen sind.

Mit zunehmendem Alter und bei Erkrankungen wie Diabetes und Adipositas, ist die Funktion des Immunsystems und auch die Aktivität der NK-Zellen merklich reduziert. Im Alter und bei Diabetes und Adipositas kommt es zu einem schlechteren Abbau von Dicarbonyl-Verbindungen, was letztendlich zu Dicarbonyl-Stress führt. In verschiedenen Veröffentlichungen konnte gezeigt werden, dass Dicarbonyl-Stress und eine erhöhte Glykierung die Funktion verschiedener Immunzellen verringern kann. Über mögliche Auswirkungen auf NK-Zellen ist hingegen nur wenig bekannt.

Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war es deshalb:

- zu untersuchen, welchen Einfluss Dicarbonyl-Stress und Glykierung auf die lytische Aktivität von NK-Zellen haben.
- mögliche Unterschiede nach der Behandlung mit den Dicarbonyl-Verbindungen MGO und GO zu untersuchen.
- festzustellen, welche Auswirkungen eine Glykierung der Tumorzellen auf deren Lyse durch NK-Zellen hat.

NK-Zellen tragen wie fast alle körpereigenen Zellen Sialinsäuren auf ihrer Oberfläche, die eine mögliche Rolle bei der Maskierung von zelleigenen Rezeptoren und dem Zell-Zell-Kontakt spielen. Die Verknüpfung mit Sialinsäuren mit verschiedenen Glykanstrukturen erfolgt im Golgi durch Sialyltransferasen. Über die Expression und die Regulierung der Sialyltransferasen in NK-Zellen sind nur wenige Informationen vorhanden.

Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit war es deshalb:

- verschiedene NK-Zelllinien und primäre NK-Zellen anhand der Expression der Sialyltransferasen zu charakterisieren.
- die Expression der Sialyltransferasen von NK-92-Zellen nach Aktivierung und nach Dicarbonyl-Stress zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

| | |
|--|---|
| 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| 5-Sulfosalicylsäure | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung, 30 % in H ₂ O (Verhältnis 37,5:1) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Agarose | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Bromphenolblau | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| Calciumchlorid (CaCl ₂) | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Dithiothreitol (DTT) | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Ethanol | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Ethidiumbromid | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Glycerin | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Glycin | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Glyoxal (GO), 40 % in H ₂ O | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Isopropanol | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Kaliumchlorid (KCl) | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Magnesiumchlorid (MgCl ₂) | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Methylglyoxal (MGO), 40 % in H ₂ O | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |

| | |
|--|---|
| Milchpulver | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumchlorid (NaCl) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumdodecylsulfat (SDS, von engl. <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Ponceau S | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED) | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| Trichloressigsäure | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) 10x | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Triton X-100 | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| Tween 20 | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Xylencyanol | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |

2.1.2 Molekularbiologische Reagenzien und Kits

| | |
|---|--|
| 7-AAD Viability Staining Solution | Biologend, San Diego, USA |
| Allophycocyanin (APC) annexin V apoptosis detection kit | Biologend, San Diego, USA |
| Carboxyfluorescein-Succinimidylester (CFSE) | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| dNTP Set (100 mM) | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |

| | |
|--|---|
| PageRuler Plus prestained protein ladder | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Pierce™ BCA Protein Assay Kit | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Protease Inhibitor Cocktail (PIC) P8340 | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| qPCR GreenMaster Mix | Jena Bioscience, Jena, Deutschland |
| Quick-RNA™ MiniPrep Kit | Zymo Research Corporation, Irvine, USA |
| RiboLock , RNase Inhibitor | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Super Script II Reverse Transcriptase | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Trypanblau (0,4%) | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Western Blotting Detection Reagent | GE Healthcare, Chicago, USA |

2.1.3 Hergestellte Lösungen

| Solubilisierungspuffer pH 7,5 | Ladepuffer SDS-PAGE | Ladepuffer DNA |
|----------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 10 mM TRIS | 12,5 % (w/v) SDS | 50 % (v/v) Glycerin |
| 150 mM NaCl | 0,3 M TRIS | 50 mM EDTA |
| 1 mM CaCl ₂ | 50 % (v/v) Glycerin | 0,05 % (w/v) Xylencyanol |
| 1 mM MgCl ₂ | 50 mM DTT | 0,05 % (w/v) Bromphenol |
| 1 % (v/v) Triton X-100 | 0,05 % (w/v) Bromphenol | - blau |
| 0,2 % (v/v) PIC | -blau | |
| 0,1 mM PMSF | | |

| PBS (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>) pH 7,4 | Laufpuffer SDS-Page pH 8,5 | Transferpuffer pH 8,5 |
|--|-------------------------------|--------------------------|
| 137 mM NaCl | 25 mM TRIS | 20 mM TRIS |
| 2,7 mM KCl | 192 mM Glycin | 150 mM Glycin |
| 10 mM Na ₂ HPO ₄ | 0,1 % (w/v) SDS | 10 % (v/v) Ethanol |
| 1,8 mM KH ₂ PO ₄ | | |

| Ponceau-Lösung | | TBS-T Puffer pH 7,6 | | Blockierlösung in TBS-T Puffer | |
|-----------------------|---------------------|-------------------------------|----------|--|-------------|
| 0,2 % (v/v) | Ponceau S | 137 mM | NaCl | 5 % (w/v) | Milchpulver |
| 3 % (v/v) | Trichloressigsäure | 7,7 mM | TRIS | | |
| 3 % (v/v) | 5-Sulfosalicylsäure | 0,1 % (v/v) | Tween 20 | | |

| Sammelgel SDS-Page | | Trenngel SDS-Page | | Agarosegel in TAE-Puffer | |
|---------------------------|-----------|--------------------------|-----------|------------------------------------|---------------------|
| 4 % (v/v) | Acrylamid | 10 % (v/v) | Acrylamid | 1,5 % (w/v) | Agarose |
| 377 mM | TRIS | 124 mM | TRIS | 2 % (v/v) | Ethidium- bromid |
| 0,05 % (w/v) | SDS | 0,05 % (w/v) | SDS | | |
| 0,8 % (v/v) | APS | 0,4 % (v/v) | APS | | |
| 0,08 % (v/v) | TEMED | 0,1 % (v/v) | TEMED | | |

2.1.4 Zellkultur-Reagenzien

| | |
|--|--|
| Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Gibco™ | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Fetales Kälberserum (FKS), Gibco™ | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| humanes Interleukin- 2 (Proleukin S) | Novartis AG, Basel, Schweiz |
| Natriumpyruvat (100 mM), Gibco™ | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml, 10.000 µg/ml), Gibco™ | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| <i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI) 1640 Medium, Gibco™ | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| RPMI 1640 Medium ohne Phenolrot, Gibco™ | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |

2.1.5 Primer

| | <u>forward</u> | <u>reverse</u> | <u>Produkt</u> <u>(bp)</u> |
|-------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| <i>ST8SIA1</i> | AATCCCAGCATAATTCGGCAAAG | AGAAGGGCCAGAAGCCATAG | 334 bp |
| <i>ST8SIA2</i> | TCTTCGATCGAGACAGCACCA | CACAGGATGCTGCCATTGAGG | 340 bp |
| <i>ST8SIA3</i> | ATTTGGCGCTTTCCGTTTGG | GCAACATGTCAACAGGTAAGTGG | 323 bp |
| <i>ST8SIA4</i> | TCTAGCTCCTGTGGTGGAGTT | TTGGTCAGCCAGTAACCTCTG | 303 bp |
| <i>ST8SIA5</i> | AGTCTACTCTGTCCAGGTGCT | ACAGTGACCACATCCGTCTTC | 328 bp |
| <i>ST8SIA6</i> | GTAACCTACCCCAACCACAG | TCATCAAGCCGGTGGACAAG | 342 bp |
| <i>ST6GALNAC1</i> | AGCCTCGGTGGGATTTTGGAG | GGAGTTGTTTCAGGATGCCCC | 356 bp |
| <i>ST6GALNAC2</i> | TTTGCCCTGTACTTCTCGGC | GGAGGCGATGACTTGGTGAG | 303 bp |
| <i>ST6GALNAC3</i> | TGGCCTGCATCCTGAAGAGAA | CTTTGGTGGGGGCATTGTTT | 339 bp |
| <i>ST6GALNAC4</i> | CGTGGTCTATGGGATGGTCAG | TGGAGTGTGATGGCTTGGGA | 299 bp |
| <i>ST6GALNAC5</i> | AGGGCACCGTGTTCATCTTC | GTGATTGGGATCCCTGCAGAA | 302 bp |
| <i>ST6GALNAC6</i> | CGGTCAGCAGTGTTTCGTGA | GCGGTAGGTGGTCTTGTGTC | 339 bp |
| <i>ST6GAL1</i> | TCCCAAAGTGGTACCAGAATCC | CTTCTCATAGAGCAGCGGGT | 332 bp |
| <i>ST6GAL2</i> | TCTGCTCCTACACGTGGTTATG | AGAAGATGGTGGGTTTGGTTGA | 336 bp |
| <i>ST3GAL1</i> | ATGTTGGGACCAAGACCACC | ACAAGTCCACCTCATCGCAG | 321 bp |
| <i>ST3GAL2</i> | CAGATAGTGCCTGGCGAGAA | CACTGGGGCGTAGGTGAATC | 333 bp |
| <i>ST3GAL3</i> | CCTTTTCGCAAGTGGGCTAGA | AGAGAATCGCGCTCGTACTG | 337 bp |
| <i>ST3GAL4</i> | CCTACAACAAGAAGCAGACCATTC | CTGGATCTCGGCTCCATAAGAG | 335 bp |
| <i>ST3GAL5</i> | AACAGTGCACCAGTTGAGGG | GCCCCAGAACCTTGACTGAG | 333 bp |
| <i>ST3GAL6</i> | GACCTCAAGAGTCCTTTGCAC | TTCACAGAAATTAAGCTGGTGGTT | 297 bp |
| <i>IL-2</i> | GAATTGGAAAGAGGAGAGTGACA | TACTGGGATGCTCTTCGACCT | 330 bp |
| <i>B2M</i> | TGCTGTCTCCATGTTTGTATATCT | TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT | 86 bp |

B2M aus Vandesompele et al. (2002). Alle anderen Primer wurden mit Hilfe des *Primer Blast Online-Tools* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) ermittelt.

2.1.6 Antikörper

| | <u>Antigen</u> | <u>Antikörper</u> | <u>Verdünnung</u> | <u>Hersteller</u> |
|----------|----------------------|---|-------------------|---|
| primär | anti-AGE (CML-26) | Klon: CML-26, Maus (monoklonal) IgG1 | 1:2000 | Abcam, Cambridge, Großbritannien |
| primär | anti-Aktin (Ab-5) | Klon: C4/actin, Maus (monoklonal) IgG1 | 1:5000 | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| sekundär | anti-Maus IgG | anti-Maus IgG, Ziege (polyklonal), <i>Horseradish</i> <i>Peroxidase</i> (HRP)- konjugiert | 1:10.000 | Abcam, Cambridge, Großbritannien |

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

| | |
|---|---|
| Amersham Protran 0.45 NC Nitrocellulose Membrane | GE Healthcare, Chicago, USA |
| Countess™ Cell Counting Chamber Slides | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Microlance 3 Kanüle 22 G 1 1/4 0,70 x 30 mm | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| Mikroplatte 96-well, F-Boden | Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich |
| Sapphire Mikroplatte 96-well, für PCR | Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich |
| Tuberkulinspritze 1 ml | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| Whatman™ Chromatographie-Papier 3mm | GE Healthcare, Chicago, USA |
| Zellkultur Mikroplatte 96-well V-Boden | Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich |
| Zellkulturflasche Cellstar 250 ml, 75 cm ² (mit Filterverschluss) | Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich |
| Zellkulturflasche Cellstar 50 ml, 25 cm ² (mit Filterverschluss) | Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich |

2.1.8 Geräte

| <u>Verwendung</u> | <u>Gerät</u> | <u>Hersteller</u> |
|---------------------------------------|--------------------------------|--|
| Blot Imager | Gel Doc XR+ | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA |
| Drehrad | Tube Rotator L29 | Labinco, Breda, Niederlande |
| Durchflusszytometer | BD Accuri C6 | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| Elektrophoresekammer für SDS-PAGE | C.B.S. Scientific DCX-700 | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Elektrophoresekammer für Western-Blot | C.B.S. Scientific EBX-700 | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Folienschweißgerät | ES-300 | GEHO PACK Service GmbH, Heidgraben, Deutschland |
| Geldokumentations-Gerät | Gel Stick Touch Panel Imager | Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland |
| Heizblock | Thermoschüttler Pro | CellMedia GmbH & Co. KG, Elsteraue, Deutschland |
| Inkubator | Heraeus™ Hera Cell | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Magnetrührer | Hei-Mix L | Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland |
| | FB15001 | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Mikroskop | Axiovert 100 | Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland |
| | Telaval 31 | Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland |
| Netzteil | Power Pac 300 | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA |
| | Blue Power 500 | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| PCR-Maschine | Mastercycler Gradient | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| pH-Meter | HI2210 | Hanna Instruments Inc., Woonsocket, USA |
| Plate-Reader | Clariostar | BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Deutschland |
| qPCR-Maschine | iCycler iQ5 | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA |
| Rollenmischer | RS-TR 5 | Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, Deutschland |
| Schüttler | Biometra Rocking Platform WT15 | Analytik Jena AG, Jena, Deutschland |

| | | |
|--------------------|----------------------------------|---|
| Spektralphotometer | Nanodrop 1000 | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Sterilbank | AURA-2000 MAC | EUROCLONE S.p.A., Mailand, Italien |
| Vortexmischer | MS-2 | IKA Werke GmbH & Co. KG, Stauffen, Deutschland |
| Waage | MXX-2001 | Sartorius AG, Göttingen, Deutschland |
| | AC AC210 S | Sartorius AG, Göttingen, Deutschland |
| Wasserbad | GFL 1003 Wasserbad | GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland |
| Zellzähler | Countess™ Automated Cell Counter | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Zentrifuge | Hettich Universal 320 | Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland |
| | Hettich Mikro 200 | Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland |
| | Heraeus™ Biofuge Fresco | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| | Sprout Minizentrifuge | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland |
| | Plattenzentrifuge T62.1 | Medizin-, Labor- und Wägetechnik, Leipzig, Deutschland |

2.1.9 Software

| | |
|---|--|
| AxioVision, Version 4.8.1 | Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland |
| BD Accuri C6 Analysis Software, Version 1.0 | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| Biorad iQ5, Version 2.0 | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA |
| ChemDraw Version 16.0.1 | PerkinElmer, Waltham, USA |
| Image Lab, Version 6.0.1 | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA |
| LinRegPCR 2018 | Dr Jan Ruijter, Academic Medical Centre Amsterdam, Niederlande |
| MARS Analysis Software, Version 3.20 R2 | BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Deutschland |
| Microsoft Office 2010 (Excel, PowerPoint, Word) | Microsoft Corporation, redmond, USA |
| NanoDrop 1000, Version 3.3 | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA |
| Normfindern (Excel Add-In), Version v0.953 | Claus Lindbjerg Andersen, Aarhus University Hospital, Aarhus, Dänemark |
| Origin Pro 2017 | OriginLab, Northampton, USA |
| Quantity One, Version 4.6.2 | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA |

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Zellkultivierung

Die humane myeloische Leukämie-Zelllinie K562 wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Roland Jacobs vom Institut für Rheumatologie und Immunologie der Medizinischen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt. Diese Zelllinie stammt von einem Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie und wächst in Suspension (Klein et al. 1976). Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS), 100 µg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin und 1 mM Natriumpyruvat kultiviert. Die Zellen wurden bis zu einer Zelldichte von ca. $0,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml kultiviert und alle 2-3 Tage entsprechend passagiert. Die humanen NK-Zelllinien NK-92, KHYG-1 und NKL wurden ebenfalls von Herrn Prof. Dr. Roland Jacobs zur Verfügung gestellt. Diese Zellen wurden im gleichen Medium wie die K562-Zellen kultiviert, wobei zusätzlich noch 200 U/ml Interleukin-2 (IL-2) zugegeben wurde. Die NK-Zelllinien wachsen ebenfalls in Suspension. Die Zellen wurden bis zu einer Zelldichte von ca. $0,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml kultiviert und alle 2-3 Tage entsprechend passagiert. Die Eigenschaften der NK-Zelllinien sind in Abschnitt 1.3.3 (Seite 16) genauer beschrieben.

Für die PCR-Versuche wurden zusätzlich die Zelllinien SH-SY5Y und NTERA-2 verwendet. Bei SH-SY5Y handelt es sich um einen Subklon der SH-SY5-Zelllinie, welche wiederum ein Subklon der SK-N-SH-Zelllinie ist, die aus Metastasen aus dem Knochenmark einer Neuroblastom-Patientin entstammt (Biedler et al. 1973; Biedler et al. 1978). NTERA-2 Zellen stammen ursprünglich von der TERA-2-Zelllinie, die einem Patienten mit embryonalem Karzinom entnommen wurde. Diese Zelllinie wurde mittels Xenotransplantation in Mäuse transferiert und aus den entstandenen Tumoren dann die NTERA-2-Zelllinie gewonnen (Andrews et al. 1984). Beide Zelllinien wachsen adhärent und wurden in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit 10 % FKS, 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin kultiviert. Kurz vor der Konfluenz wurden die Zellen im Verhältnis von 1:5 alle zwei bis drei Tage passagiert.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der entsprechenden Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau versetzt und mit Hilfe des „*Countess™ Automated Cell Counter*“ (Thermo Fisher Scientific Inc.) gezählt.

2.2.1.2 Behandlung mit Methylglyoxal und Glyoxal

Die Zellen wurden bei 210 g zentrifugiert und einmal mit *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Zellkulturmedium mit geringer Serum-

Konzentration (RPMI 1640 Medium mit 1 % FKS, 100 µg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin, 1 mM Natriumpyruvat und 200 U/ml IL-2) aufgenommen und 300.000 Zellen/ml eingesetzt. Alle Zellkulturversuche wurden, wenn nicht anders beschrieben, in 6-well Platten mit einem Volumen von je 5 ml pro well durchgeführt. Methylglyoxal (MGO) und Glyoxal (GO) wurden in PBS verdünnt um eine 1 M Stammlösung herzustellen. Aus dieser Stammlösung wurden dann die weiteren Verdünnungen hergestellt und entsprechende eingesetzt.

2.2.1.3 Stimulation mit Interleukin-2 (IL-2)

NK-92-Zellen wurden normalerweise immer in Medium mit 200 U/ml IL-2 kultiviert. Um die Auswirkungen einer IL-2-Stimulation zu beobachten, mussten die Zellen zunächst ohne IL-2 inkubiert werden. Dazu wurden die NK-92-Zellen bei 210 g zentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen. Die weitere Kultivierung erfolgte in einer 6-well Platte in einem Volumen von 5 ml und einer Konzentration von 300.000 Zellen/ml in Medium ohne IL-2 für 24 h.

Um den Zytotoxizitäts-Assay zu validieren, wurden verschiedene IL-2 Konzentrationen zugegeben und die Zellen weitere 24 h inkubiert, bevor der Assay durchgeführt wurde.

Für die Analyse mittels Real-Time PCR wurde die Zellen für 4 h mit 1000 U/ml IL-2 inkubiert.

2.2.1.4 Mikroskopie

NK-92-Zellen wurden für 4 h mit MGO oder GO behandelt, wie unter 2.2.1.2 beschrieben, und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml normales Medium (RPMI 1640 Medium mit 10 % FKS, 100 µg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin und 1 mM Natriumpyruvat) transferiert und über Nacht weiter kultiviert. Für mikroskopische Aufnahmen wurde das Axiovert 100 (Carl Zeiss) mit der zugehörigen Software AxioVision verwendet. Dabei wurden Bilder im Hell-Feld mit einer fünffachen Vergrößerung aufgenommen.

2.2.1.5 MTT-Assay

Zur Bestimmung der metabolischen Aktivität der NK-Zellen nach der MGO- und GO-Behandlung wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Bei diesem Test werden Zellen mit dem Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) inkubiert. Der Farbstoff gelangt in die Zelle und wird dort durch NAD(P)H-abhängige Oxidoreduktasen zu einer wasserunlöslichen Formazan-Verbindung reduziert. Die gebildeten Formazan-Kristalle können dann z.B. in DMSO gelöst werden, wodurch eine violette Lösung entsteht. Durch Messung der Absorption kann die Umsetzung des MTTs zwischen zwei Behandlungen miteinander verglichen werden (Berridge et al. 2005). Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Volumen von 100 µl in 96-well Platten mit V-Boden. Wie unter 2.2.1.2 angegeben, wurden 300.000 Zellen/ml eingesetzt und in Medium mit 1 % FKS mit den entsprechenden Konzentrationen von MGO und GO für 4 h inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte

bei 150 g für 2 min zentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann in 150 µl Zellkulturmedium (10 % FKS) ohne Phenolrot resuspendiert, welches zusätzlich 0,5 mg/ml MTT enthielt. Anschließend wurden die Zellen für weitere 4 h inkubiert und erneut zentrifugiert. Die Formazan-Kristalle wurden in 150 µl DMSO resuspendiert und die Lösung in eine 96-well Platte mit flachem Boden transferiert, in der auch die Messung erfolgte. Mit dem *Plate-Reader* wurde die Absorption bei 570 nm gemessen, wobei der Hintergrund, gemessen bei 630 nm, subtrahiert wurde. Zellen ohne MGO und GO dienten als Kontrolle und wurden als 100 % festgelegt. Alle Änderungen wurden relativ zur Kontrolle betrachtet.

2.2.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, bei der vereinzelte Zellen einen Laserstrahl passieren und Streulicht sowie Fluoreszenz detektiert werden. Die Probe wird in einen laminaren Hüllstrom, bestehend aus einer Trägerflüssigkeit, eingeschlossen und in einer sogenannten Messküvette fokussiert, sodass die Zellen einzeln den Laserstrahl passieren (Abbildung 10 A). Mit Hilfe von Photomultipliern kann dann im engen Winkel zum Laser das Vorwärtstreulicht (FSC, von engl. *forward scatter*) und, in einem Abstand von 90 ° zum Laser, das Seitwärtstreulicht (SSC, von engl. *sideward scatter*) gemessen werden (Abbildung 10 B). Fluoreszenzsignale werden ebenfalls im Winkel von 90 ° detektiert, da das Fluoreszenzsignal gleichmäßig in alle Richtungen streut. Das Vorwärtstreulicht dient als Maß für die Größe der Zellen, wohingegen man durch das Seitwärtstreulicht Informationen über die Granularität der Zellen erhält (Rothe 2007).

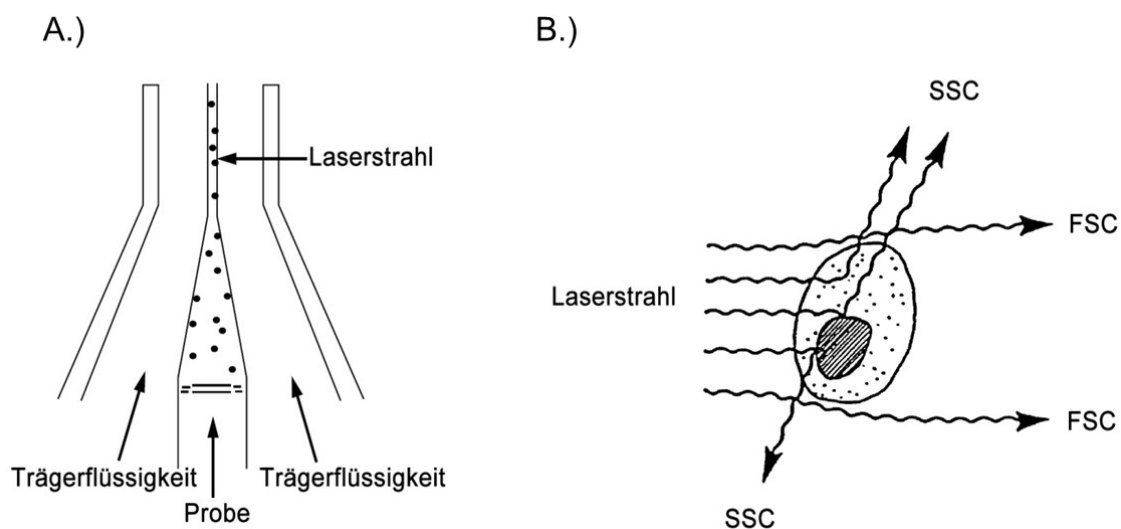


Abbildung 10: Durchflusszytometer

Die Trägerflüssigkeit umschließt die Probe und bildet einen Hüllstrom. In der Messküvette wird die Probe fokussiert und die Zellen einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt (A.). Trifft ein Laserstrahl auf eine Zelle können das Vorwärtstreulicht (FSC, von engl. *forward scatter*) und das Seitwärtstreulicht (SSC, von engl. *sideward scatter*) gemessen werden (B.). Abbildung verändert nach BD Bioscience (2002).

Mit Hilfe von fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern oder verschiedenen Farbstoffen können Zellen charakterisiert oder unterschiedliche Assays durchgeführt werden. Die verwendeten Fluorophore sind in Tabelle 2 aufgelistet. Für jedes Objekt, das den Laserstrahl passiert, wird ein Ereignis oder auch *Event* detektiert. Für jedes dieser *Events* werden FSC-, SSC- und Fluoreszenzsignale einzeln gespeichert. Die Darstellung kann dann zum Beispiel mit Hilfe eines Histogramms erfolgen, bei dem die Intensität eines Parameters auf der X-Achse und die Anzahl der *Events* auf der Y-Achse dargestellt werden. Eine weitere Darstellungsform ist der Dot-Plot, bei dem ein Parameter auf der X- und ein weiterer auf der Y-Achse dargestellt wird. Jedes *Event* hat, basierend auf den gemessenen Intensitäten, eine bestimmte Position in diesem Diagramm und wird durch einen einzelnen Punkt dargestellt. Je mehr *Events* gemessen werden, umso unübersichtlicher kann die Darstellung werden, da manche Bereiche nur noch als schwarze Flächen dargestellt werden. Deshalb wurde in dieser Arbeit eine modifizierte Version eines Dot-Plots verwendet. Dabei gibt es unterschiedliche Graustufen und Bereiche, in denen viele Events liegen, werden dunkler gefärbt, um eine bessere Visualisierung zu ermöglichen.

Tabelle 2: Verwendete Fluorophore

| Fluorophor | Anregungslaser | Kanal | Filter |
|------------|----------------|-------|--------------|
| 7-AAD | 488 nm | FL-3 | 670 Longpass |
| APC | 633 nm | FL-4 | 675 / 25 |
| CFSE | 488 nm | FL-1 | 533 / 30 |
| eFluor670 | 633 nm | FL-4 | 675 / 25 |

Bei der Analyse können Zellen mit gleichen Eigenschaften durch sogenannte *Gates* eingegrenzt werden, um diese dann in einem weiteren Histogramm oder Dot-Plot zu analysieren. Somit können unterschiedliche Zell-Populationen identifiziert und getrennt untersucht werden.

2.2.2.1 Viabilitäts-Assay

Zur Ermittlung der Zellviabilität wurde das „*APC Annexin V Apoptosis Detection Kit*“ der Firma Biolegend verwendet. Ein Bestandteil des Kits ist 7-Aminoactinomycin (7-AAD), ein Peptid, welches in die DNA interkalieren kann. Durch Anregung mit einem Laser kann dann ein Fluoreszenzsignal erzeugt werden. 7-AAD kann allerdings nur in die Zelle gelangen, wenn ihre Membran geschädigt ist und wird deshalb als Marker für tote Zellen genutzt (Schmid et al. 1992). Des Weiteren enthält das Kit das Protein Annexin V, welches mit dem Fluorophor APC gekoppelt ist. Annexin V bindet an Phosphatidylserin, ein Phospholipid der Plasmamembran. Phosphatidylserin ist normalerweise nur auf der zytosolischen Seite der Plasmamembran lokalisiert, gelangt jedoch in der frühen Phase der Apoptose auch auf die

äußere Seite der Plasmamembran. Die Bindung von Annexin V an Phosphatidylserin kann deshalb als Marker für frühe Apoptose genutzt werden (Vermees et al. 1995). Lebende Zellen lassen sich weder mit 7-AAD noch mit Annexin V anfärben (7-AAD⁻/Annexin V⁻) (Abbildung 11 A). Zellen in der frühen Phase der Apoptose sind positiv für Annexin V (7-AAD⁻/Annexin V⁺) (Abbildung 11 B), während Zellen in der späten Phase der Apoptose sowie nekrotische Zellen sowohl ein positives Signal für 7-AAD als auch für Annexin V zeigen (7-AAD⁺/Annexin V⁺) (Abbildung 11 C).

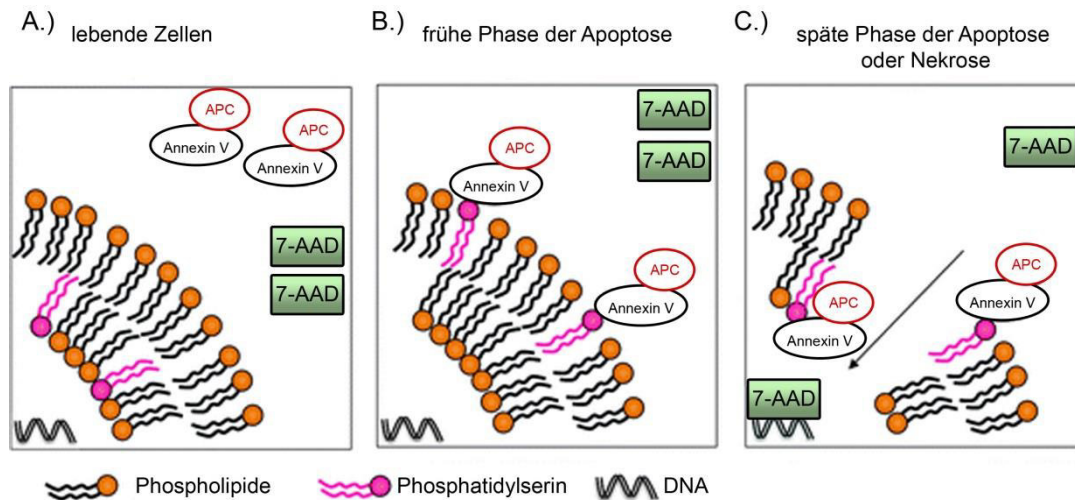


Abbildung 11: Funktionsweise des Viabilitäts-Assays

Für den Viabilitäts-Assay werden 7-AAD und Annexin V (gekoppelt mit Allophycocyanin (APC)) verwendet. Lebende Zellen haben eine intakte Zellemembran, weshalb weder 7-AAD noch Annexin V in die Zellen eindringen können (A.). In der frühen Phase der Apoptose, gelangen Phosphatidylserine, die sonst nur in der Innenseite der Membran zu finden sind, auch an die Außenseite der Membran. Annexin V kann dann an diese Phosphatidylserine binden (B.). In der späten Phase der Apoptose oder bei Nekrose ist die Zellmembran geschädigt und beide Stoffe können in die Zelle eindringen. Annexin V bindet an Phosphatidylserine auf der Innen- und Außenseite der Membran, außerdem kann 7-AAD in die DNA interkalieren. Abbildung verändert nach Zimmermann und Meyer (2011).

Die Zellen wurden nach der Behandlung mit MGO und GO einmal mit PBS gewaschen und in 100 µl *staining buffer*, der dem Kit beilag, resuspendiert. Anschließend wurden 5 µl 7-AAD-Lösung sowie 3 µl Annexin V-Lösung zugegeben und die Zellsuspension 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Messung am *BD Accuri C6* Durchflusszytometer von BD Bioscience. Die verwendeten *Gates* sind in Abbildung 12 zu sehen. Zunächst wurden die Zellen von kleineren Events abgegrenzt und dann nach ihren Signalen für 7-AAD und Annexin V (APC) dargestellt. Um die richtigen Abgrenzungen treffen zu können, wurden verschiedene Kontrollen mitgeführt. Dafür wurden Zellen für 5 min bei 80 °C erhitzt um die Membran zu schädigen und einzeln mit 7-AAD und Annexin V (APC) sowie mit beiden Stoffen gefärbt. Diese Zellen dienen als Positivkontrollen.

Pro Ansatz wurden 20.000 Zellen gemessen und der Prozentsatz der lebenden Zellen (7-AAD⁻/Annexin V⁻) bestimmt. Für jede Kondition wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und der Mittelwert berechnet.

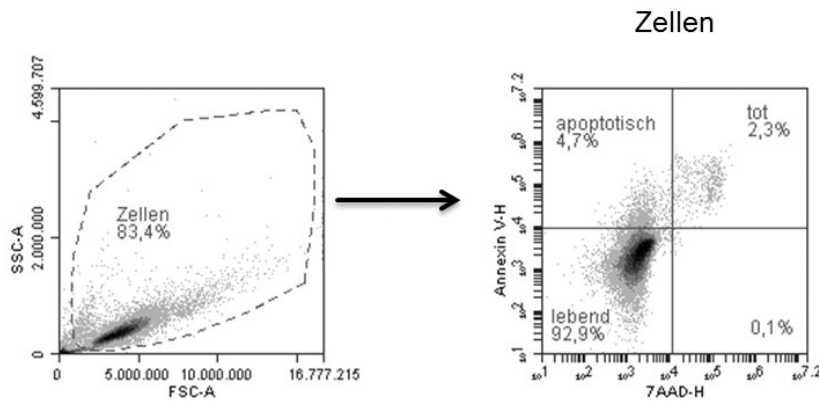


Abbildung 12: Gates beim Viabilitäts-Assay

Die Zellen wurden im Dot-Plot nach Vorwärts (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) dargestellt und von kleineren Events abgegrenzt. Die so ausgewählten Zellen wurden dann in einem weiteren Dot-Plot nach dem Signal von 7-AAD und Annexin V (APC) dargestellt. Zellen, die Annexin V gebunden haben, sind apoptotisch. Bei Events die außerdem noch positiv für 7-AAD sind handelt es sich um tote Zellen.

2.2.2.2 Konjugat-Assay

Das Protokoll für den Konjugat-Assay wurde in Anlehnung an eine Veröffentlichung von Burshtyn und Davidson (2010) erstellt. Dabei werden NK-Zellen und Zielzellen (K562) mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert, um diese im Durchflusszytometer unterscheiden zu können. Die K562-Zellen wurden mit Carboxyfluorescein-Succinimidylester (CFSE) gefärbt. Dafür wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen und in 1 ml einer 0,5 μ M CFSE-Lösung (in PBS) resuspendiert. Dann erfolgte eine Inkubation für 5 min im Dunkeln bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 5 ml Medium zugegeben und der Ansatz weitere 5 min inkubiert. Die Zellen wurden dann einmal mit Medium gewaschen, in Medium ohne Phenolrot resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Die NK-92-Zellen wurden ebenfalls nach diesem Protokoll gefärbt, wobei der Farbstoff „Cell Proliferation Dye eFluor™ 670“ (eFluor670) von Thermo Fisher in einer Konzentration von 1 μ M verwendet wurde. Bei der Behandlung mit MGO und GO fand die Färbung der entsprechenden Zellen vor der Behandlung statt. 100 μ l einer NK-92 Suspension mit $0,8 \cdot 10^6$ Zellen/ml wurde mit 100 μ l einer K562-Suspension mit $0,4 \cdot 10^6$ Zellen/ml in einem Reaktionsgefäß gemischt, sodass sich ein Verhältnis von NK-Zellen zu Zielzellen (engl. *Effector:Target Ratio*; E:T Ratio) von 2:1 ergab. Die Zellsuspension wurde dann bei 100 g für 1 min zentrifugiert, um einen Zell-Zell-Kontakt herzustellen und anschließend für 20 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen für 1 s mit dem *Vortexer* gemischt. Für den zeitabhängigen

Versuch wurden die Zellen direkt nach dem Zentrifugieren (0 min) oder nach einer Inkubation von 5, 10, 20 oder 30 min im Wasserbad mit dem *Vortexer* gemischt. Dadurch werden schwächere Zell-Zell-Verbindungen wieder getrennt. Hat sich allerdings eine immunologische Synapse gebildet, bleiben diese Konjugate erhalten. Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis gestellt, um weitere Zell-Zell-Interaktionen vor der Analyse im Durchflusszytometer zu unterbinden. Pro Probe wurden 10.000 Zellen gemessen. Zunächst wurde in einem Dot-Plot FSC gegen SSC dargestellt und die Zellen von Zellschrott abgegrenzt. Durch die beiden unterschiedlichen Farbstoffe können dann NK-Zellen und K562-Zellen unterschieden werden. Ereignisse, die für beide Farbstoffe positiv sind, stellen Konjugate dar (Abbildung 13). Für jede Kondition wurden Triplikate gemessen und der Mittelwert berechnet. Der Prozentsatz der Konjugate wurde relativ zu den unbehandelten Zellen dargestellt.

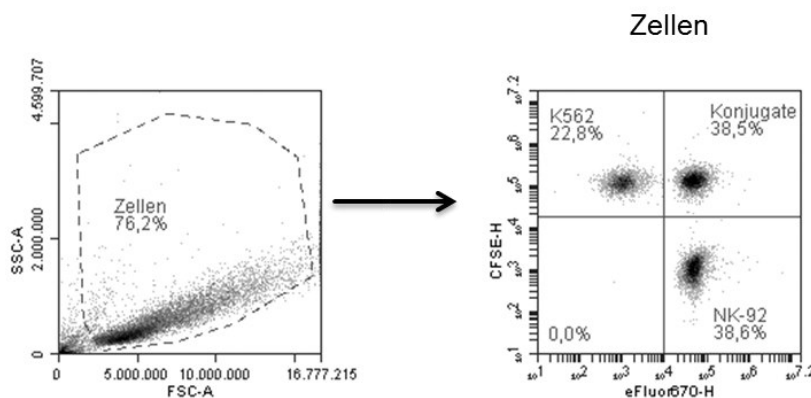


Abbildung 13: Gates beim Konjugat-Assay

Die Zellen wurden im Dot-Plot nach Vorwärts (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) angezeigt und von kleineren Events abgegrenzt. Die so ausgewählten Zellen wurden dann in einem weiteren Dot-Plot nach dem Signal von CFSE und eFluor670 dargestellt. K562-Zellen sind positiv für CFSE während NK-92-Zellen mit eFluor670 gefärbt sind. Bei Events, die positiv für beide Farbstoffe sind, handelt es sich um Konjugate.

2.2.2.3 Zytotoxizitäts-Assay

Um die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen zu bestimmen, wurde ein Protokoll in Anlehnung an eine Veröffentlichung von Duan et al. (2011) erstellt. Die Zielzellen (K562) werden dabei mit einem Fluoreszenz-Farbstoff gefärbt und können somit von den ungefärbten NK-Zellen unterschieden werden. Anschließend kann mit Hilfe eines Viabilitäts-Markers der Anteil an toten Zielzellen bestimmt werden. Zur Färbung der K562-Zellen wurde erneut der Farbstoff CFSE, nach dem gleichen Protokoll wie beim Konjugat-Assay (2.2.2.2) verwendet. Bei der Inkubation der K562-Zellen mit MGO und GO fand die Färbung vor der Behandlung statt. Sowohl die NK-92 als auch die K562-Zellen wurden in Medium ohne Phenolrot resuspendiert. In einer 96-well Platte mit V-Boden wurden 50 µl K562-Zellen mit einer

Konzentration von $0,4 \cdot 10^6$ Zellen/ml vorgelegt und mit $150 \mu\text{l}$ NK-92-Zellen mit einer Konzentration von $1,33 \cdot 10^6$ Zellen/ml vermischt, sodass sich ein E:T Ratio von 10:1 ergab. Anschließend wurde die Platte bei 150 g für eine Minute zentrifugiert, um einen Kontakt von NK-Zellen und Zielzellen zu ermöglichen. Die Platte wurde dann im Inkubator für 4 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 \% CO_2 inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen resuspendiert, $5 \mu\text{l}$ 7-AAD-Lösung zugegeben und die Zellen auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte die Messung am Durchflusszytometer. K562-Zellen, die 5 min bei $80 \text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt wurden, dienten als Positivkontrolle für die 7-AAD-Färbung. Eine weitere Kontrolle stellten K562-Zellen dar, die nicht mit 7-AAD inkubiert wurden. Pro Probe wurden 4.000 CFSE^+ -Zellen gemessen. Zunächst wurde in einem Dot-Plot FSC gegen SSC dargestellt und die Zellen von Zellschrott abgegrenzt. Anschließend wurden die K562-Zellen selektiert, die durch das CFSE von ungefärbten NK-Zellen unterschieden werden können. Im letzten Schritt wurde der Anteil der K562-Zellen bestimmt, die positiv für 7-AAD waren. Bei diesen handelt es sich um die toten Zellen (Abbildung 14). Außerdem wurden K562-Zellen gemessen, die ohne NK-92-Zellen inkubiert wurden. Diese dienen als Maß für die spontane Lyse. Die Lyserate wurde folgendermaßen bestimmt:

$$\text{Lyserate [\%]} = \frac{\text{tote K562Zellen [\%]} - \text{spontane Lyse [\%]}}{100 - \text{spontane Lyse [\%]}}$$

Für jede Kondition wurden Triplikate gemessen und der Mittelwert berechnet. Für die Darstellung wurde die Lyserate relativ zu den unbehandelten Zellen angegeben.

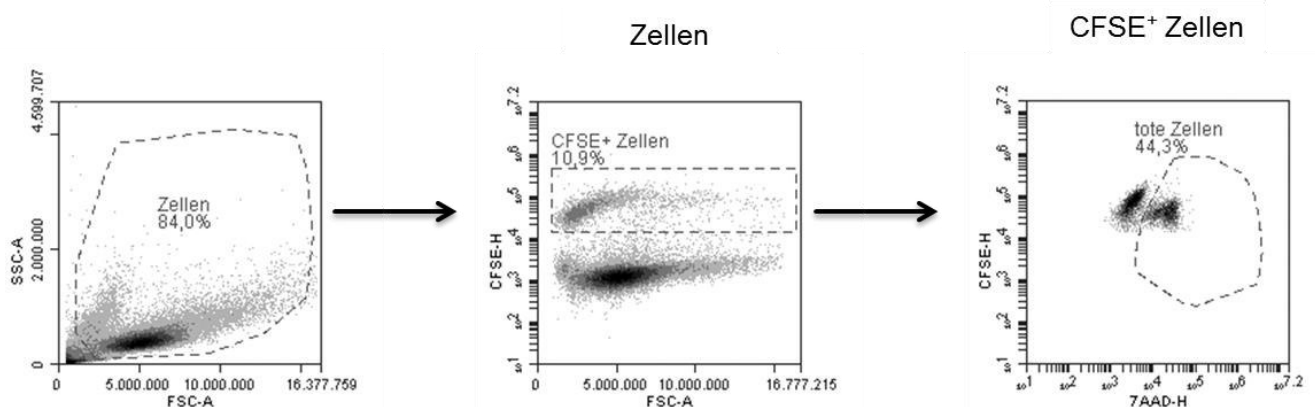


Abbildung 14: Gates beim Zytotoxizitäts-Assay

Die Zellen wurden im Dot-Plot nach Vorwärts (FSC) und Seitwärtsstreuung (SSC) angezeigt und von kleineren Events abgegrenzt. Bei den so ausgewählten Zellen konnten die gefärbten K562-Zellen von den ungefärbten NK-Zellen unterschieden werden. Die mit CFSE gefärbten K562-Zellen wurden in einem weiteren Dot-Plot angezeigt und mit Hilfe der 7-AAD-Färbung konnten tote und lebende Zellen unterschieden werden.

2.2.3 Protein-Analyse

2.2.3.1 Protein-Isolation

Für die Protein-Isolation wurden die Zellen 210 g zentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in Solubilisierungspuffer aufgenommen. Zum vollständigen Zellaufschluss wurde die Lösung durch eine Spritze mit feiner Kanüle gezogen und die Proben auf einem Drehrad bei 4 °C für 1,5 h inkubiert. Die Proben wurden anschließend bei 16.000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand, der die Proteine enthält, wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und bei -20 °C eingefroren.

2.2.3.2 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der Proteinproben wurde mit Hilfe der Bicinchoninsäure (BCA)-Methode bestimmt. Diese Methode basiert auf der Biuretreaktion, bei der die Peptidbindung in einer alkalischen Lösung Komplexe mit Cu^{2+} Ionen bilden, wobei Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert wird. BCA ist in der Lage an Cu^+ zu binden, wodurch ein Komplex mit einer violetten Farbe entsteht (Smith et al. 1985). Für die Konzentrationsbestimmung wurde das „Pierce™ BCA Protein Assay Kit“ (Thermo Fisher Scientific Inc.) entsprechend des Hersteller-Protokolls verwendet. Als Referenz wurde eine Standardkurve mitgeführt, die mit Proben von bovinem Serumalbumin (BSA) von 0 bis 2 mg/ml erstellt wurde. Die Absorption der Proben und der Standardkurve wurde bei 562 nm gemessen. Alle Messungen erfolgten in Doppelbestimmung.

2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Durch unterschiedliche Acrylamid-Konzentrationen kann eine unterschiedliche Porengröße der Gele erreicht werden. Für die beschriebenen Versuche wurden stets Sammelgele mit einer Acrylamid-Konzentration von 4 % und Trenngel mit einer Acrylamid-Konzentration von 10 % (siehe Abschnitt 2.1.3, Seite 25) hergestellt. Die Proteinproben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Anschließend wurden 30 µg Protein auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 110-160 Volt für 1-2 h in Laufpuffer, in Abhängigkeit von der Größe der zu untersuchenden Proteine.

2.2.3.4 Western-Blot

Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend mittels Western-Blot-Technik auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Dazu wurde das sogenannte *Wet-Blot* Verfahren angewendet, bei dem Gel und Membran vollständig in Transferpuffer eingetaucht sind. Durch Anlegen einer Spannung von 120 Volt für 1,5 h werden die Proteine auf die Membran übertragen. Durch Verwendung von Kühllakus wurde die Temperatur des Transferpuffers

niedrig gehalten. Um die Proteine nach erfolgreichem Transfer auf der Membran sichtbar zu machen, wurde diese für 1 min in Ponceau-Lösung geschwenkt und anschließend mit destilliertem Wasser entfärbt, bis Proteinbanden sichtbar wurden. Anschließend erfolgte eine Blockierung der Membran durch Inkubation in 5 % Milchpulver-Lösung für 1 h bei Raumtemperatur. Die Membran wurde gewaschen (4x10 min in TBS-T) und anschließend mit dem Primär-Antikörper (in TBS-T) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte nach erneutem Waschen (4x10 min in TBS-T) der Membran die Inkubation mit dem entsprechenden *Horseradish Peroxidase* (HRP)-konjugierten Sekundärantikörper (in TBS-T) für 1 h bei Raumtemperatur. Darauf folgte ein letzter Waschgang der Membran (4x10 min in TBS-T). Die Detektion der Zielproteine erfolgte mittels „*Amersham ECL Select Western Blotting Detection Reagent*“ nach Angaben des Herstellers. Die Blots wurden für 2-120 s belichtet und mit dem Blot-Imager (Gel Doc XR+) detektiert.

2.2.4 RNA-Analyse

2.2.4.1 RNA-Isolation

Die RNA wurde aus Zellpellets mit Hilfe des „*Quick-RNA MiniPrep Kit*“ der Firma Zymo Research isoliert. Alle Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und die Zellpellets in 300 µl Lysepuffer, welcher dem Kit beilag, resuspendiert. Es wurde RNA von den NK-Zelllinien NK-92, NKL und KHYG-1 sowie von den Zelllinien K562, SH-SY5Y und NTERA-2 isoliert.

Die Isolation der RNA erfolgte stets nach dem Hersteller-Protokoll. Das Kit nutzt zwei verschiedene Säulen, über die die RNA zunächst gereinigt und dann gebunden wird. Mit verschiedenen Lösungen werden ein DNase-Verdau und verschiedene Waschschriffe auf der Säule durchgeführt.

Anschließend wurde die RNA mit 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert und die Konzentration und Reinheit der RNA mit Hilfe des „*NanoDrop 1000*“ bestimmt. Dazu erfolgte eine Messung der Absorption bei 230, 260 und 280 nm.

Außerdem erfolgte die RNA-Isolation aus Pellets der Zelllinien A549, MDA-MB-231, MDA-MB-453 und ES-2. Diese Zellpellets wurden freundlicherweise von Ingo Holstein aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Guido Posern vom Institut für Physiologische Chemie in Halle zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden nach den Empfehlungen der *American Type Culture Collection* (ATCC) kultiviert.

Zusätzlich wurde auch RNA aus primären NK-Zellen gewonnen. Diese Zellpellets wurden freundlicherweise von Dr. Chiara Massa aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Seliger vom Institut für Medizinische Immunologie in Halle bereitgestellt. Die Zellen wurden aus *Buffy Coats* von Blutspendern gewonnen. Dazu wurde zunächst eine Isolation der PBMCs

durchgeführt und anschließend die NK-Zellen mit Hilfe des „*MojoSort™ Human NK Cell Isolation Kit*“ der Firma Biolegend isoliert. Die Reinheit der Proben wurde mittels Durchflusszytometrie durch Inkubation mit Antikörpern gegen CD3, CD56 und CD16 bestimmt und lag bei allen Proben über 90 %.

2.2.4.2 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wurden 2 µg RNA in komplementäre DNA (cDNA, von engl. *complementary DNA*) umgeschrieben. Dabei wurde die Reverse Transkriptase „*SuperScript™ II*“ (Thermo Fisher Scientific Inc) verwendet. Die Reaktion wurde nach dem Hersteller-Protokoll durchgeführt. Zunächst wurden 2 µg RNA mit 1 µl dNTPs (10 mM) und 1 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer (0.5 µg/µl) gemischt und mit Wasser auf ein Volumen von 12 µl aufgefüllt. Die Lösung wurde anschließend 5 min bei 65 °C inkubiert. Dann wurden 5 µl Puffer, 1 µl DTT sowie 1 µl Ribonuklease-Inhibitor (40 U/µl) zugegeben und die Mischung auf 42 °C erhitzt. Danach erfolgte die Zugabe von 1 µl „*SuperScript™ II*“ (200 U/µl). Die Proben wurden für 50 min bei 42 °C inkubiert und anschließend weitere 50 min bei 70 °C inkubiert, um die Reaktion zu stoppen.

2.2.4.3 Primer

Passenden Primer für die Sialyltransferasen wurden mit Hilfe des *Primer Blast Online-Tools* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) ermittelt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Primer ein Produkt zwischen 270 und 360 bp erzeugen und die Schmelztemperatur der Primer möglichst ähnlich war. Die Primer wurden dann von Eurofins Scientific SE (Luxemburg) synthetisiert. Die komplette Liste der Primer ist in Abschnitt 2.1.5 (Seite 26) abgebildet.

2.2.4.4 Polymerase Kettenreaktion

Für die Polymerase Kettenreaktion (PCR, von engl. *Polymerase Chain Reaction*) wurde der „*DreamTaq PCR Master Mix*“ der Firma Thermo Fisher verwendet.

Folgender Ansatz wurde genutzt:

10 µl *DreamTaq PCR Master Mix*

1 µl Primer *forward* (10 µM)

1 µl Primer *reverse* (10 µM)

7 µl H₂O

1 µl cDNA

20 µl Gesamtvolumen

Reaktionsschritte der PCR:

| | | | |
|-----------------------------|-------|-------|-------------|
| 1. Initiale Denaturierung | 95 °C | 2 min | } 35 Zyklen |
| 2. Denaturierung | 95 °C | 30 s | |
| 3. Primer- <i>Annealing</i> | 55 °C | 30 s | |
| 4. Elongation | 72 °C | 30 s | |
| 5. Finale Elongation | 72 °C | 5 min | |

Für jedes Primerpaar wurde eine entsprechende Negativkontrolle mitgeführt, die keine cDNA enthielt, um mögliche Kontaminationen der Reagenzien ausschließen zu können.

2.2.4.5 Agarose-Gel-Elektrophorese

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gel-Elektrophorese anhand ihrer Größe aufgetrennt. Zur Herstellung eines 1,5 % Agarosegels wurden 1,5 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer aufgekocht, bis sie sich vollständig gelöst hatte. Die Flüssigkeit wurde etwas abgekühlt, mit 2 µl Ethidiumbromid versetzt und in den Schlitten gegossen. Die PCR-Produkte wurden mit DNA-Probenpuffer versetzt und 18 µl auf dem 1,5 % Agarosegel in TAE-Puffer mittels Elektrophorese aufgetrennt.

2.2.4.6 Semiquantitative Real-Time PCR

Für die Real-Time PCR wurde der „*qPCR GreenMaster Mix*“ der Firma Jena Bioscience verwendet.

Folgender Ansatz wurde genutzt:

| |
|--------------------------------------|
| 10 µl <i>qPCR GreenMaster Mix</i> |
| 0,8 µl Primer <i>forward</i> (10 µM) |
| 0,8 µl Primer <i>reverse</i> (10 µM) |
| 7,4 µl H ₂ O |
| <u>1 µl cDNA</u> |
| 20 µl Gesamtvolumen |

Die Reaktion fand in einer *96-well* Platte statt. Dabei wurde das iQ5 Gerät der Firma Biorad verwendet.

Reaktionsschritte der Real-Time PCR:

| | | | |
|-----------------------------|-------|----------|-------------|
| 1. Initiale Denaturierung | 95 °C | 1:30 min | } 40 Zyklen |
| 2. Denaturierung | 95 °C | 10 s | |
| 3. Primer- <i>Annealing</i> | 62 °C | 10 s | |
| 4. Elongation | 72 °C | 25 s | |
| 5. Finale Elongation | 72 °C | 1 min | |

Der „qPCR GreenMaster Mix“ enthielt neben einer Polymerase auch den Farbstoff EvaGreen®, der in die DNA interkalieren kann. Durch Anregung mit einem Laserstrahl kann dann ein Fluoreszenzsignal erzeugt und so die Zunahme der DNA Menge betrachtet werden. Nach jedem Zyklus wurde deshalb eine Fluoreszenzmessung durchgeführt. Der Farbstoff interkaliert unspezifisch in alle vorhandenen doppelsträngigen DNA-Fragmente. Um sicherzugehen, dass immer nur ein Produkt entstanden war, wurde deshalb nach Ende der PCR-Reaktion eine Schmelzpunkt-Analyse durchgeführt. Bei dieser Analyse wird die Temperatur Schrittweise von 55 °C auf 95 °C erhöht und dabei die Fluoreszenz gemessen. Für jede Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Außerdem wurde für jeden Primer eine Negativkontrolle gemessen, die keine DNA enthielt. Eine Quantifizierung der entstandenen Produkte wurde relativ zu dem Referenz-Gen *B2M* durchgeführt. Dabei wurde die Methode nach Pfaffl angewendet (Pfaffl 2001). Die Amplifikationseffizienz (E) der einzelnen Primerpaare wurde dabei mit Hilfe der Software LinRegPCR direkt aus den Amplifikationskurven bestimmt (Ruijter et al. 2009). Die Mittelwerte wurden dann für die Berechnung verwendet (siehe Anhang, Tabelle 5, Seite 103).

$$ratio = \frac{(E_{Zielgen})^{\Delta Ct_{Zielgen}(Kontrolle-Behandlung)}}{(E_{Referenzgen})^{\Delta Ct_{Referenzgen}(Kontrolle-Behandlung)}}$$

Für die Analyse der Genexpression dienten die Werte der Zellen ohne MGO- bzw. ohne IL-2-Behandlung als Kontrolle und wurden 1 gesetzt und die Werte der behandelten Zellen relativ dazu betrachtet.

2.2.5 Datenanalyse

Alle Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Zur Erzeugung von Graphen und zur statistischen Analyse wurde das Programm *Origin Pro 2017* (OriginLab, Northampton, USA) verwendet. Für alle Versuche mit mehreren Konzentrationen wurde ein One-Way-Anova-Test mit anschließendem Tukey-Test durchgeführt. Die Daten der Real-Time PCR wurden mittels studentischen T-Tests ausgewertet. Ein Unterschied von $p < 0,05$ wurde als signifikant betrachtet. Die signifikanten p-Werte (Behandlung im Vergleich zur Kontrolle) sind in den Graphen angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Dicarbonyl-Stress und Glykierung auf die Funktion von NK-Zellen

3.1.1 Glykierung von NK-Zellen

Um den Einfluss von Dicarbonyl-Stress und der daraus folgenden Glykierung auf die Aktivität von NK-Zellen zu untersuchen, wurde die NK-Zelllinie NK-92 verwendet. Diese Zelllinie ist sehr gut charakterisiert und ein häufig verwendetes Modell, um NK-Zell-Funktionen zu untersuchen (siehe Abschnitt 1.3.3., Seite 16). Als Dicarbonyl-Verbindungen wurden MGO und GO verwendet.

3.1.1.1 Nachweis der Glykierung

Die NK-92-Zellen wurden für 4 h mit verschiedenen Konzentrationen (0,3; 0,6; 1; 2 mM) MGO oder GO in Medium mit 1 % FKS inkubiert. Um festzustellen, ob diese Behandlung zu einer Glykierung der Zellen führte, wurden die Proteine isoliert und mittels SDS-Page aufgetrennt. Anschließend wurde ein Western-Blot durchgeführt. Dazu wurde ein Antikörper verwendet, der an AGE-modifizierte Proteine bindet. Da der Antikörper an alle glykierten Proteine bindet, sieht man bei glykierten Zellen viele verschiedene Banden. Bei hohen Intensitäten kommt es zu einer Überlagerung der Signale, sodass keine einzelnen Banden mehr sichtbar sind. Die gleichmäßige Beladung wurde zum einen durch eine Inkubation mit einem Anti-Aktin Antikörper (Abbildung 15) und zum anderen durch eine Ponceau-Färbung der Membran festgestellt (siehe Anhang, Abbildung 34, Seite 102).

Eine Behandlung mit MGO sorgte für einen konzentrationsabhängigen Anstieg des AGE-Signals (Abbildung 15 A). Während bei den unbehandelten Zellen fast kein Signal zu sehen war, waren bei einer Behandlung mit 0,3 und 0,6 mM schon verschiedene Banden sichtbar, bei denen es sich um AGE-modifizierte Proteine handelte. Bei 1 mM MGO war ein deutlich stärkeres Signal zu sehen. Bei 2 mM war die Intensität so hoch, dass keine einzelnen Banden mehr sichtbar waren.

Für die Behandlung mit GO (Abbildung 15 B) war ein ähnlicher Effekt zu beobachten. Auch hier wurde das Signal mit höheren Konzentrationen stärker, bis keine einzelnen Banden zu detektieren waren. Somit konnte gezeigt werden, dass die Behandlungsdauer von 4 h ausreichend war, um die vorhandenen Proteine zu glykieren. Selbst bei Inkubation mit niedrigeren Konzentrationen von 0,3 mM GO entstanden bereits AGE-Modifikationen, was mit Hilfe des Western-Blots nachgewiesen werden konnte.

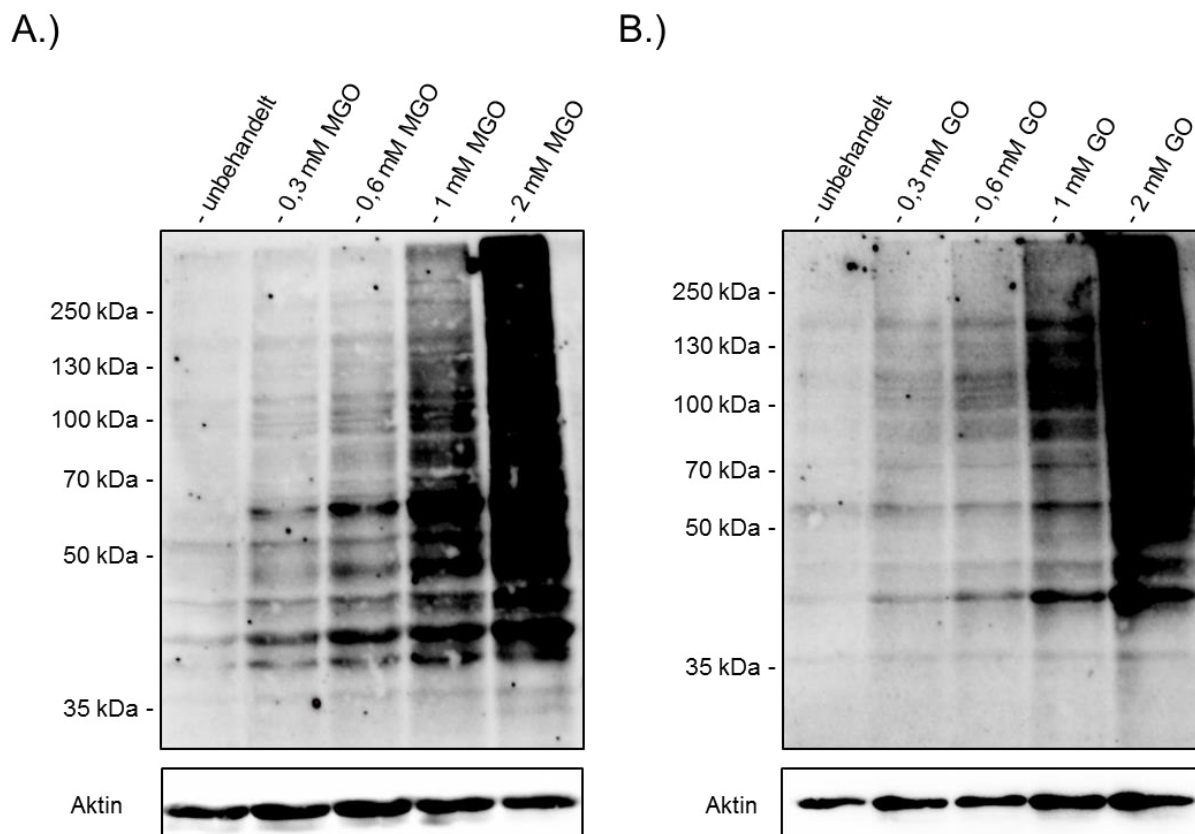


Abbildung 15: Nachweis der Glykierung der NK-92-Zellen

Die NK-92-Zellen wurden für 4 h in Medium mit 1 % FKS mit verschiedenen Konzentrationen von MGO (A.) und GO (B.) inkubiert. Anschließend wurden die Proteine isoliert, mittels SDS-Page aufgetrennt und ein Western-Blot durchgeführt. Dabei wurde ein Anti-CML Antikörper (CML-26, Abcam) verwendet, der an AGE-modifizierte Proteine binden kann. Als Ladekontrolle wurde außerdem eine Inkubation mit einem Anti-Aktin Antikörper durchgeführt. Gezeigt sind repräsentative Western-Blots von drei unabhängigen Experimenten.

3.1.1.2 Viabilität und metabolische Aktivität

Um zu überprüfen, ob sich die Behandlung mit MGO und GO negativ auf die Zellviabilität auswirkt, wurde ein Viabilitäts-Assay durchgeführt. Dazu wurden die Zellen nach der MGO- bzw. GO-Behandlung mit 7-AAD und Annexin V (gekoppelt an APC) inkubiert und im Durchflusszytometer gemessen. Zellen in der frühen Phase der Apoptose sind positiv für Annexin V, während tote Zellen sowohl positiv für Annexin V als auch für 7-AAD sind. Bei Zellen, die weder positiv für 7-AAD noch für Annexin V sind, handelt es sich um lebende Zellen. Zur Kontrolle wurden außerdem Zellen durch Erhitzen abgetötet. Diese toten Zellen dienen dazu, die richtigen Abgrenzungen setzen zu können (Abbildung 16 A).

Weder bei der Behandlung mit MGO (Abbildung 16 B) noch bei der Behandlung mit GO (Abbildung 16 C) waren Unterschiede beim Anteil der lebenden Zellen zu sehen. Der Prozentsatz der lebenden Zellen lag bei allen Konzentrationen über 90 %. Somit führte die Inkubation mit MGO und GO nicht zur Apoptose der NK-Zellen.

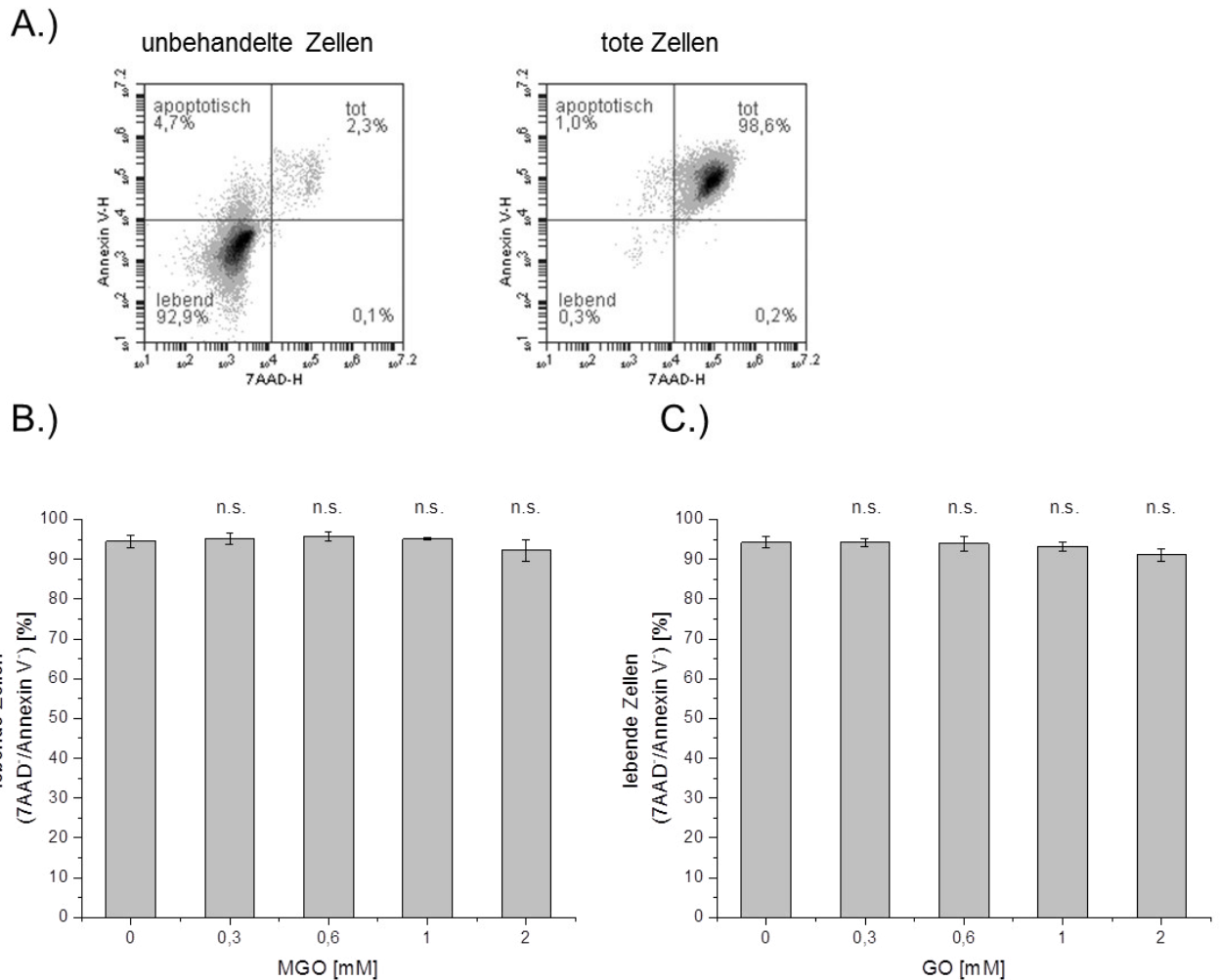


Abbildung 16: Viabilität der NK-92-Zellen

Für den Viabilitäts-Assay wurden Zellen mit 7-AAD und Annexin V (gekoppelt mit APC) inkubiert. Zellen in der frühen Phase der Apoptose sind positiv für Annexin V, während tote Zellen sowohl positiv für Annexin V als auch für 7-AAD sind. Gezeigt sind repräsentative Dot-Plots von unbehandelten Zellen und Zellen, welche durch Erhitzen abgetötet wurden (A.). Diese toten Zellen wurden verwendet, um die Abgrenzungen setzen zu können. Die NK-92-Zellen wurden für 4 h in Medium mit 1 % FKS mit verschiedenen Konzentrationen von MGO (A.) und GO (B.) inkubiert und der Anteil an Zellen bestimmt, die negativ für 7-AAD und Annexin V waren. Bei diesen handelt es sich um die lebenden Zellen. Gezeigt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von jeweils drei unabhängigen Experimenten.

Nach der Behandlung mit MGO und GO wurde außerdem die Zellzahl mittels automatischem Zellzähler bestimmt. Auch hier waren keine Unterschiede nach der Behandlung zu sehen (Daten hier nicht gezeigt).

Des Weiteren wurde die metabolische Aktivität der NK-Zellen mittels MTT-Assays untersucht. Die Behandlung mit 0,3 und 0,6 mM MGO führte zu keiner signifikanten Veränderung der metabolischen Aktivität (Abbildung 17 A). Bei einer Inkubation mit 1 mM bzw. 2 mM MGO war die metabolische Aktivität signifikant reduziert und betrug nur noch etwa 60 % der Kontrolle. Eine Behandlung mit GO beeinflusste bei keiner der untersuchten Konzentrationen die metabolische Aktivität (Abbildung 17 B).

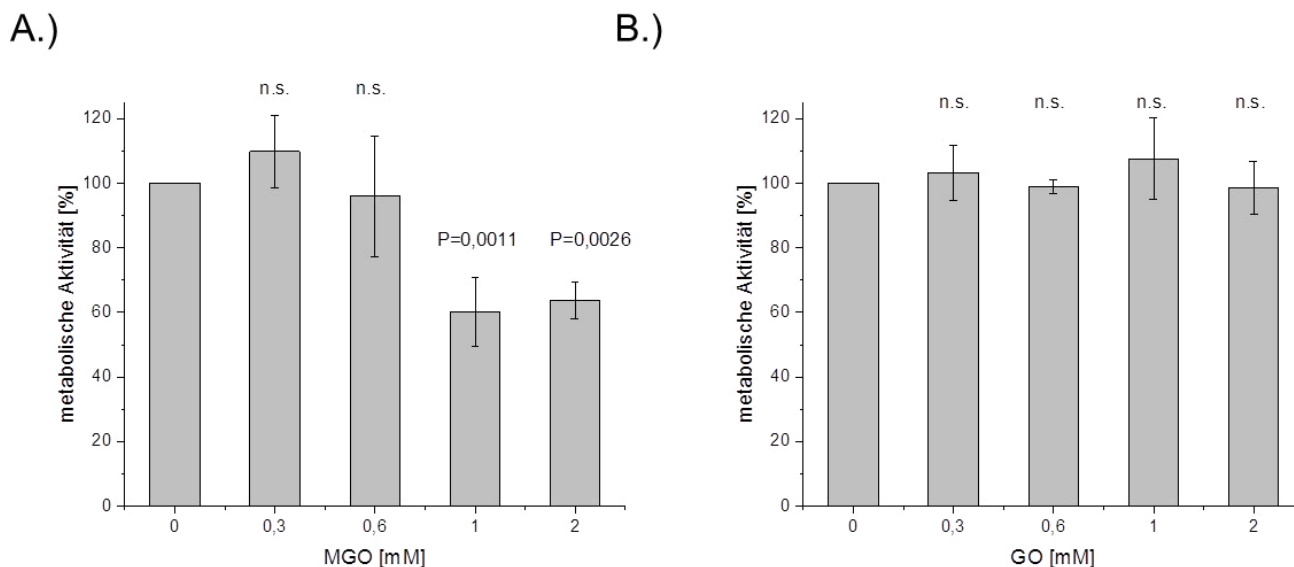


Abbildung 17: Metabolische Aktivität der NK-92-Zellen

Zur Bestimmung der metabolischen Aktivität wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Die NK-92-Zellen wurden für 4 h in Medium mit 1 % FKS mit verschiedenen Konzentrationen von MGO (A.) und GO (B.) inkubiert. Anschließend wurden sie in Medium mit 10 % FKS transferiert, welches 0,5 mg/ml MTT enthielt und für weitere 4 h inkubiert. Die Formazan-Kristalle wurden in DMSO gelöst und die Absorption gemessen. Die Werte für unbehandelte Zellen wurden als 100 % festgelegt und Veränderungen relativ dazu betrachtet. Gezeigt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von 4 (A.) und 5 (B.) unabhängigen Experimenten.

3.1.1.3 Zellmorphologie

Während der Kultivierung und Proliferation der NK-92-Zellen bilden sich normalerweise Zell-Aggregate, die typisch für diese Zelllinie sind. Die Zellen lassen sich durch Resuspendieren leicht wieder voneinander trennen. Um morphologische Veränderungen nach der Behandlung zu untersuchen, wurden die Zellen nach der Inkubation mit MGO oder GO mit PBS gewaschen und in normales Zellkulturmedium transferiert. Dabei werden die Zellen vereinzelt und es müssen sich wieder neue Aggregate bilden. Deshalb erfolgte anschließend eine weitere Kultivierung über Nacht. Am nächsten Tag wurden Fotos mit einem Hellfeld-Mikroskop aufgenommen (Abbildung 18). Bei einer vorherigen Behandlung mit 0,3 mM bzw. 0,6 mM MGO waren keine morphologischen Veränderungen sichtbar. Nach der Behandlung mit 1 mM MGO bildeten sich nur vereinzelt Aggregate, während bei 2 mM MGO keine erneute Bildung von Aggregaten mehr zu beobachten war. Eine Behandlung mit GO hatte bei allen verwendeten Konzentrationen keine morphologischen Veränderungen zur Folge.

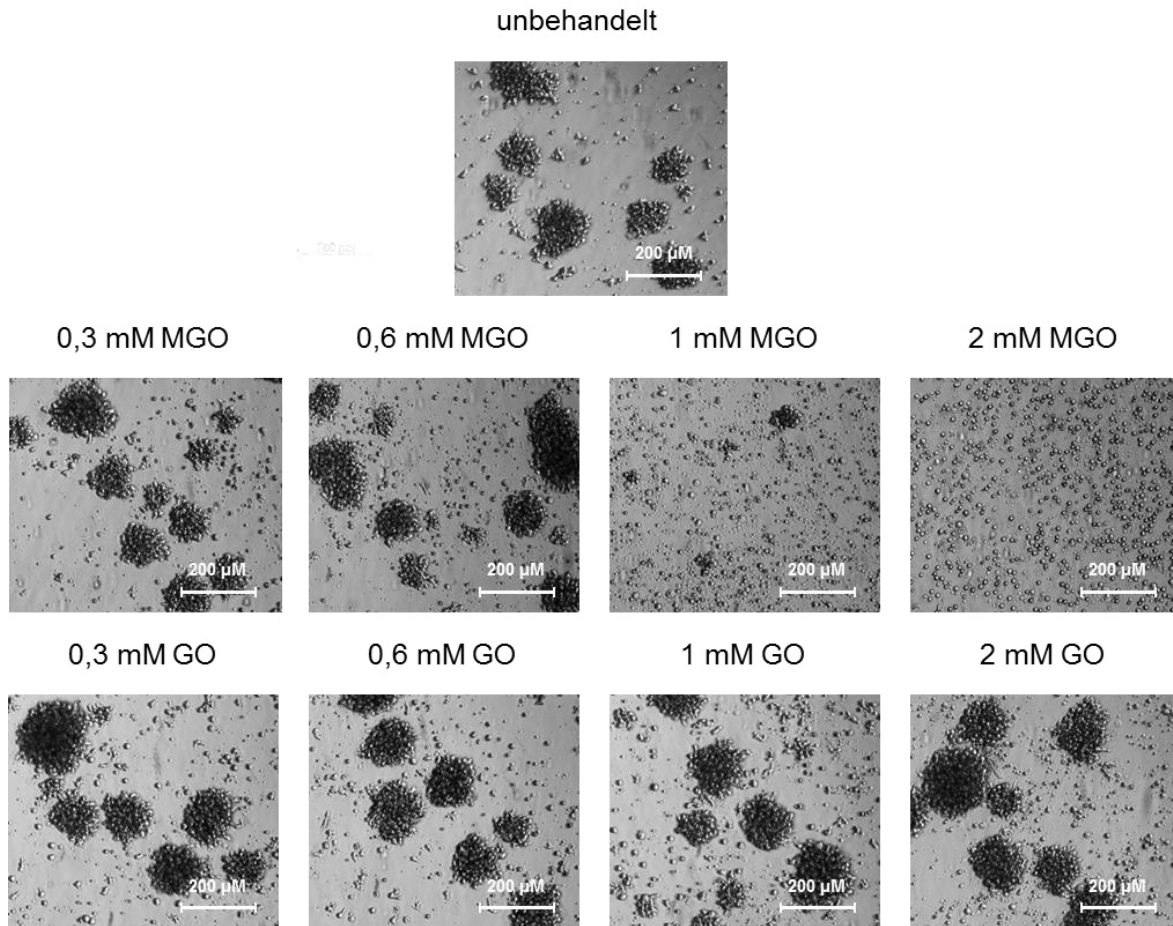


Abbildung 18: Mikroskopie

NK-92-Zellen wurden für 4 h mit MGO und GO behandelt und anschließend mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann in frisches Medium (10 % FKS) transferiert und über Nacht inkubiert. Gezeigt sind repräsentative Bilder von drei unabhängigen Experimenten.

3.1.1.4 Konjugat-Assay

Damit NK-Zellen veränderte Zellen erkennen und lysieren können, muss zunächst ein Zell-Zellkontakt stattfinden. Dabei bilden NK-Zellen und Zielzellen Konjugate. Erhält die NK-Zelle ein Aktivierungssignal, kommt es anschließend zu einer festeren Bindung und schlussendlich zur Lyse der Zielzelle. Mit Hilfe des Konjugat-Assays sollte die Bildung dieser Zell-Zell-Kontakte untersucht werden. Die myeloische Leukämie-Zelllinie K562 diente dabei als Zielzelle, mit der die NK-Zellen Konjugate bilden können. Um die Abgrenzungen setzen zu können, wurden K562-Zellen und NK-92-Zellen einzeln gemessen (Abbildung 19 A).

Um den Assay zu validieren, wurden NK-92-Zellen und K562-Zellen nach dem Zentrifugationsschritt für verschiedene Zeitpunkte miteinander inkubiert. Unmittelbar nach der Zentrifugation waren nur sehr wenige Konjugate vorhanden. Schon nach etwa 5 min waren etwa 35 % der gemessenen Events Konjugate. Nachdem ein Maximum nach 20 min erreicht war, sank die Anzahl der Konjugate nach 30 min wieder (Abbildung 19 B und C). Für alle weiteren Versuche wurde deshalb eine Inkubationszeit von 20 min gewählt.

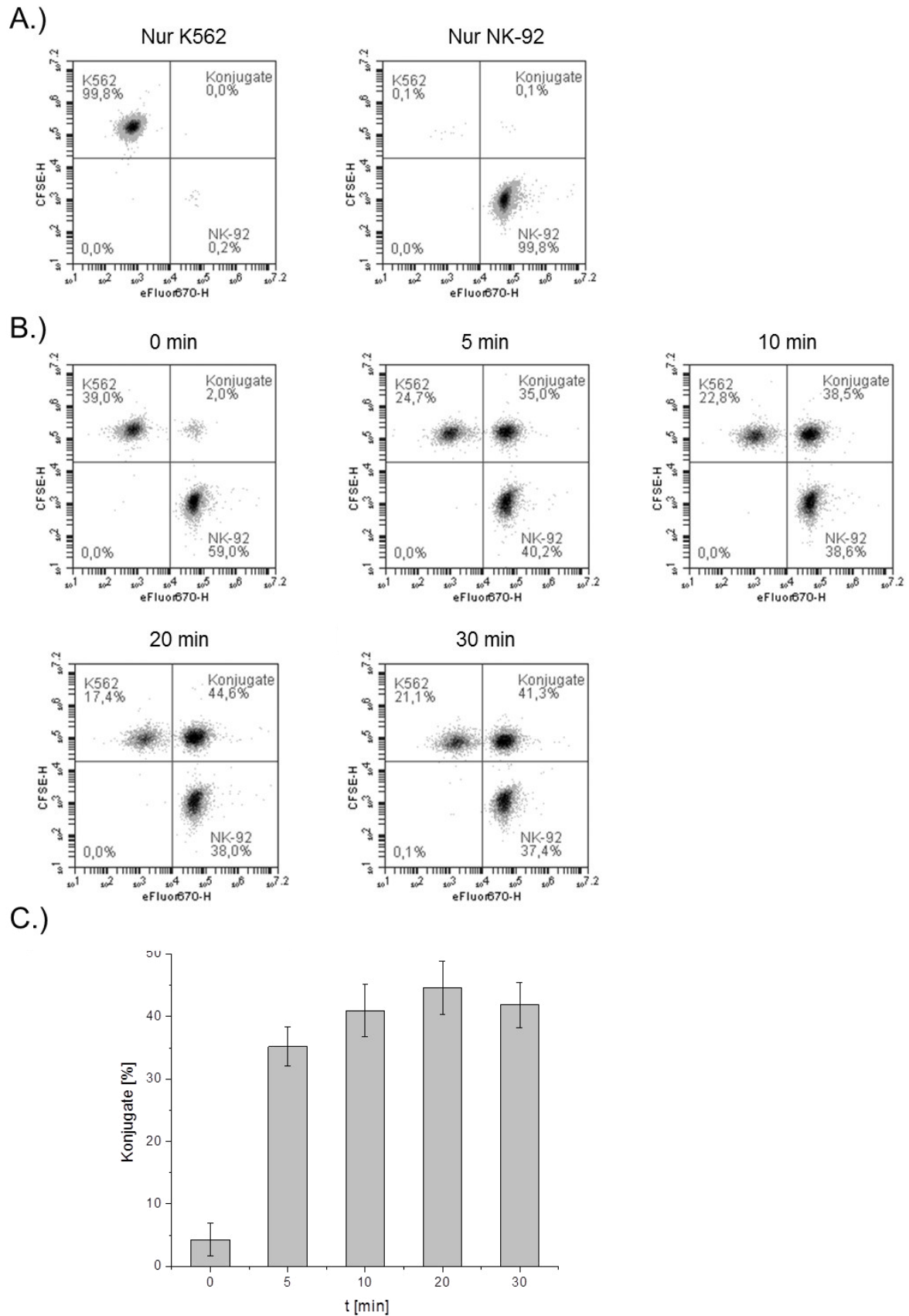


Abbildung 19: Zeitabhängigkeit des Konjugat-Assays

K562-Zellen wurden mit CFSE und NK-92-Zellen mit eFluor670 gefärbt. Beide Zelllinien wurden für den Assay einzeln gemessen um die Gates setzen zu können (A.). Um die Zeitabhängigkeit zu untersuchen, wurden die Zellen nach dem Zentrifugationsschritt unterschiedlich lange bei 37 °C inkubiert. Gezeigt sind repräsentative Dot-Plots der verschiedenen Zeitpunkte (B.). Des Weiteren gezeigt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten (C.).

Der Versuch zeigt außerdem, dass es sich bei der Konjugatbildung wie erwartet um einen aktiven Prozess handelt, der eine gewisse Zeit in Anspruch nimmt. Nur die Zentrifugation der Zellen ist nicht ausreichend für die Bildung von Konjugaten. Erst nach einer Inkubationszeit von 5 min bilden sich stabilere Zell-Zell-Kontakte.

Um die Konjugatbildung nach MGO- oder GO-Behandlung zu untersuchen, wurden die NK-Zellen für 4 h mit MGO oder GO inkubiert und direkt im Anschluss der Konjugat-Assay durchgeführt. Dabei wurden die Werte für unbehandelte Zellen als 100 % festgelegt und Veränderungen relativ dazu betrachtet. Bei der Behandlung mit MGO (Abbildung 20 A) wurden bei allen verwendeten Konzentrationen signifikant weniger Konjugate gebildet als bei der Kontrolle. Die Behandlung mit 0,3 mM MGO sorgte für eine Reduktion der Konjugatbildung um etwa 20 %. Bei einer Konzentration von 0,6 mM wurden nur noch etwa 55 % der Konjugate gebildet. Bei einer Inkubation mit höheren Konzentrationen von 1 mM oder 2 mM fand kaum noch eine Bildung von Konjugaten statt. Insgesamt hatte die MGO-Behandlung einen starken negativen Effekt auf die Konjugatbildung. Eine Behandlung mit GO (Abbildung 20 B) hatte ebenfalls einen negativen Effekt, der allerdings nicht so stark ausgeprägt war. Bei der Inkubation mit 0,6 mM und 1 mM GO war eine leichte Verringerung der Konjugatbildung um 5 % bzw. 10 % sichtbar. Diese Änderungen waren allerdings nicht signifikant. Bei einer Konzentration von 2 mM war eine signifikante Verringerung der Konjugate um ca. 15 % zu beobachten. Sowohl bei MGO als auch bei GO war ein negativer Einfluss auf die Konjugatbildung zu sehen. Bei gleicher Konzentration hatte eine Inkubation mit MGO allerdings einen viel stärkeren Einfluss als die Inkubation mit GO.

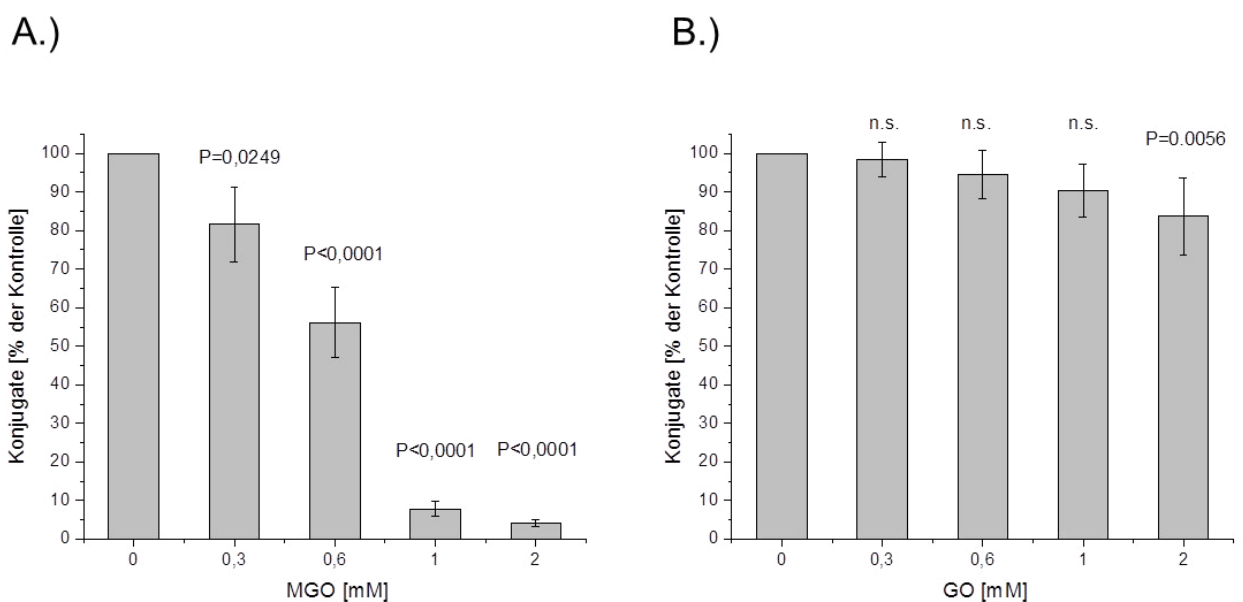


Abbildung 20: Konjugatbildung der NK-92-Zellen nach MGO- und GO-Behandlung

Die NK-92-Zellen wurden für 4 h in Medium mit 1 % FKS mit verschiedenen Konzentrationen von MGO (A.) und GO (B.) inkubiert. Anschließend wurde der Konjugat-Assay durchgeführt. Die Werte für unbehandelte Zellen wurden als 100 % festgelegt und Veränderungen relativ dazu betrachtet. Gezeigt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei (A.) bzw. fünf (B.) unabhängigen Experimenten.

3.1.1.5 Zytotoxizitäts-Assay

Wenn ein Kontakt zwischen NK-Zellen und Zielzellen stattgefunden und sich eine immunologische Synapse gebildet hat, kommt es nach einem aktivierenden Signal anschließend zur Lyse der Zielzelle durch die NK-Zelle. Mit Hilfe eines Zytotoxizitäts-Assays kann dieser Prozess quantifiziert werden. Hierbei wurden erneut K562-Zellen als Zielzellen verwendet. Diese Zelllinie exprimiert nur in geringem Maße MHC-1-Moleküle, aber einige Liganden für aktivierende Rezeptoren der NK-Zellen. Dadurch werden K562-Zellen gut von NK-Zellen erkannt und lysiert und sind deshalb eine häufig genutzte Zelllinie, um die lytische Aktivität von NK-Zellen zu untersuchen (Lisovsky et al. 2015).

Um den Zytotoxizitäts-Assay zu testen, wurden zunächst Versuche durchgeführt, bei denen eine vorherige Stimulation mit IL-2 erfolgte. Es ist bekannt, dass NK-92-Zellen IL-2 zum Überleben sowie zur Proliferation benötigen und dass IL-2 maßgeblich die zytotoxische Aktivität dieser Zellen erhöht (Gong et al. 1994; Törnroos et al. 2019). Die NK-92-Zelllinie wird deshalb normalerweise immer in Medium mit IL-2 kultiviert. In diesem Versuch wurden NK-92-Zellen für 24 h ohne IL-2 inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von IL-2 in verschiedenen Konzentrationen und die Inkubation der Zellen für weitere 24 h. Für den Assay wurden die NK-Zellen mit CFSE-gefärbten K562-Zellen inkubiert. Abbildung 21 A zeigt repräsentative Dot-Plots der K562-Zellen, die sich durch ihre CFSE-Färbung von ungefärbten NK-Zellen trennen lassen. Tote Zellen wurden außerdem mit 7-AAD angefärbt. Ohne die NK-92-Zellen gibt es nur wenige tote K562-Zellen. Der Anteil an toten K562-Zellen erhöht sich, wenn NK-Zellen zugegeben werden, die vorher mit IL-2 stimuliert wurden, da diese dann für eine Lyse der K562-Zellen sorgen. Bei der Analyse der Daten wurden die Werte für die höchste Konzentration von 2000 U/ml als 100 % festgelegt und alle anderen Werte relativ dazu betrachtet (Abbildung 21 B). Bei der Verwendung von NK-92-Zellen, welche nicht mit IL-2 inkubiert wurden, ist nur eine sehr geringe Lyserate zu beobachten. Werden die NK-92-Zellen allerdings mit IL-2 stimuliert, erhöht sich konzentrationsabhängig die Lyserate.

Die lytische Aktivität der NK-92-Zellen hängt also wie erwartet von der IL-2-Konzentration ab. und konzentrationsabhängige Unterschiede können mit diesem Assay nachgewiesen werden.

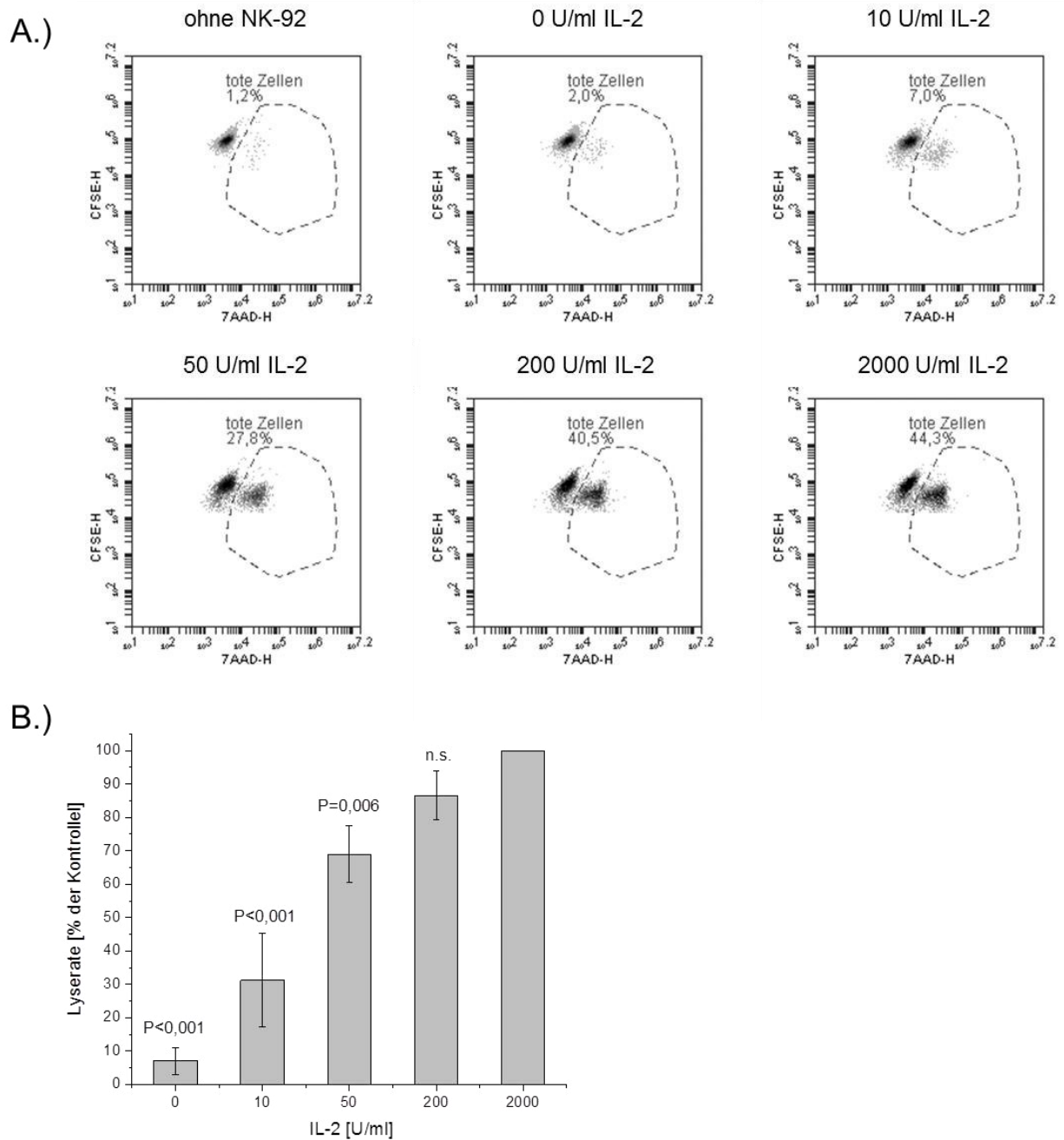


Abbildung 21: Zytotoxizitäts-Assay nach Stimulation mit IL-2

Die NK-92-Zellen wurden für 24 h ohne IL-2 inkubiert und dann für weitere 24 h mit unterschiedlichen IL-2 Konzentrationen kultiviert. Anschließend wurde der Zytotoxizitäts-Assay durchgeführt. Gezeigt sind repräsentative Dot-Plots der K562-Zellen, die ohne NK-92-Zellen oder mit den unterschiedlich stimulierten NK-92-Zellen inkubiert wurden (A.). Außerdem gezeigt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten (B.). Dabei wurde 2000 U/ml als 100 % gesetzt und die anderen Werte relativ dazu betrachtet.

Im vorherigen Versuch konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit MGO oder GO einen negativen Einfluss auf die Bildung von Konjugaten hatte. Deshalb sollte anschließend geprüft werden, ob die Inkubation mit den Dicarbonyl-Verbindungen auch einen Einfluss auf die Lyse der Zielzellen durch die NK-Zellen hat. Dazu wurden die NK-92-Zellen erneut für 4 h mit MGO oder GO inkubiert und im Anschluss der Zytotoxizitäts-Assay durchgeführt. Die

Werte für unbehandelte Zellen wurden als 100 % festgelegt und Veränderungen relativ dazu betrachtet. Bei einer MGO-Konzentration von 0,3 mM (Abbildung 22 A) konnte kein Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden. Nach einer Behandlung mit 0,6 mM MGO betrug die Lyserate nur noch etwa 65 % der Kontrolle. Bei Konzentrationen von 1 mM und 2 mM lag die Lyserate nur noch bei 17 % bzw. 7 %. Die Behandlung mit GO (Abbildung 22 B) hatte einen weitaus weniger drastischen Effekt auf die lytische Aktivität der NK-92-Zellen. Bei 0,3 mM und 0,6 mM waren keine Veränderungen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu sehen. Eine Behandlung mit 1 mM GO sorgte für eine Reduzierung der Lyserate um ca. 10 %. Diese Änderung war allerdings nicht signifikant. Bei der Behandlung mit 2 mM GO war die Lyserate signifikant reduziert und betrug nur noch etwa 75 %. MGO hatte, ähnlich wie bei der Konjugatbildung, einen deutlich stärkeren Einfluss auf die lytische Aktivität der NK-Zellen als GO.

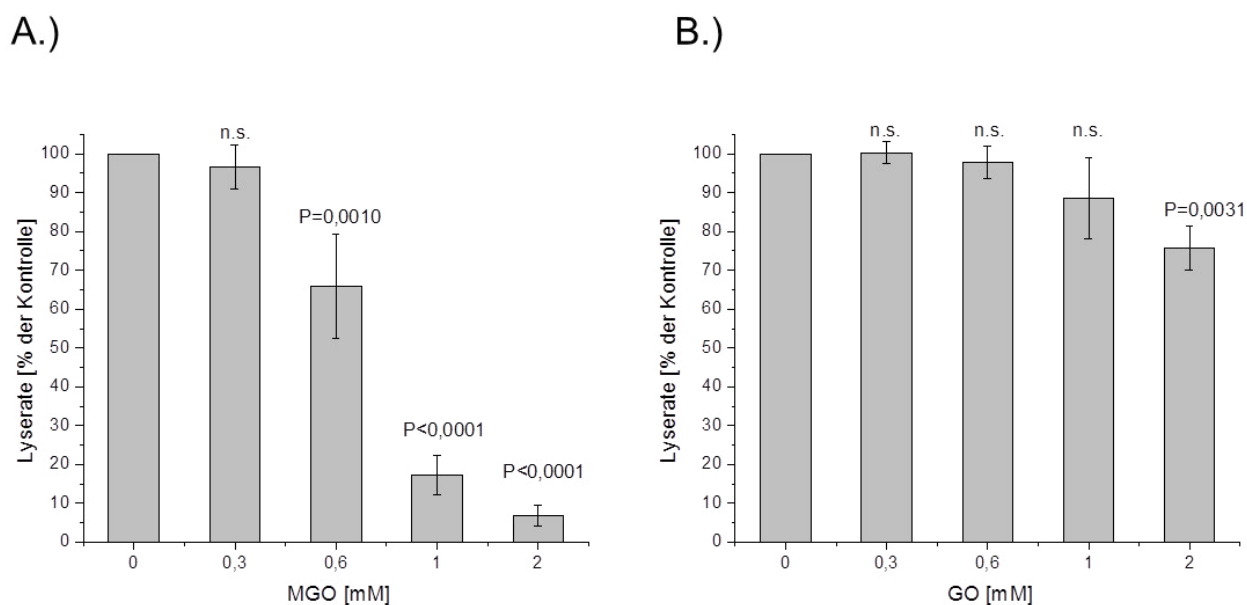


Abbildung 22: Zytotoxische Aktivität der NK-Zellen nach MGO- und GO-Behandlung

Die NK-92-Zellen wurden für 4 h in Medium mit 1 % FKS mit verschiedenen Konzentrationen von MGO (A.) und GO (B.) inkubiert. Anschließend wurde der Zytotoxizitäts-Assay durchgeführt. Die Werte für unbehandelte Zellen wurden als 100 % festgelegt und Veränderungen relativ dazu betrachtet. Gezeigt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von jeweils drei unabhängigen Experimenten.

3.1.2 Glykierung von K562-Zellen

In den vorherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung von NK-Zellen mit MGO oder GO zu einer Glykierung, sowie zu einer Reduzierung der Konjugatbildung und Lyserate führte. Wichtig für die korrekte Funktion der NK-Zellen ist ein Kontakt mit den entsprechenden Zielzellen. Kann dieser Kontakt nicht stattfinden, hat dies einen negativen Einfluss auf die Lyserate. Im Folgenden sollte deshalb überprüft werden, welche

Auswirkungen eine Glykierung der Zielzellen auf Konjugatbildung und Lyserate der NK-Zellen hatte. Dazu wurden die K562-Zellen, genau wie in den vorherigen Versuchen die NK-92-Zellen, für 4 h mit verschiedenen MGO- und GO-Konzentrationen inkubiert.

3.1.2.1 Nachweis der Glykierung

Zuerst wurden die Proteine der K562-Zellen isoliert und ein Western-Blot mit einem Anti-CML Antikörper durchgeführt, um die Glykierung nachzuweisen. Wie auch schon bei den NK-Zellen, führte eine Behandlung mit MGO (Abbildung 23 A) bzw. mit GO (Abbildung 23 B) zu einer Glykierung, die sich mittels Western-Blot nachweisen ließ. Die gleichmäßige Beladung wurde durch Inkubation mit einem Anti-Aktin Antikörper (Abbildung 23) und der Ponceau-Färbung überprüft (siehe Anhang, Abbildung 34, Seite 102).

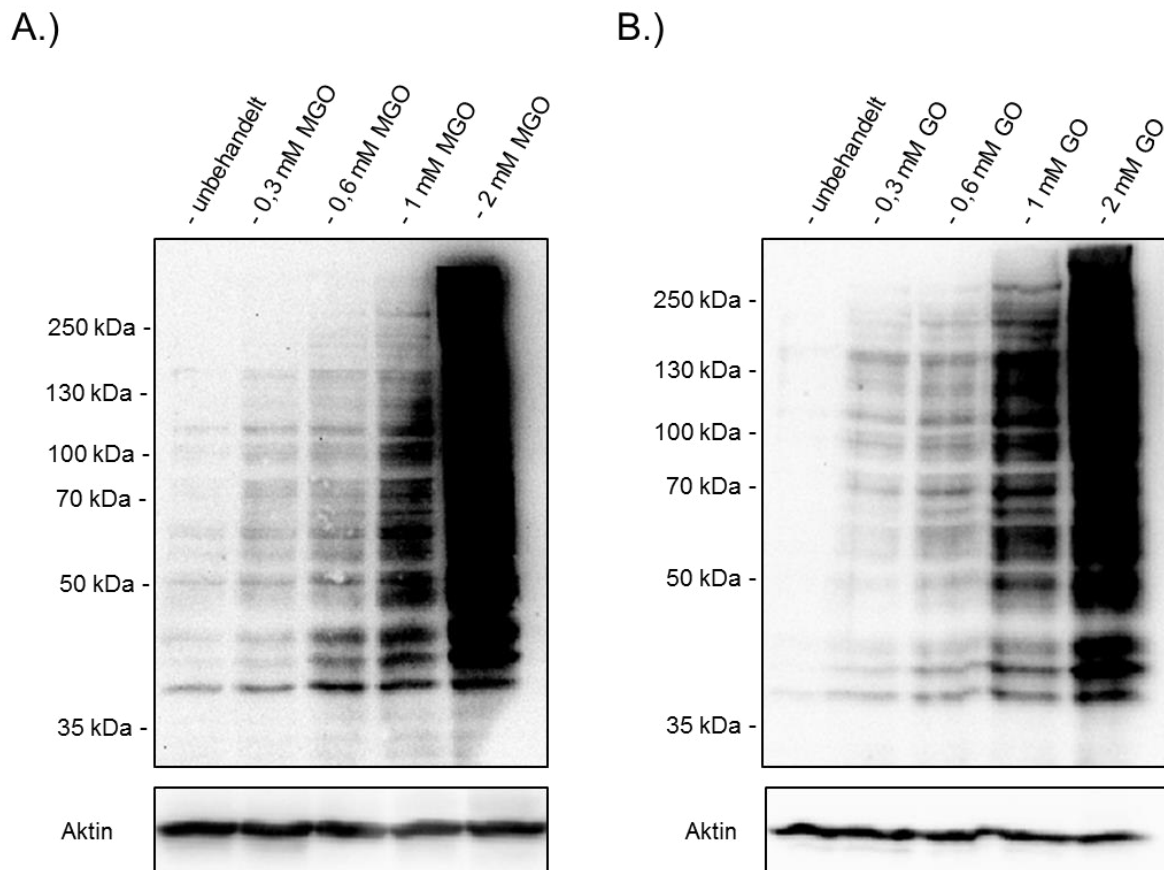


Abbildung 23: Nachweis der Glykierung der K56-Zellen

Die K562-Zellen wurden für 4 h in Medium mit 1% FKS mit verschiedenen MGO (A.) und GO (B.) Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurden die Proteine isoliert, mittels SDS-Page aufgetrennt und ein Western-Blot durchgeführt. Dabei wurde ein Anti-CML Antikörper (CML-26, Abcam) verwendet, der an AGE-modifizierte Proteine binden kann. Als Ladekontrolle wurde außerdem eine Inkubation mit einem Anti-Aktin Antikörper durchgeführt. Gezeigt sind repräsentative Western-Blots von drei unabhängigen Experimenten.

3.1.2.2 Viabilität

Wie bereits bei den NK-Zellen sollte außerdem festgestellt werden, ob die Behandlung mit MGO oder GO einen Einfluss auf die Viabilität der Zellen hatte. Dazu wurden K562-Zellen mit 7-AAD und Annexin V (gekoppelt an APC) inkubiert und im Durchflusszytometer gemessen. Weder bei der Behandlung mit MGO (Abbildung 24 A) noch bei der Behandlung mit GO (Abbildung 24 B) konnten signifikante Veränderungen bei der Anzahl der lebenden Zellen festgestellt werden. Der Anteil der lebenden Zellen lag bei allen verwendeten MGO-Konzentrationen bei über 90 % und bei allen verwendeten GO-Konzentrationen bei über 87 %. Die Zellzahl nach der Behandlung wurde ebenfalls bestimmt. Auch hier waren keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten (Daten hier nicht gezeigt).

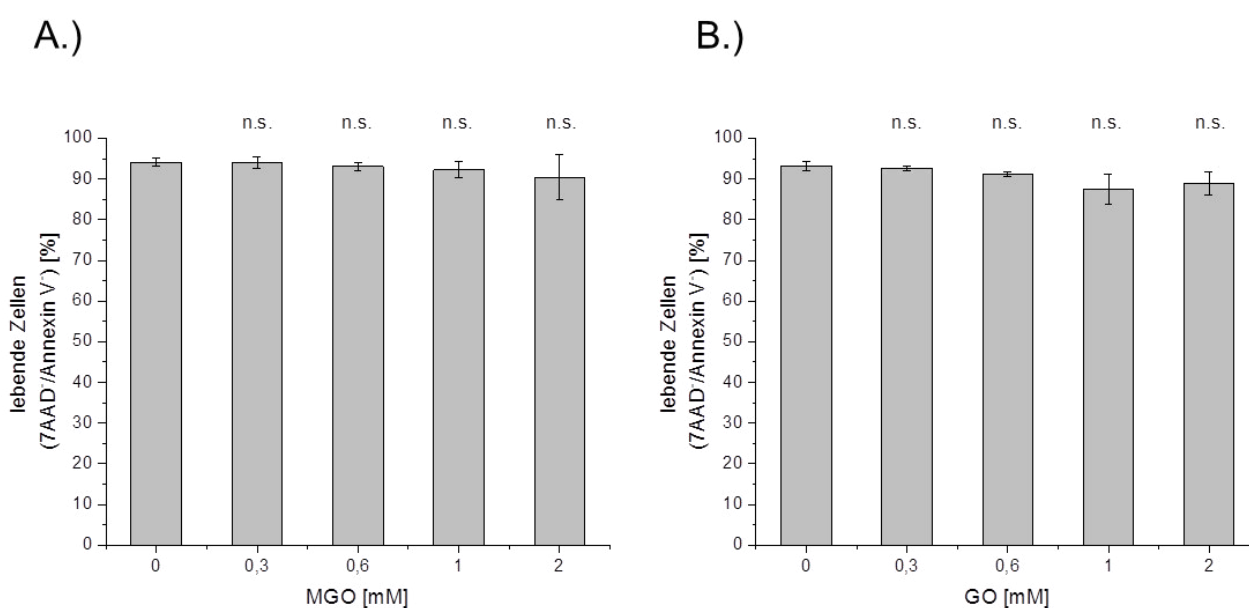


Abbildung 24: Viabilität der K562-Zellen

Die K562-Zellen wurden für 4 h in Medium mit 1 % FKS mit verschiedenen Konzentrationen von MGO (A.) und GO (B.) inkubiert und der Anteil an Zellen bestimmt, die negativ für 7-AAD und Annexin V waren. Bei diesen handelt es sich um die lebenden Zellen. Gezeigt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von vier (A.) bzw. drei (B.) unabhängigen Experimenten.

3.1.2.3 Konjugatbildung

Eine Behandlung der K562-Zellen mit MGO und GO führte zu einer Glykierung der Zellen. Diese Glykierung könnte sich eventuell auf den Zell-Zell-Kontakt auswirken. Es wurde deshalb getestet, ob die Glykierung der K562-Zellen einen Effekt auf die Konjugatbildung hatte. Dazu wurde erneut der Konjugat-Assay durchgeführt, wobei diesmal die K562-Zellen mit MGO und GO inkubiert wurden. Nach einer Behandlung mit 0,3 mM bzw. 0,6 mM MGO wurden geringfügig weniger Konjugate gebildet (Abbildung 25 A). Diese Veränderungen waren allerdings nicht signifikant. Erst nach einer Behandlung der K562-Zellen mit 1 mM MGO war die Bildung von Konjugaten signifikant reduziert. Im Vergleich mit den

unbehandelten Zellen wurden nur noch etwa 86 % der Konjugate gebildet. Eine Behandlung mit 2 mM MGO hatte ebenfalls eine signifikante Reduzierung der Konjugatbildung zur Folge. Der Anteil der Konjugate betrug nur noch etwa 70 %. Auch die Behandlung mit GO hatte eine Reduzierung der Konjugatbildung zur Folge. Nach einer Inkubation mit 0,3 mM GO wurden nur noch etwa 88 % der Konjugate gebildet (Abbildung 25 B). Diese Veränderung war allerdings nicht signifikant. Bei einer Behandlung mit 0,6 mM, 1 mM und 2 mM GO zeigten sich hingegen signifikante Veränderungen bei der Konjugatbildung. Bei einer Konzentration von 0,6 mM wurden nur noch etwa 84 % der Konjugate gebildet. Eine Behandlung mit 1 mM bzw. 2 mM sorgte für eine Reduzierung der Konjugatbildung auf etwa 77 % bzw. etwa 75 %. Insgesamt zeigten sich ähnliche Effekte bei einer Inkubation mit MGO und GO.

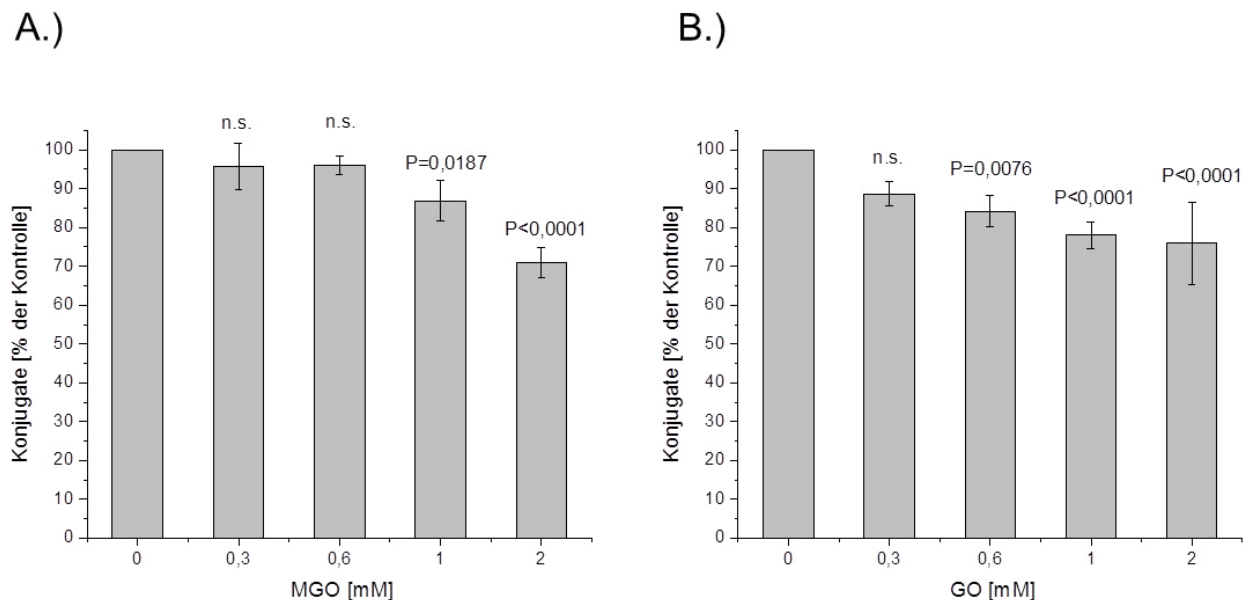


Abbildung 25: Konjugat-Assay mit glykierten K562-Zellen

Die K562-Zellen wurden für 4 h in Medium mit 1 % FKS mit verschiedenen Konzentrationen von MGO (A.) und GO (B.) inkubiert. Anschließend wurde der Konjugat-Assay durchgeführt. Die Werte für unbehandelte Zellen wurden als 100 % festgelegt und Veränderungen relativ dazu betrachtet. Gezeigt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei (A.) bzw. vier (B.) unabhängigen Experimenten.

3.1.2.4 Zytotoxizität

Da die Behandlung der K562-Zellen mit MGO und GO für eine Verringerung der Konjugatbildung sorgte, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob diese Behandlung auch einen Einfluss auf die Lyse der K562-Zellen durch NK-Zellen hat. Dazu wurden erneut die K562-Zellen mit MGO und GO inkubiert und im Anschluss mit unbehandelten NK-92-Zellen für den Zytotoxizitäts-Assay verwendet.

Die Behandlung mit MGO sorgte nur bei einer Konzentration von 1 mM für eine signifikante Veränderung (Abbildung 26 A). Diese führte zu einer Reduzierung der Lyserate auf etwa 82 %. Allerdings war bei 0,6 mM und 2 mM die Lyserate ebenfalls reduziert. Sie betrug nur noch etwa 93 % bzw. 89 %. Eine Inkubation mit GO hatte nur bei der höchsten Konzentration von 2 mM einen signifikanten Einfluss auf die Lyserate (Abbildung 26 B). Diese war auf etwa 88 % reduziert. Bei 0,3 mM und 0,6 mM waren keine Veränderungen zu beobachten, während eine Behandlung mit 1 mM zu einer Reduzierung der Lyserate auf etwa 94 % führte. Insgesamt zeigten sich, wie schon beim Konjugat-Assay, ähnliche Effekte bei der Behandlung mit MGO und GO.

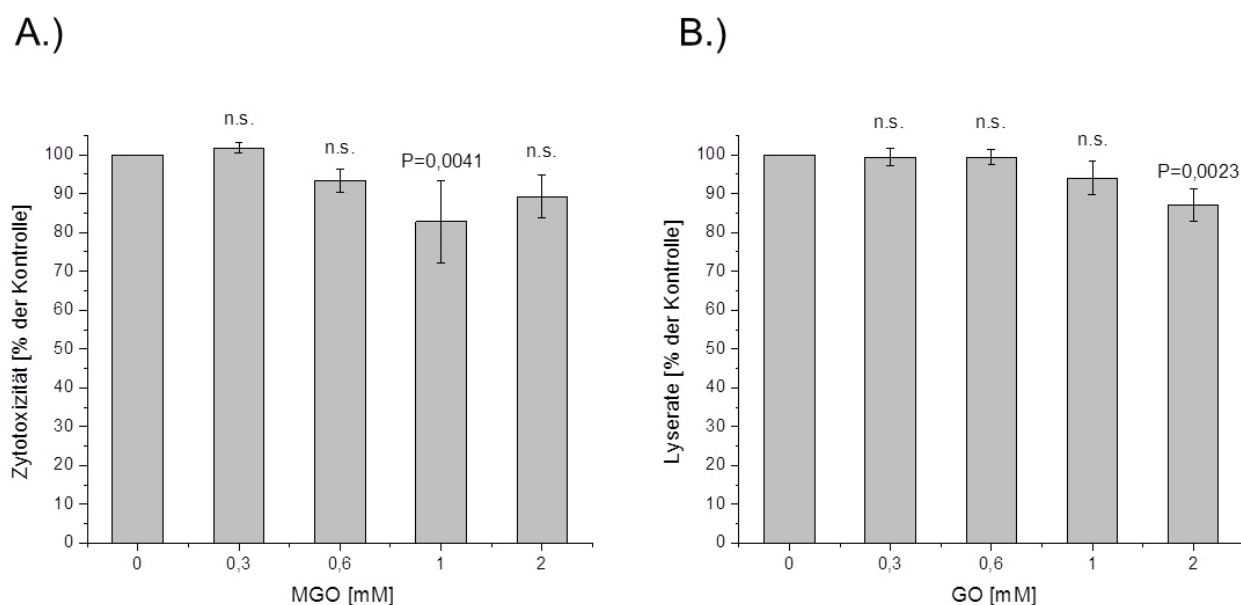


Abbildung 26: Zytotox-Assay mit glykierten K562-Zellen

Die K562-Zellen wurden für 4 h in Medium mit 1 % FKS mit verschiedenen Konzentrationen von MGO (A.) und GO (B.) inkubiert. Anschließend wurde der Zytotoxizitäts-Assay durchgeführt. Die Werte für unbehandelte Zellen wurden als 100 % festgelegt und Veränderungen relativ dazu betrachtet. Gezeigt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von vier (A.) bzw. drei (B.) unabhängigen Experimenten.

3.2 Analyse der Sialyltransferasen in NK-Zellen

NK-Zellen tragen sialylierte Proteine auf ihrer Oberfläche. Als endständige Zucker sind Sialinsäuren im direkten Kontakt mit der Umgebung der Zelle, weshalb sie häufig eine Rolle bei der Zell-Zell-Interaktion spielen. Für die Verknüpfung von Sialinsäuren mit Oberflächenproteinen und Lipiden sorgen spezielle Sialyltransferasen im Golgi.

Allerdings ist wenig über die Expression der Sialyltransferasen und ihre Regulierung in NK-Zellen bekannt. Im zweiten Teil der Arbeit soll deshalb festgestellt werden, welche

Sialyltransferasen in NK-Zellen exprimiert werden und wie sich ihre Expression nach Aktivierung und bei Dicarbonyl-Stress verändert.

3.2.1 Primer Design und Test

Es wurden Primersequenzen für alle 20 humanen Sialyltransferasen ausgewählt (siehe Abschnitt 2.1.5, Seite 26). Die mit diesen Primern erzeugten Produkte waren alle zwischen 270 und 360 bp groß. Um die Primer zu testen, wurde in der Literatur nach Positiv-Kontrollen für jede der 20 humanen Sialyltransferasen gesucht. Dabei wurden insgesamt sieben verschiedene Zelllinien verwendet. Eine Zusammenfassung der verwendeten Positivkontrollen mit den entsprechenden Quellen ist in Tabelle 3 zu sehen.

Tabelle 3: Positivkontrollen für die Primer

| | Zelllinie | Quelle |
|-------------------|------------------|---------------------------|
| ST8SIA1 | A549 | Lee et al. (2018) |
| ST8SIA2 | SH-SY5Y | Al-Saraireh et al. (2013) |
| ST8SIA3 | NTERA-2 | Gouveia et al. (2012) |
| ST8SIA4 | MDA-MB-231 | Ma et al. (2016) |
| ST8SIA5 | ES-2 | Sung et al. (2018) |
| ST8SIA6 | K562 | Zhang et al. (2015) |
| ST6GALNAC1 | K562 | Sewell et al. (2006) |
| ST6GALNAC2 | MDA-MB-453 | Murugaesu et al. (2014) |
| ST6GALNAC3 | NTERA-2 | Gouveia et al. (2012) |
| ST6GALNAC4 | MDA-MB-231 | Ma et al. (2016) |
| ST6GALNAC5 | MDA-MB-231 | Kurcon et al. (2015) |
| ST6GALNAC6 | MDA-MB231 | Ma et al. (2016) |
| ST6GAL1 | K562 | Ma et al. (2014) |
| ST6GAL2 | SH-SY5Y | Lehoux et al. (2010) |
| ST3GAL1 | MDA-MB-231 | Ma et al. (2016) |
| ST3GAL2 | K562 | Li et al. (2016) |
| ST3GAL3 | NTERA-2 | Gouveia et al. (2012) |
| ST3GAL4 | K562 | Li et al. (2016) |
| ST3GAL5 | MDA-MB-231 | Kurcon et al. (2015) |
| ST3GAL6 | SH-SY5Y | Foti et al. (2010) |

Von den entsprechenden Zelllinien wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Dann wurden PCR-Reaktionen mit allen Primerpaaren und der cDNA der entsprechenden Positivkontrollen durchgeführt. Die Produkte wurden anschließend auf einem 1,5 % Agarosegel mittels Elektrophorese aufgetrennt (Abbildung 27). Alle Primerpaare zeigten bei der entsprechenden Positivkontrolle nur eine einzige Bande in der erwarteten Größe.

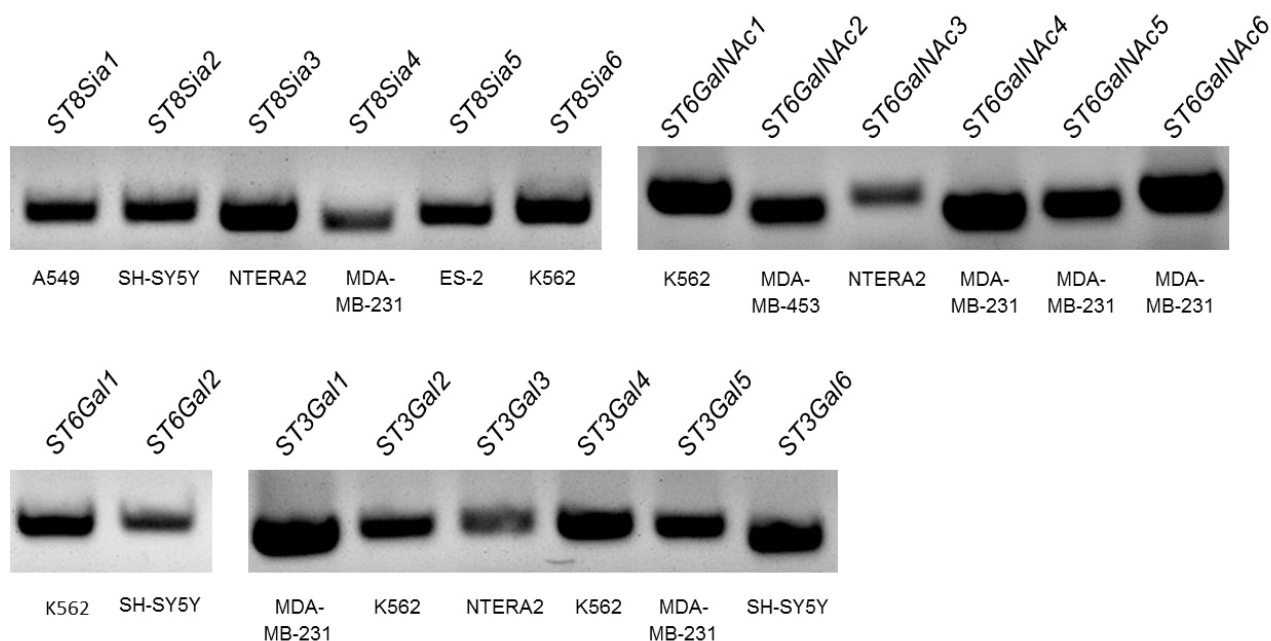


Abbildung 27: Test der Primer

Es wurden PCR-Reaktionen mit allen Primern durchgeführt. Dazu wurde jeweils cDNA der Zelllinien verwendet, die in der Literatur als Positivkontrollen angegeben wurden (siehe Tabelle 3). Die Produkte wurden dann auf ein 1,5 % Agarose Gel, welches mit Ethidiumbromid versetzt war, aufgetragen und nach ihrer Größe aufgetrennt. Die verwendeten Primer stehen über den Banden, die entsprechenden Zelllinien sind darunter genannt. Gezeigt sind repräsentative Beispiele von drei unabhängigen Experimenten.

Für jedes Primerpaar wurden außerdem, auch bei allen später durchgeführten PCR-Reaktionen, Negativkontrollen mitgeführt, die keine cDNA enthielten. Die Primer wurden auch in der Real-Time PCR getestet. Nach jeder PCR-Reaktion wurden dabei Schmelzkurven aufgenommen, indem die Temperatur schrittweise erhöht und die Fluoreszenz gemessen wurde. Somit konnte, neben der Auftrennung auf einem Agarosegel, sichergestellt werden, dass nur ein einziges Produkt entstanden war. Um die optimalen Reaktionsbedingungen für die Real-Time PCR zu finden, wurden die Primern vorab in Gradienten-PCRs mit unterschiedlichen *Annealing*-Temperaturen getestet.

3.2.2 Expression der Sialyltransferasen in NK-Zellen

In einem ersten Versuch sollte zunächst eine Charakterisierung von drei NK-Zelllinien erfolgen, um festzustellen, welche Sialyltransferasen exprimiert werden. Neben den NK-92-

Zellen, wurden die NK-Zelllinien NKL und KHYG-1 untersucht. Von allen drei Zelllinien wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurden PCR-Reaktionen mit allen Primern durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die verschiedenen NK-Zelllinien die gleichen Sialyltransferasen exprimieren. Von den α 2,8-Sialyltransferasen wurden *ST8SIA1*, *ST8SIA4* und *ST8SIA6* exprimiert. Außerdem konnte die Expression der GalNAc α 2,6-Sialyltransferasen *ST6GALNAC4* und *ST6GALNAC6* nachgewiesen werden. Von den zwei β -Galaktosid α 2,6-Sialyltransferasen wurde nur *ST6GAL1* exprimiert. Des Weiteren konnte die Expression der β -Galaktosid α 2,3-Sialyltransferasen *ST3GAL1*, *ST3GAL2*, *ST3GAL3*, *ST3GAL4* und *ST3GAL5* nachgewiesen werden. Insgesamt wurden von den NK-Zelllinien 12 der 20 humanen Sialyltransferasen exprimiert (Abbildung 28).

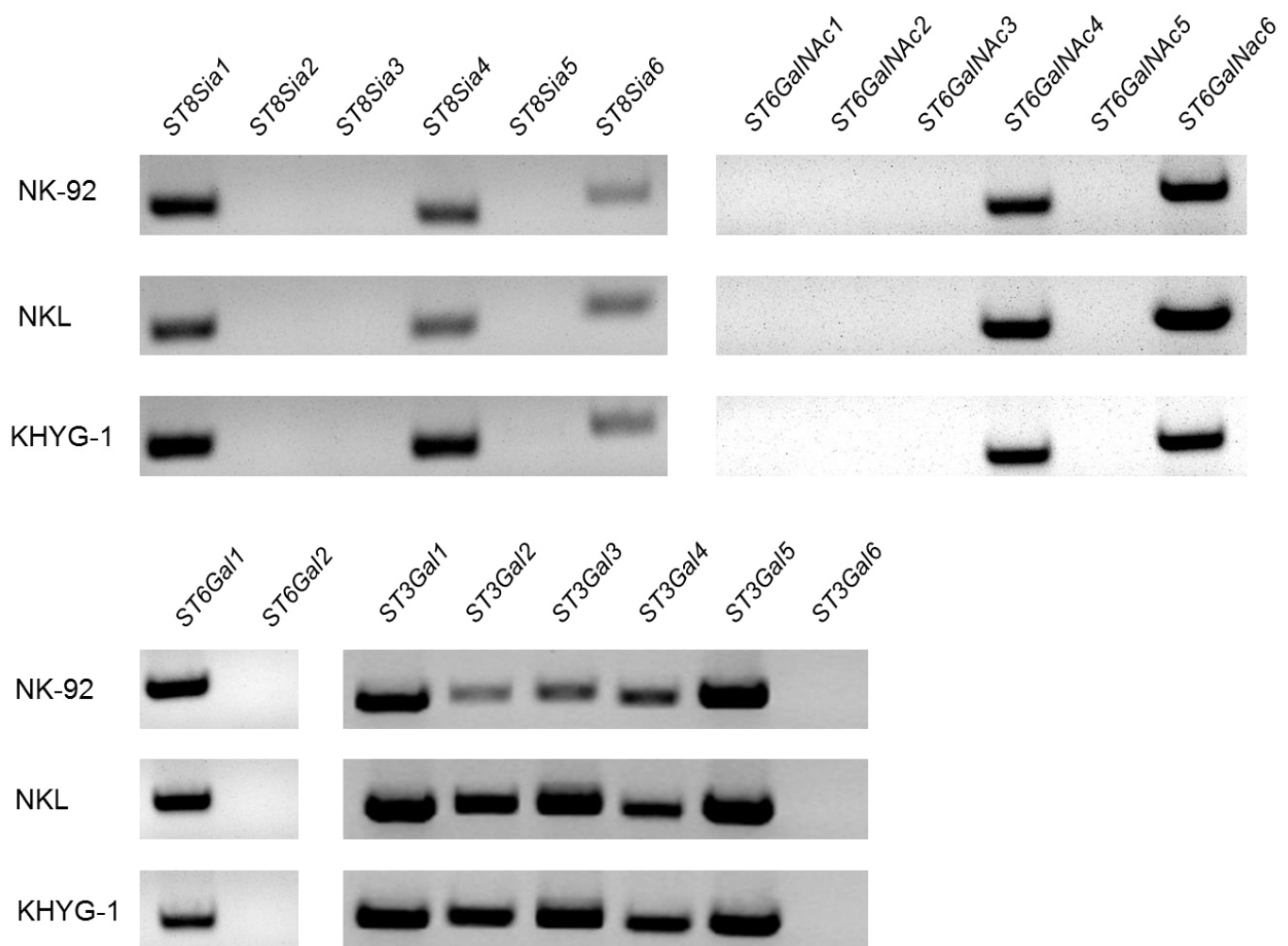


Abbildung 28: Expression der Sialyltransferasen in NK-Zelllinien

Es wurden PCR-Reaktionen mit allen Primern durchgeführt. Dazu wurde cDNA der NK-Zelllinien NK-92, NKL und KHYG-1 verwendet. Die Produkte wurden dann auf ein 1,5 % Agarose Gel, welches mit Ethidiumbromid versetzt war, aufgetragen und nach ihrer Größe aufgetrennt. Gezeigt sind repräsentative Beispiele von drei unabhängigen Experimenten.

Zusätzlich wurde RNA aus Zellpellets von primären NK-Zellen von drei Spendern isoliert. Anschließend wurden ebenfalls PCR-Analysen durchgeführt. Bei den α 2,8-Sialyltransferasen und den GalNAc α 2,6-Sialyltransferasen zeigte sich die gleiche Expression wie auch bei den

NK-Zelllinien, nämlich eine Expression von *ST8SIA1*, *ST8SIA4*, *ST8SIA6*, *ST6GALNAC4* und *ST6GALNAC6*. Außerdem wurde die Sialyltransferase *ST6GAL1* von den NK-Zellen von allen drei Spendern exprimiert. Im Vergleich zu den NK-Zelllinien konnte allerdings bei zwei von drei Spendern außerdem *ST6GAL2* nachgewiesen werden. Außerdem exprimieren die primären NK-Zellen die β -Galaktosid α 2,3-Sialyltransferasen *ST3GAL1*, *ST3GAL2*, *ST3GAL3*, *ST3GAL4* und *ST3GAL5*. Bei zwei von drei Spendern wurde außerdem *ST3GAL6* exprimiert (Abbildung 29).

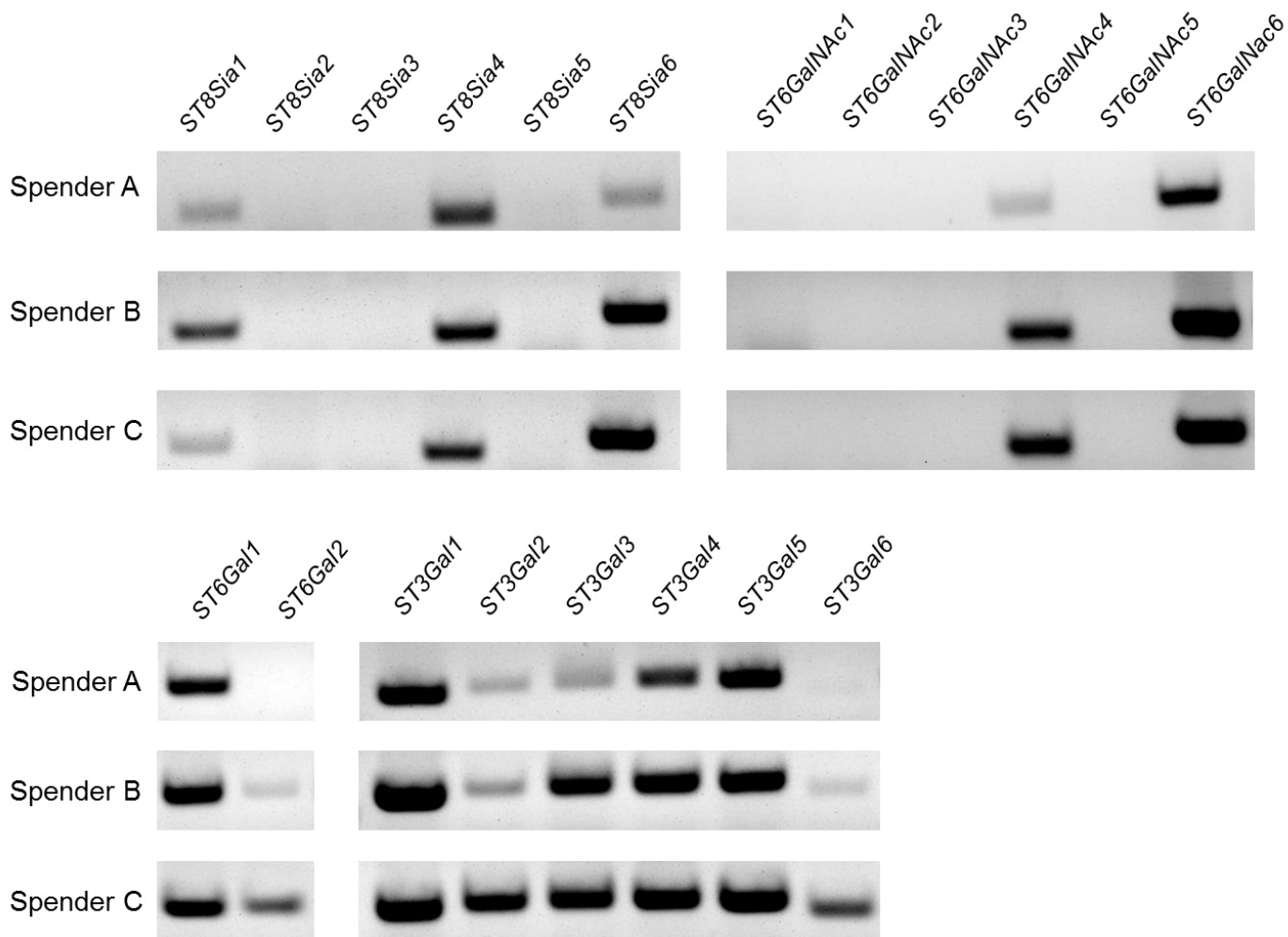


Abbildung 29: Expression der Sialyltransferasen in primären NK-Zellen

Es wurden PCR-Reaktionen mit allen Primern durchgeführt. Dazu wurde cDNA von drei verschiedenen Spendern verwendet. Die Produkte wurden dann auf ein 1,5 % Agarose Gel, welches mit Ethidiumbromid versetzt war, aufgetragen und nach ihrer Größe aufgetrennt.

Somit exprimieren die NK-Zelllinien alle Sialyltransferasen, die auch in primären NK-Zellen exprimiert werden. Zusätzlich wurde bei zwei von drei Spendern auch eine Expression von *ST6GAL2* und *ST3GAL6* nachgewiesen, welche nicht in den NK-Zelllinien exprimiert wurden. Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse der PCR-Analysen in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Expression der Sialyltransferasen in NK-Zellen

| | NK-92 (n=3) | NKL (n=3) | KHYG-1 (n=3) | primäre NK-Zellen (von 3 Spendern) |
|-------------------|----------------|--------------|-----------------|---------------------------------------|
| ST8SIA1 | + | + | + | 3/3 |
| ST8SIA2 | - | - | - | - |
| ST8SIA3 | - | - | - | - |
| ST8SIA4 | + | + | + | 3/3 |
| ST8SIA5 | - | - | - | - |
| ST8SIA6 | + | + | + | 3/3 |
| ST6GALNAC | | | | |
| ST6GALNAC1 | - | - | - | - |
| ST6GALNAC2 | - | - | - | - |
| ST6GALNAC3 | - | - | - | - |
| ST6GALNAC4 | + | + | + | 3/3 |
| ST6GALNAC5 | - | - | - | - |
| ST6GALNAC6 | + | + | + | 3/3 |
| ST6GAL | | | | |
| ST6GAL1 | + | + | + | 3/3 |
| ST6GAL2 | - | - | - | 2/3 |
| ST3GAL | | | | |
| ST3GAL1 | + | + | + | 3/3 |
| ST3GAL2 | + | + | + | 3/3 |
| ST3GAL3 | + | + | + | 3/3 |
| ST3GAL4 | + | + | + | 3/3 |
| ST3GAL5 | + | + | + | 3/3 |
| ST3GAL6 | - | - | - | 2/3 |

3.2.3 Expression der Sialyltransferasen nach Stimulation mit IL-2

Im nächsten Schritt sollte analysiert werden, wie sich die Expression der Sialyltransferasen durch Aktivierung der NK-Zellen verändert. Wie bereits erwähnt, beeinflusst IL-2 maßgeblich die Aktivität der NK-92-Zellen (Gong et al. 1994; Törnroos et al. 2019).

NK-92-Zellen wurden für 24 h in Abwesenheit von IL-2 kultiviert. Anschließend wurde 1000 U/ml IL-2 zugegeben und die Zellen weitere 4 h inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nach den 24 h weitere 4 h ohne IL-2 kultiviert wurden. Anschließend wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Darauffolgend fand eine Analyse mittels Real-Time PCR statt. Bei der Analyse der Daten fand eine Normalisierung bezogen auf das *Housekeeping* Gen *B2M* statt. In einer Veröffentlichung von Kaszubowska et al. (2015)

wurden 14 verschiedene *Housekeeping* Gene in NK-92-Zellen vor und nach IL-2 Stimulation getestet. Dabei wurde *B2M* als das Gen mit der stabilsten Expression beschrieben, weshalb es auch in diesem Versuch als *Housekeeping* Gen genutzt wurde. Die Daten für die unbehandelten Zellen wurden 1 gesetzt und die Ergebnisse der mit IL-2 stimulierten Zellen relativ dazu betrachtet. Wie in Abbildung 21 (Seite 52) gezeigt, sorgt IL-2 für eine höhere lytische Aktivität der NK-Zellen. Als weitere Kontrolle für die Aktivierung wurde außerdem die Expression von INF- γ nach der Stimulation mit IL-2 mittel Real-Time PCR bestimmt. Dieses Zytokin wird bei Aktivierung der NK-Zellen vermehrt exprimiert (Hodge et al. 2002), was auch in diesem Versuch gezeigt werden konnte (Abbildung 30). So war durch die IL-2-Stimulation eine ca. 18-fache Erhöhung der INF- γ -Expression zu beobachten.

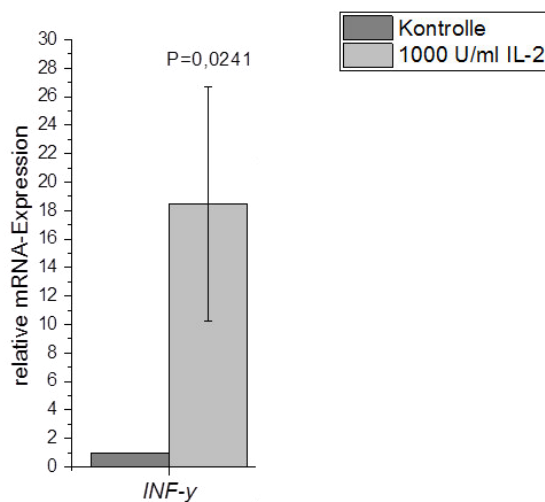


Abbildung 30: INF- γ -Expression nach Stimulation mit IL-2

NK-92-Zellen wurden für 24 h ohne IL-2 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 4 h weiter kultiviert, wobei ein Teil der Zellen mit 1000 U/ml IL-2 behandelt wurde. Im Anschluss wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine Real-Time PCR durchgeführt. Bei der Analyse der Daten fand eine Normalisierung bezogen auf das *Housekeeping* Gen *B2M* statt. Die Daten für die unbehandelten Zellen wurden 1 gesetzt und die Ergebnisse der mit IL-2 stimulierten Zellen relativ dazu betrachtet. Gezeigt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von 4 unabhängigen Experimenten.

Anschließend wurde die Expression der Sialyltransferasen, ebenfalls mittels Real-Time PCR, in stimulierten und unstimulierten NK-Zellen ermittelt. Dazu wurden nur die Primerpaare der Sialyltransferasen verwendet, die im vorherigen Versuch in NK-92-Zellen nachgewiesen werden konnten. Bei drei der vorhandenen Sialyltransferasen gab es signifikante Unterschiede nach der Behandlung mit IL-2 (Abbildung 31). Dies waren *ST8SIA1* mit einer Expression von ca. 40 %, *ST6GAL1* mit einer Expression von ca. 36 % und *ST3GAL1* mit einer Expression von 56 % verglichen mit unbehandelten Zellen. Stimulation mit IL-2 hat also eine verminderte Expression dieser drei Sialyltransferasen zur Folge. Alle anderen Sialyltransferasen zeigten keine Veränderung der Expression nach IL-2 Stimulation.

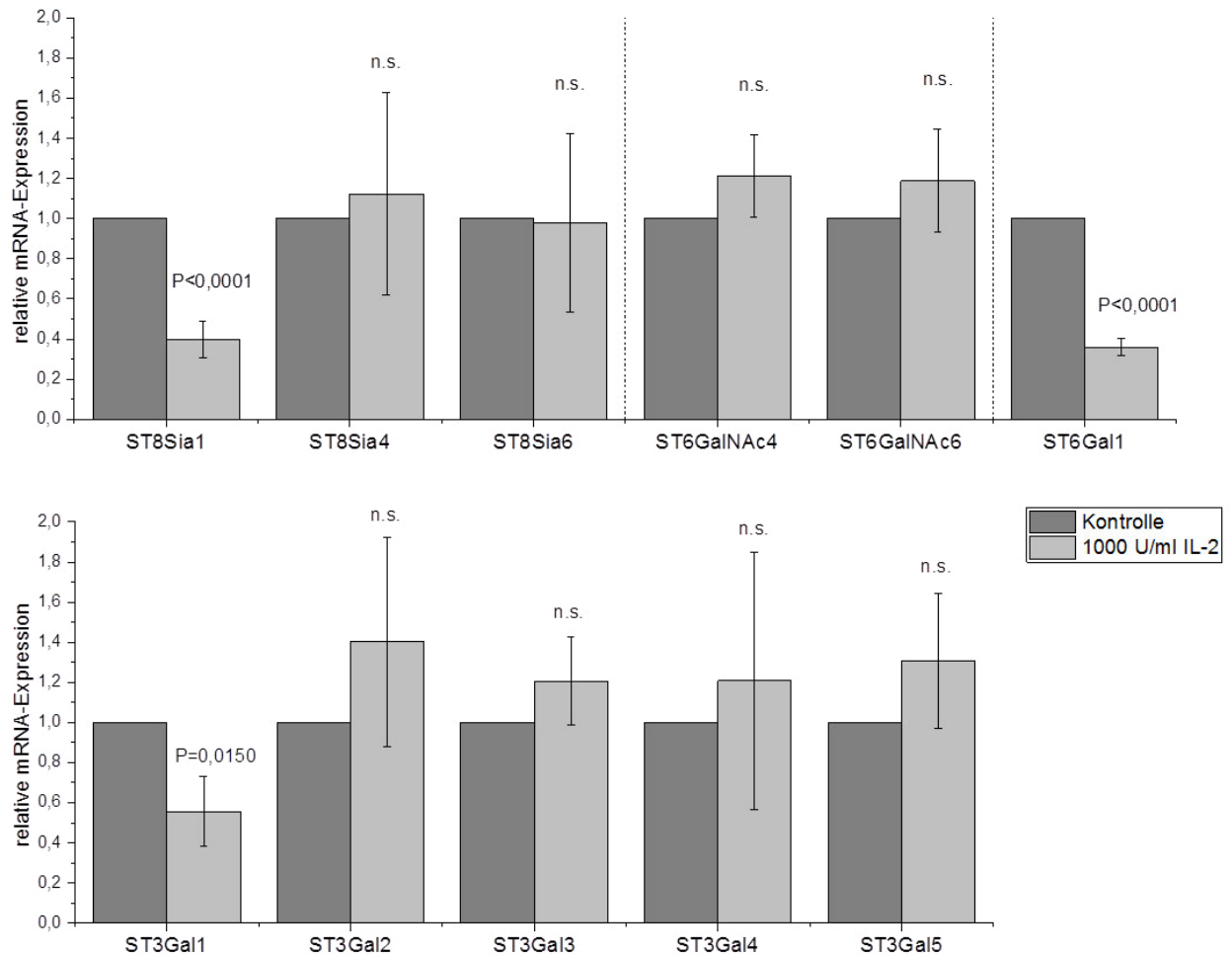


Abbildung 31: Expression der Sialyltransferasen nach Stimulation mit IL-2

NK-92-Zellen wurden für 24 h ohne IL-2 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 4 h weiter kultiviert, wobei ein Teil der Zellen mit 1000 U/ml IL-2 behandelt wurde. Im Anschluss wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine Real-Time PCR durchgeführt. Dabei wurden nur die Primer der Sialyltransferasen verwendet, die auch bei der normalen PCR ein Produkt erzeugt hatten. Bei der Analyse der Daten fand eine Normalisierung bezogen auf das *Housekeeping* Gen *B2M* statt. Die Daten für die unbehandelten Zellen wurden 1 gesetzt und die Ergebnisse der mit IL-2 stimulierten Zellen relativ dazu betrachtet. Gezeigt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von 4 unabhängigen Experimenten.

3.2.4 Expression der Sialyltransferasen nach MGO-Behandlung

Im letzten Schritt erfolgte die Analyse der Expression der Sialyltransferasen nach MGO-Behandlung. Dazu wurde eine Konzentration von 0,6 mM MGO gewählt, da bei dieser Konzentration keine Veränderungen der metabolischen Aktivität zu beobachten war (siehe Abschnitt 3.1.1.2, Seite 45), aber eine deutliche Verringerung der Konjugatbildung und lytischen Aktivität gemessen wurde (siehe Abschnitt 3.1.2.3 und 3.1.2.4, Seite 55 und 56). Die Behandlung mit MGO erfolgte nach demselben Protokoll wie auch bei den vorherigen Versuchen. Anschließend wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Proben mittels Real-Time PCR analysiert. Vier verschiedene *Housekeeping* Gene wurden getestet und mit Hilfe des Excel-Tools NormFinder (Andersen et al. 2004) auf ihre Stabilität bei MGO-Behandlung untersucht. *B2M* war das Gen mit der stabilsten Expression, weshalb bei

diesem Versuch eine Normalisierung bezogen auf dieses Gen stattfand. Erneut wurden nur die Primer der Sialyltransferasen verwendet, die im vorherigen Versuch in NK-92-Zellen nachgewiesen werden konnten. Die Daten für die unbehandelten Zellen wurden 1 gesetzt und die Ergebnisse der MGO-behandelten Zellen relativ dazu betrachtet. *ST8Sia1*, *ST8Sia4* und *ST8Sia6* zeigten eine signifikant reduzierte Expression nach der MGO-Behandlung (Abbildung 32). Die Expression war auf ca. 41 % (*ST8SIA1*), ca. 45 % (*ST8SIA4*) bzw. ca. 55 % (*ST8SIA6*) im Vergleich mit unbehandelten Zellen reduziert. Alle anderen Sialyltransferasen zeigten keine Veränderung durch die MGO-Behandlung.

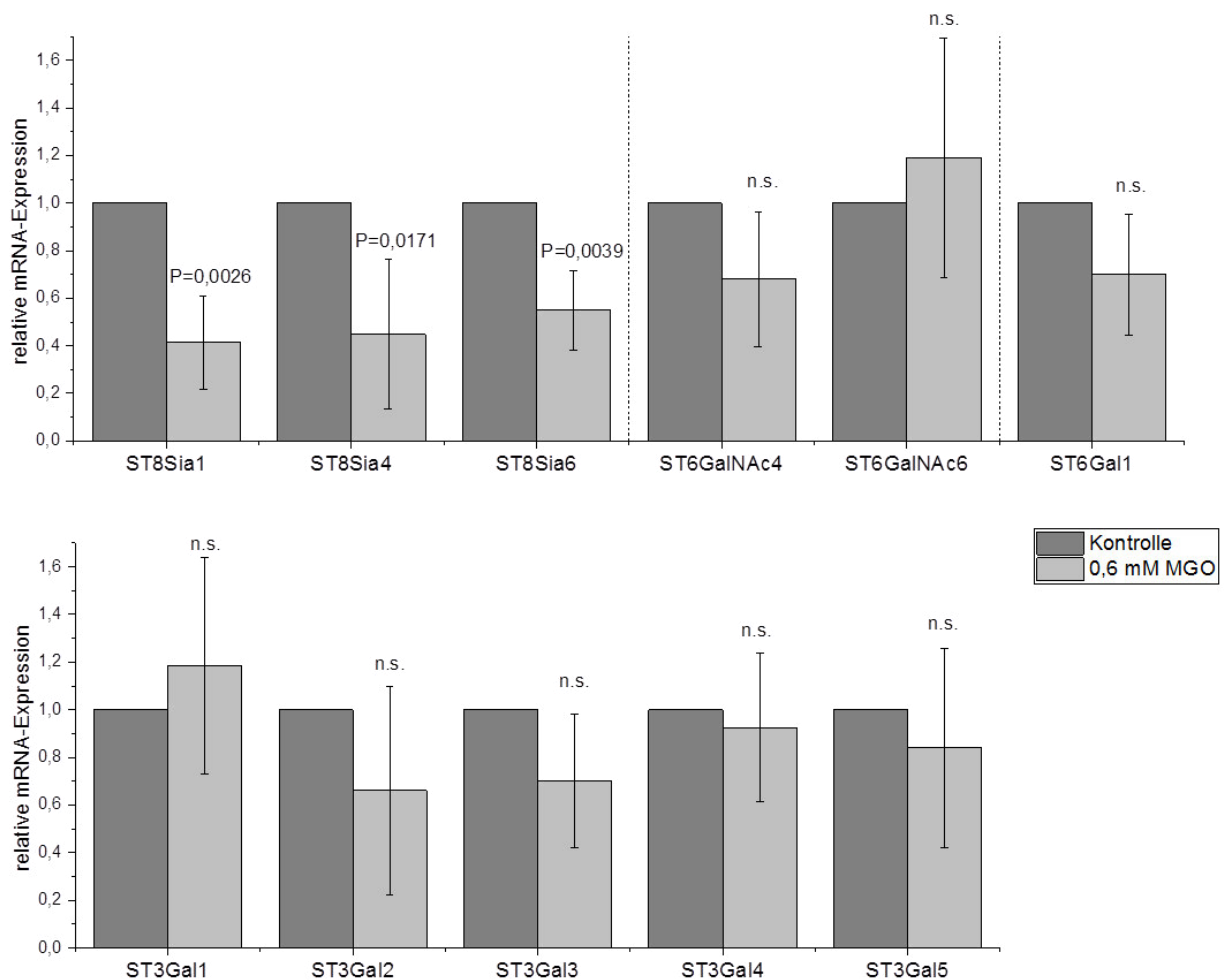


Abbildung 32: Expression der Sialyltransferasen nach MGO-Behandlung

NK-92-Zellen wurden für 4 h in Medium mit 1 % FKS ohne MGO (Kontrolle) oder mit 0,6 mM MGO inkubiert. Im Anschluss wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Dann wurde eine Real-Time PCR durchgeführt. Dabei wurden nur die Primer der Sialyltransferasen verwendet, die auch bei der normalen PCR ein Produkt erzeugt hatten. Anschließend fand eine Normalisierung bezogen auf das *Housekeeping* Gen *B2M* statt. Die Daten für die unbehandelten Zellen wurden 1 gesetzt und die Ergebnisse der MGO-behandelten Zellen relativ dazu betrachtet. Gezeigt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von 5 unabhängigen Experimenten.

4 Diskussion

4.1 Einfluss von Dicarbonyl-Stress und Glykierung auf die Funktion von NK-Zellen

4.1.1 Glykierung von NK-Zellen

Zunächst sollte der direkte Einfluss von MGO und GO auf die Aktivität von NK-Zellen untersucht werden. Dazu wurden NK-92-Zellen für 4 h mit verschiedenen Konzentrationen dieser Verbindungen behandelt, was zu einer Glykierung der Zellen führte. Die Viabilität war bei allen Konzentrationen nicht beeinträchtigt. Eine Inkubation mit hohen MGO-Konzentrationen von 1 mM und 2 mM resultierte in einer eingeschränkten metabolischen Aktivität und einer veränderten Zellmorphologie. Insgesamt sorgte die Inkubation mit MGO und GO für eine Verringerung der NK-Zell-Funktionen. So zeigte sich eine konzentrationsabhängige Reduzierung der Konjugatbildung und der lytischen Aktivität der NK-Zellen durch die Behandlung mit den Dicarbonyl-Verbindungen. MGO hatte dabei einen deutlich stärkeren Effekt als GO.

4.1.1.1 Verwendete Zelllinie

Um die Effekte von Dicarbonyl-Verbindungen auf die NK-Zell-Funktionen zu untersuchen, wurden Zellkultur-Experimente durchgeführt. Dazu wurde die humane NK-Zelllinie NK-92 verwendet. Diese Zelllinie wurde bereits in der Einleitung ausführlich beschrieben (1.3.3). Die Verwendung von primären NK-Zellen wäre aufgrund der spenderabhängigen Diversität problematisch gewesen. Je nach Alter, Geschlecht und Gesundheitszustand des Spenders können die Aktivität der NK-Zellen und ihre Rezeptor-Expression unterschiedlich sein (Almeida-Oliveira et al. 2011; Al-Attar et al. 2016; Viel et al. 2017). Möglicherweise reagieren Zellen von unterschiedlichen Spendern auch unterschiedlich stark auf die Behandlung mit Dicarbonyl-Verbindungen, beispielsweise aufgrund einer unterschiedlichen Expression des Glyoxalase-Systems. Um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können, müsste man deshalb mit den NK-Zellen jedes Spenders alle Experimente durchführen. Dies stellt, sowohl bezogen auf die Zellzahl als auch auf die zeitliche Abfolge von Experimenten, ein erhebliches Problem dar. Deshalb wurde für die durchgeführten Experimente auf NK-92-Zellen zurückgegriffen, um zunächst grundlegende Effekte zu untersuchen. Die in Zellkulturversuchen gewonnenen Erkenntnisse können dann als Basis für humane Studien dienen.

4.1.1.2 Verwendete Konzentrationen

Bei alten Menschen und bei Krankheiten wie Typ-2 Diabetes und Adipositas kommt es zu einer erhöhten Bildung von Dicarbonyl-Verbindungen (Xue et al. 2011; Lapolla et al. 2005;

Masania et al. 2016). Aufgrund der hohen Reaktivität können jedoch nur geringe Mengen nachgewiesen werden. So wurden Konzentrationen von bis zu 8 μM für MGO und bis zu 2,4 μM für GO im menschlichen Blut gemessen (Scheijen und Schalkwijk 2014). Man geht jedoch davon aus, dass 90-99 % der entstehenden Dicarbonyl-Verbindungen direkt mit Makromolekülen reagieren (Allaman et al. 2015). Bei Versuchen mit *Chinese Hamster Ovary* (CHO)-Zellen konnten intrazelluläre MGO-Konzentrationen von über 300 μM gemessen werden, allerdings nur, wenn auch proteingebundenen Moleküle mit einbezogen wurden (Chaplen et al. 1998). Dies legt nahe, dass die tatsächlichen Mengen an entstehenden Dicarbonyl-Verbindungen deutlich höher sind als die im Blut gemessenen.

Möchte man den Effekt, der durch Dicarbonyl-Verbindungen ausgelösten Glykierung in Zellkultur-Experimenten untersuchen, gibt es verschiedene Ansätze. Man kann langfristige Experimente durchführen, bei denen man immer wieder geringe Konzentrationen zugibt. Eine andere Möglichkeit besteht darin, die Zellen für einen kurzen Zeitraum mit höheren Konzentrationen zu inkubieren. Bei langfristigen Experimenten kann es aber auch zu Expressionsänderungen kommen und beobachtete Effekte sind dann nicht mehr nur auf die Glykierung zurückzuführen. Deshalb wurden alle Experimente in dieser Arbeit mit Konzentrationen von 0,3 bis 2 mM in einem Zeitraum von 4 h durchgeführt. Diese Konzentrationen und die Inkubationszeit wurden schon in anderen Zellkultur-Experimenten, welche sich mit den Effekten von Glykierung auf neuronale Zellen beschäftigten, verwendet (Bennmann et al. 2014; Frank et al. 2019). Durch Behandlung mit MGO und GO werden nicht nur die Zellen, sondern auch Proteine im Serum glykiert. Deshalb fand die Inkubation in Medium mit einer geringen Serum-Konzentration (1 % FKS) statt, um eine möglichst hohe Glykierung der Zellen zu erreichen.

4.1.1.3 Viabilität und metabolische Aktivität

Durch die Behandlung der NK-92-Zellen mit MGO und GO kam es zu einer Reduzierung der Konjugatbildung und einer verringerten Lyserate. Dicarbonyl-Verbindungen können in verschiedenen Zelllinien Apoptose auslösen (Du et al. 2000; Kasper et al. 2000; Rachman et al. 2006). Die Konzentration, bei der es zur Apoptose kommt, kann je nach Zellart allerdings sehr unterschiedlich sein. In den durchgeführten Versuchen führte eine Inkubation mit MGO und GO, auch bei hohen Konzentrationen von 1 mM und 2 mM, nicht zur Apoptose der NK-92-Zellen. Dies konnte durch die Färbung mit 7-AAD und Annexin V nachgewiesen werden. Durch die Bindung von Annexin V an Phosphatidylserine können dabei auch Zellen in der frühen Phase der Apoptose erkannt werden. Deshalb ist auszuschließen, dass die reduzierten Funktionen der NK-Zellen auf Apoptose zurückzuführen sind. Vor der Durchführung des Konjugat- bzw. Zytotoxizitäts-Assays, und damit direkt nach der Inkubation mit MGO und GO, wurden die Zellen außerdem erneut gezählt, um die richtigen

E:T Ratios einstellen zu können. Damit wurde sichergestellt, dass die beobachteten Veränderungen nicht durch unterschiedliche Zellzahlen zustande kamen.

Im Vergleich zum Apoptose-Assay war beim MTT-Assay ein verringertes Signal bei hohen MGO-Konzentrationen von 1 mM und 2 mM zu sehen. Fälschlicherweise wird der MTT-Assay in manchen Veröffentlichungen auch als Viabilitäts-Assay beschrieben, da bei erhöhtem Zelltod auch verringerte Werte gemessen werden können. Der Assay basiert aber auf der Reduktion von MTT zu Formazan durch NAD(P)H-abhängige Oxidoreduktasen und ist somit abhängig von der Menge an NAD(P)H (Berridge et al. 2005). Verschiedene Veröffentlichungen beschrieben, dass es zum Teil große Unterschiede zwischen Zellzahl und Viabilität auf der einen Seite und den Werten des MTT-Assays auf der anderen Seite gibt (Jo et al. 2015; Stepanenko und Dmitrenko 2015). Durch die Färbung mit 7-AAD und Annexin V konnte Apoptose sowie eine Schädigung der Membran bei Konzentrationen von 1 mM und 2 mM MGO ausgeschlossen werden. Auch die Zellzahl war nicht verändert. Die niedrigeren Werte beim MTT-Assay sind daher vermutlich auf einen verringerten Metabolismus der Zellen zurückzuführen. Es ist bereits bekannt, dass die Inkubation von Zellen mit MGO oder GO zu Seneszenz führen kann. Die Zellen verlieren die Fähigkeit sich zu teilen (Navarrete Santos et al. 2017). Möglicherweise sorgt dies für einen verringerten Metabolismus und die morphologischen Veränderungen. Bei den MGO-Konzentrationen von 1 mM und 2 mM waren auch die Konjugatbildung und die lytische Aktivität auf ein Minimum reduziert. Werden die NK-Zellen nach der MGO-Behandlung weiter kultiviert, zeigten sich auch morphologische Veränderungen bei den hohen MGO-Konzentrationen. So wurden nach der Behandlung mit 1 mM und 2 mM MGO keine Zellaggregate mehr gebildet, was für diese Zelllinie eigentlich charakteristisch ist. All diese Faktoren legen die Vermutung nahe, dass die Zellen bei den hohen Konzentrationen massiv gestresst sind. Konzentrationen von 1 mM und 2 mM stellen somit vermutlich extreme Beispiele dar. Allerdings waren auch schon bei geringeren Konzentrationen, die nicht zu einer Veränderung von Morphologie und metabolischer Aktivität führen, deutliche Effekte auf die lytische Aktivität der NK-Zellen zu beobachten.

4.1.1.4 Unterschiedliche starke Effekte durch MGO oder GO

Die Behandlung mit MGO hatte einen deutlich stärkeren Effekt verglichen mit GO. Durch die Reaktion der beiden Dicarbonyl-Verbindungen können unterschiedliche AGEs entstehen (Vistoli et al. 2013; siehe auch Abbildung 3 und Abbildung 4, Seite 3 und 4). Diese verschiedenen AGEs haben möglicherweise unterschiedlich starke Auswirkungen auf die Funktion der NK-Zellen. Mit Hilfe des Western-Blots konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit beiden Dicarbonyl-Verbindungen zu einer Glykierung der Zellen führte. Der in diesem Versuch verwendete Antikörper ist gegen CML gerichtet, ein AGE, welches vor

allem bei der Reaktion von GO mit Lysin gebildet wird. In vorherigen Arbeiten wurde jedoch gezeigt, dass der Antikörper auch an AGEs binden kann, die aus MGO gebildet werden (Bennmann et al. 2014; Hussain et al. 2016). Dadurch lässt sich sowohl bei MGO als auch bei GO, ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Glykierung nachweisen. Aufgrund der Tatsache, dass der Antikörper gegen ein spezifisches AGE gerichtet ist, kann der Grad der Glykierung von MGO und GO allerdings nicht miteinander verglichen werden.

MGO ist deutlich reaktiver als GO. Wird ein Protein, z.B. Albumin, *in vitro* mit verschiedenen MGO- und GO-Konzentrationen inkubiert, kommt es bei beiden Verbindungen zu einer Glykierung. Durch MGO entstehen allerdings mehr AGEs als durch GO. Deshalb wird angenommen, dass hauptsächlich MGO und nicht GO verantwortlich für die Glykierung ist, die *in vivo* stattfindet (Sadowska-Bartosz und Bartosz 2016). In wässrigen Lösungen reagieren MGO und GO mit H₂O wobei sich die entsprechenden Mono- und Dihydrat-Verbindungen bilden (Abbildung 33). Bei Dicarbonyl-Verbindungen kann sowohl das Anhydrat, als auch das Monohydrat für eine Glykierung sorgen, wobei das Anhydrat deutlich reaktiver ist (Thornalley et al. 2000).

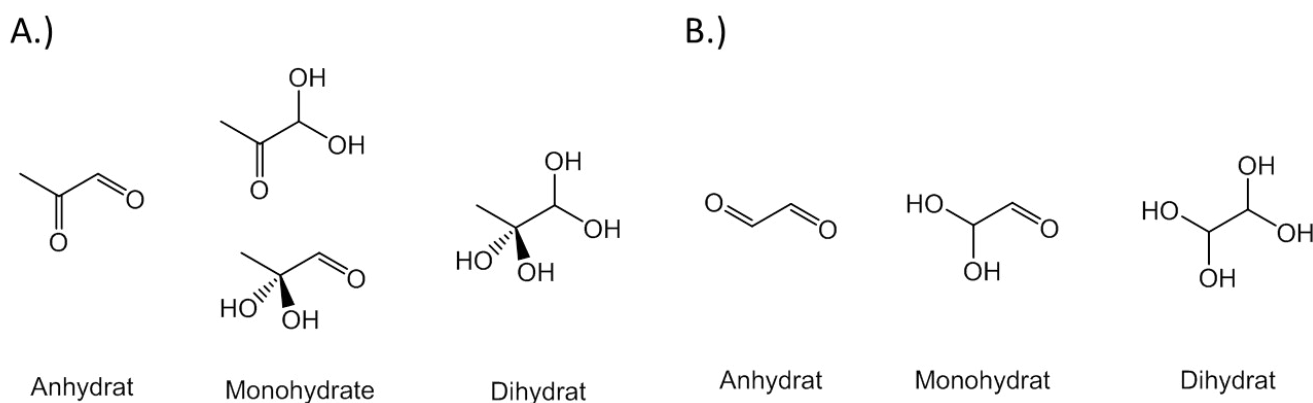


Abbildung 33: An-, Mono- und Dihydrate von MGO und GO

Gezeigt sind die An-, Mono- und Dihydrate von MGO (A.) und GO (B.). Bei der Reaktion von MGO mit H₂O können zwei unterschiedliche Monohydrate entstehen. Erstellt mit Chem Draw nach Rabbani und Thornalley (2014a) und Krizner et al. (2009).

Ca. 1 % der MGO-Moleküle liegen als Anhydrat vor, während es bei den GO-Molekülen nur etwa 0,001 % sind. Durch die erhöhte Menge des Anhydrats kommt die höhere Reaktivität von MGO im Vergleich zu GO zustande (Rabbani und Thornalley 2014a). Da MGO reaktiver als GO ist, kann davon ausgegangen werden, dass bei einer Inkubation der NK-Zellen mit MGO mehr AGE-Modifikationen gebildet werden. Diese stärkere Glykierung der NK-Zellen sorgt vermutlich für die stärkeren Effekte von MGO auf die Aktivität der NK-Zellen.

4.1.1.5 Mögliche Mechanismen

Dicarbonyl-Verbindungen sind in der Lage die Zellmembran zu passieren (Rabbani und Thornalley 2014b). Deshalb kann durch Zugabe dieser Verbindungen ins Zellkultur-Medium sowohl eine Glykierung von extra- als auch von intrazelluläre Proteinen stattfinden (Bennmann et al. 2014).

Eine Glykierung von Oberflächenrezeptoren kann für eine Reduzierung der Liganden-Bindung sorgen, wodurch die Signaltransduktion behindert werden kann (Bennmann et al. 2015). Durch die Inkubation mit den Dicarbonyl-Verbindungen können die aktivierenden Rezeptoren der NK-Zellen glykiert werden, welche dann möglicherweise schlechter an ihre Liganden auf den Zielzellen binden können. Dies würde das aktivierende Signal abschwächen, was für eine Reduzierung der Lyserate sorgt. Die Glykierung von Adhäsionsmolekülen könnte zu einer schlechteren Zell-Zell-Adhäsion führen, was ebenfalls eine Reduzierung der Lyserate zur Folge hätte.

Auch eine Glykierung von intrazellulären Proteinen könnte zu der reduzierten Aktivität beitragen. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Glykierung von Signalproteinen intrazelluläre Signalwege hemmen kann (Giardino et al. 1994; Akhand et al. 2001; Ye et al. 2019). Durch die Behandlung mit MGO oder GO kann es bei den NK-Zellen ebenfalls zu einer Glykierung von intrazellulären Proteinen kommen. Signalwege, die wichtig für die Aktivierung und die Degranulierung sind, könnten somit inhibiert werden. Auch Proteine, die direkt an der Degranulierung beteiligt sind, könnten möglicherweise durch eine Glykierung in ihrer Funktion beeinträchtigt sein.

Insgesamt waren sowohl eine Reduzierung der Konjugatbildung, als auch eine reduzierte lytische Aktivität der NK-Zellen nach Behandlung mit MGO und GO zu beobachten. Beides hängt sehr stark miteinander zusammen. Ohne vorherige Konjugatbildung kann keine Lyse der Zielzelle stattfinden und nur wenn die aktivierenden Signale überwiegen, wird überhaupt eine stabile Synapse gebildet (Abeyweera et al. 2013). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass mehrere der beschriebenen Mechanismen für eine reduzierte NK-Zell-Aktivität verantwortlich sind. Weitere Untersuchungen müssen durchgeführt werden, um genaueres über die Zell-Zell-Interaktionen und die Signalwege zu erfahren, die durch die Glykierung inhibiert sind.

4.1.1.6 Bedeutung für die reduzierte NK-Zell-Aktivität *in vivo*

Die Funktion von NK-Zellen ist im hohen Alter und bei altersbedingten Erkrankungen, wie Typ-2 Diabetes und Adipositas, verringert (Di Lorenzo et al. 1999; O'Shea et al. 2010; Piątkiewicz et al. 2013). Wie von Chiu et al. (2013) gezeigt, hängt die NK-Zell-Aktivität von der metabolischen Umgebung ab. Im erhöhten Alter, sowie bei altersbedingten

Erkrankungen ist eine erhöhte Menge an Dicarbonyl-Verbindungen nachweisbar (Brownlee 2001; Xue et al. 2011; Masania et al. 2016). Es ist bereits bekannt, dass eine erhöhte Glukose-Menge im Plasma negativ mit der Aktivität der NK-Zellen korreliert (Kim et al. 2019). Für die Experimente in dieser Arbeit wurden die Dicarbonyl-Verbindungen MGO und GO, welche direkt aus Glukose entstehen können, verwendet. Die Ergebnisse legen nahe, dass MGO und GO die NK-Zell-Funktionen reduzieren können. Dies zeigt sich dadurch, dass die NK-Zellen nach der Inkubation mit den Dicarbonyl-Verbindungen schlechter an Tumorzellen binden und diese schlechter lysieren konnten. Wie schon in anderen Veröffentlichungen, konnte die erhöhte Reaktivität von MGO bestätigt werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass vor allem eine erhöhte MGO-Konzentration *in vivo* zu einer reduzierten Aktivität der NK-Zellen beitragen kann. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal ein direkter Einfluss von Dicarbonyl-Verbindungen auf die NK-Zell-Aktivität gezeigt werden. Diese Ergebnisse liefern deshalb eine weitere Erklärung für verringerte NK-Zell-Funktionen im erhöhten Alter und bei altersbedingten Erkrankungen.

4.1.2 Glykierung von K562-Zellen

Eine Inkubation der K562-Zellen mit MGO und GO sorgte, wie schon bei den NK-Zellen, für eine Glykierung. Die Viabilität war bei allen verwendeten Konzentrationen nicht verringert. Die Glykierung der K562-Zellen führte zu einer verringerten Konjugatbildung und einer schlechteren Lyse durch NK-Zellen. Allerdings waren diese Effekte nur bei hohen Konzentrationen sichtbar und deutlich geringer als bei einer Inkubation der NK-Zellen mit den Dicarbonyl-Verbindungen. MGO und GO hatten einen ähnlich starken Einfluss auf die NK-Zell-Aktivität.

4.1.2.1 Unterschiede zur Glykierung der NK-Zellen

Im Vergleich mit den NK-Zellen hatte die Behandlung von K562-Zellen mit MGO und GO einen weniger starken Effekt auf die Lyserate. Wie bereits erwähnt, werden durch Zugabe von MGO und GO sowohl intra- als auch extrazelluläre Proteine glykiert (Bennmann et al. 2014). Bei den Tumorzellen hat vermutlich aber nur die Glykierung extrazellulärer Proteine einen Einfluss auf Konjugatbildung und Lyse, da nur diese Proteine direkt mit den NK-Zellen interagieren. Somit können glykierte Proteine auf der Oberfläche der K562-Zellen dafür sorgen, dass diese etwas schlechter von NK-Zellen gebunden werden, was sich in den Ergebnissen des Konjugat-Assay widerspiegelt. Die schlechtere Bindung der NK-Zellen an die K562-Zellen geht dann mit einer Reduzierung der Lyserate einher. K562-Zellen exprimieren nur sehr wenige MHC-1-Moleküle auf ihrer Oberfläche und werden deshalb leicht von NK-Zellen lysiert (Lisovsky et al. 2015). Trotz der Glykierung der Tumorzellen sind NK-Zellen immer noch in der Lage diese Zellen zu erkennen und zu lysieren, auch wenn es zu einer leichten Reduzierung der Lyserate kommt. Die NK-Zellen sind in diesem Fall noch

aktiv, da sie nicht direkt mit den Dicarbonyl-Verbindungen inkubiert wurden. Eine Glykierung der NK-Zellen führt hingegen zu einem Funktionsverlust dieser Zellen und hat deshalb einen weitaus größeren Effekt als eine Glykierung der Tumorzellen. Trotz der höheren Reaktivität von MGO hatten sowohl MGO als auch GO einen vergleichbaren Effekt auf die Konjugatbildung und Lyserate. Möglicherweise gibt es eine Art Schwellenwert, ab dem eine Glykierung der Tumorzellen keinen weiteren Einfluss mehr auf die Lyserate hat.

4.1.2.2 Bedeutung für die Krebsentstehung und Behandlung

Aufgrund seiner toxischen Wirkung in manchen Tumor-Zelllinien, wurde eine mögliche Verwendung von MGO in der Krebstherapie in Erwägung gezogen (zusammengefasst von Talukdar et al. (2009)). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass MGO einen negativen Effekt auf die Funktion von NK-Zellen hat. Somit würde man bei einer Behandlung mit MGO auch die Immunzellen schädigen, die maßgeblich an der Tumorbekämpfung beteiligt sind. Kommt es durch die MGO-Behandlung zu einer Glykierung der Tumorzellen, werden diese schlechter von NK-Zellen lysiert was somit ebenfalls einen positiven Effekt für den Tumor hat.

Eine Glykierung von Tumorzellen kommt auch *in vivo* vor. Viele Krebszellen gewinnen Energie nicht durch den Citratzyklus und die Atmungskette, sondern hauptsächlich aus der anaeroben Glykolyse, selbst unter aeroben Bedingungen. Um die gleiche Menge an ATP zu produzieren, muss die Zelle allerdings deutlich mehr Glukose umsetzen, wodurch es zu einer erhöhten Glykolyse-Rate kommt. Dieses Phänomen wird auch als Warburg-Effekt bezeichnet (zusammengefasst von Schwartz et al. 2017). Durch die erhöhte Glykolyse kommt es zu einer vermehrten Entstehung von Dicarbonyl-Verbindungen. In einigen Tumoren ist die Expression der Glyoxalase I erhöht, sodass diese Verbindungen auch schnell wieder abgebaut werden können (Santarius et al. 2010; Thornalley und Rabhani 2011). In Tumorzellen, bei denen die Expression der Glyoxalase nicht verändert ist, kommt es zu Dicarbonyl-Stress und folglich zu einer Glykierung der Zellen. Deshalb konnten in einigen Krebsarten erhöhte AGE-Mengen gefunden werden (van Heijst et al. 2005; Chiavarina et al. 2014; Chiavarina et al. 2017). Ein *knockdown* der Glyoxalase I in Tumorzellen sorgt ebenfalls für eine erhöhte Glykierung. Werden diese modifizierten Tumorzellen in Mäuse transplantiert, zeigt sich ein erhöhtes Tumorwachstum und eine vermehrte Bildung von Metastasen. Ein möglicher Grund ist die Tatsache, dass es durch die Glykierung zu einer erhöhten Aktivität von Transkriptionsfaktoren kommt, die für die Proliferation verantwortlich sind (Nokin et al. 2016).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen allerdings noch einen weiteren Grund, warum eine erhöhte Glykierung positiv für den Tumor sein kann. Glykierte Tumorzellen werden schlechter von NK-Zellen erkannt und lysiert, was förderlich für das Tumorwachstum wäre.

Eine erhöhte Entstehung von Dicarbonyl-Verbindungen könnte zudem auch die extrazelluläre Konzentration dieser Verbindungen erhöhen. Dadurch könnten NK-Zellen, welche in die Nähe des Tumors gelangen und normalerweise entartete Zellen lysieren würden, in ihrer Funktion eingeschränkt sein. Dicarbonyl-Stress könnte also eine weitere Möglichkeit sein, mit der Tumorzellen das Immunsystem negativ beeinflussen könnten.

4.2 Analyse der Sialyltransferasen in NK-Zellen

Die PCR-Analyse der drei NK-Zelllinien NK-92, NKL und KHYG-1 ergab, dass die Sialyltransferasen *ST8Sia1*, *ST8Sia4*, *ST8Sia6*, *ST6GalNAc4*, *ST6GalNAc6*, *ST6Gal1* sowie *ST3Gal1-5* exprimiert werden. Bei den primären NK-Zellen konnte bei zwei von drei Blutspendern auch die Expression von *ST6Gal2* und *ST3Gal6* nachgewiesen werden. Eine Aktivierung der NK-92-Zellen mit IL-2 reduziert die Expression der Sialyltransferasen *ST8Sia1*, *ST6Gal1* und *ST3Gal1*. Eine Behandlung mit MGO reduziert die Expression der α 2,8-Sialyltransferasen *ST8Sia1*, *ST8Sia4* und *ST8Sia6*.

4.2.1 Charakterisierung der NK-Zellen basierend auf ihrer Expression der Sialyltransferasen

In allen untersuchten NK-Zelllinien und primären NK-Zellen konnte die Expression von *ST8Sia4* nachgewiesen werden, was auch schon in anderen Veröffentlichungen gezeigt werden konnte (Avril et al. 2006; Moebius et al. 2007). NKL-Zellen haben, anders als NK-92, KHYG1 und primäre NK-Zellen, kein CD56/NCAM auf ihrer Oberfläche (Matsuo und Drexler 2003). Trotzdem exprimieren sie *ST8Sia4*, welches nahezu ausschließlich für die polySia-Synthese auf NCAM zuständig ist. Allerdings exprimieren auch andere Zelltypen, wie B-Zellen, T-Zellen und Monozyten, diese Sialyltransferase, obwohl auf diesen Zellen kein NCAM vorhanden ist (Avril et al. 2006). Unklar ist bisher, ob es noch eine andere Funktion von *ST8Sia4* gibt oder ob diese Sialyltransferase in diesen Zellen zwar exprimiert wird, aber aufgrund der Abwesenheit von NCAM keine Funktion hat.

Die Expression der α 2,8-Sialyltransferasen wurde bereits in verschiedenen Immunzellen untersucht. Dabei konnte, wie auch in dieser Arbeit, die Expression von *ST8SIA1*, *ST8SIA4* und *ST8SIA6* in NK-Zellen nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte eine Expression von *ST8Sia5* in einigen Proben gezeigt werden, was in den hier durchgeführten Versuchen nicht der Fall war. (Avril et al. 2006). Durch die hier erfolgten Analysen konnte außerdem die Expression von *ST6GalNAc4*, *ST6GalNAc6*, *ST6Gal1* sowie *ST3Gal1-5* in NK-Zellen nachgewiesen werden.

Insgesamt exprimieren die NK-Zelllinien 11 der im Menschen existierenden 20 Sialyltransferasen. Alle Sialyltransferasen, die in den Zelllinien gefunden wurden, konnten auch in primären NK-Zellen nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte bei zwei von drei Spendern die Expression von *ST6Gal2* und *ST3Gal6* gezeigt werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass diese Sialyltransferasen nur bei bestimmten Personen oder bei besonderen Einflüssen exprimiert werden.

4.2.2 Veränderung durch Aktivierung

Die Aktivierung der NK-92-Zellen durch IL-2 sorgte für die reduzierte Expression von *ST8Sia1*, *ST6Gal1* und *ST3Gal1*. In T-Zellen kommt es bei Aktivierung ebenfalls zu einer veränderten Expression von Sialyltransferasen. Werden murine T-Zellen mit IL-2 stimuliert, so verringert sich unter anderem die Expression von *ST6Gal1* und weiteren Sialyltransferasen (Comelli et al. 2006). In humanen T-Helfer-Zellen, die mittels Antikörpern aktiviert wurden, ist eine reduzierte Expression von *ST6Gal1* und *ST3Gal1* zu beobachten. Gleichzeitig werden einige α 2,8-Sialyltransferasen vermehrt exprimiert. (Villanueva-Cabello et al. 2015).

Die reduzierte Expression von Sialyltransferasen nach Aktivierung kann verschiedene Funktionen haben. Zum einen kann dadurch die Interaktion mit anderen Zellen oder mit Matrixproteinen verändert werden, was dann möglicherweise Vorteile für die lytische Aktivität oder die Migration mit sich bringt. Zum anderen könnte eine Demaskierung von Siglecs stattfinden, die dann in der Lage sein könnten, besser an ihre Liganden auf anderen Zellen zu binden. Da es sich bei Siglecs um inhibierende Rezeptoren handelt, kann somit sichergestellt werden, dass gesunde Zellen nicht von den aktivierten NK-Zellen attackiert werden. Auf humanen NK-Zellen kommen Siglec-7 und Siglec-9 vor (Yamaji et al. 2002; Belisle et al. 2010). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Siglec-7 an Ganglioside mit zwei oder drei Sialinsäuren binden kann (Nicoll et al. 2003; Attrill et al. 2006). Dabei wurden aber vor allem Ganglioside auf Tumorzellen untersucht. *ST8Sia I* ist an der Gangliosid-Synthese beteiligt (Sasaki et al. 1994; Nakayama et al. 1996) und wird in NK-Zellen exprimiert. Das dazugehörige Gen *ST8Sia1* wird bei Aktivierung mit IL-2 verringert exprimiert, wodurch es zu einer reduzierten Bildung der Ganglioside und damit möglicherweise zu einer Demaskierung von Siglec-7 kommen könnte. Siglec-9 bindet hingegen Liganden, die in α 2,3- und α 2,6-glykosidischen Bindungen mit Galaktose verknüpft sind (Zhang et al. 2000). Somit könnte die reduzierte Expression von *ST6Gal1* und *ST3Gal1* für eine Demaskierung von Siglec-9 sorgen.

4.2.3 Veränderung durch Dicarbonyl-Stress

Durch eine Inkubation mit MGO war die Expression der α 2,8-Sialyltransferasen *ST8Sia1*, *ST8Sia4* und *ST8Sia6* reduziert. Andere Sialyltransferasen waren durch die Inkubation nicht signifikant beeinträchtigt. Sialinsäuren sind direkt an der Oberfläche der NK-Zellen lokalisiert. Deshalb könnte eine Veränderung der Sialylierung möglicherweise einen Einfluss auf die Interaktion mit anderen Zellen haben und ein Grund für die beobachtete Reduzierung der NK-Zell-Aktivität nach MGO-Behandlung sein. *ST8Sia I* ist, wie bereits erwähnt, für die Synthese von bestimmten Gangliosiden zuständig (Sasaki et al. 1994; Nakayama et al.

1996). ST8Sia IV sorgt für die polySia-Synthese auf NCAM (Mori et al. 2017). ST8Sia VI erkennt verschiedene O-Glykane als Substrat (Takashima et al. 2002a). Um die Sialylierung zu verändern, müssen erst neue Ganglioside bzw. Proteine in den Golgi und dann an die Zelloberfläche gelangen. Ganglioside haben Halblebenszeiten von einigen Tagen (Kopitz et al. 1996). Die Halblebenszeit von NCAM beträgt ca. 17 h, bzw. ca. 13 h nach Glykierung (Frank et al. 2019). Die meisten Membranproteine haben Halblebenszeiten von mehreren Stunden bis Tagen (Hervé et al. 2007). Um die Sialylierung der NK-Zellen maßgeblich zu verändern ist, die Inkubationszeit von 4 h deshalb vermutlich zu kurz. Somit kann davon ausgegangen werden, dass andere Mechanismen (siehe 4.1.1.5, Seite 70) für die reduzierte Aktivität verantwortlich sind.

Nichtsdestotrotz hat die Inkubation der NK-Zellen mit MGO einen Einfluss auf die Expression der α 2,8-Sialyltransferasen und damit vermutlich auch auf die Sialylierung. Um die Auswirkungen der reduzierten Expression der Sialyltransferasen auf die Sialylierung der NK-Zellen zu untersuchen, müssten allerdings längere Experimente durchgeführt werden.

Da MGO nur die Expression der α 2,8-Sialyltransferasen reduziert, könnte eine verringerte Menge von Sialinsäuren in α 2,8-glykosidischen Bindungen möglicherweise als Marker genutzt werden, um NK-Zellen, die Dicarbonyl-Stress ausgesetzt waren, zu identifizieren.

5 Ausblick

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Dicarbonyl-Verbindungen MGO und GO einen negativen Einfluss auf die Funktion von NK-Zellen haben. In Abschnitt 4.1.1.5 (Seite 70) wurden mögliche Mechanismen diskutiert, wie eine Glykierung zu der beobachteten reduzierten NK-Zell-Aktivität führen könnte. Für weitere Analysen würde es sich anbieten, Proteine zu identifizieren, die durch die Behandlung glykiert werden und diese weiter zu untersuchen. Mögliche Kandidaten wären aktivierende Rezeptoren wie NKG2D oder NKp30, Adhäsionsmoleküle wie LFA-1, Proteine, die an der Degranulierung beteiligt sind wie SNAREs oder verschiedene Signalmoleküle. Eine Analyse könnte beispielsweise durch eine Immunpräzipitation mit einem Anti-AGE-Antikörper erfolgen, wobei anschließend die präzipitierten Proteine mittels Massenspektrometrie identifiziert werden könnten. Die gefundenen Proteine können dann einzeln auf ihre Funktion vor und nach Glykierung untersucht werden, indem z.B. die Liganden-Bindung von glykierten und unglykierten Rezeptoren miteinander verglichen wird. Wichtig wäre es außerdem, primäre NK-Zellen zu untersuchen, um die in Zelllinien gewonnen Erkenntnisse mit primären Proben zu bestätigen. So könnte durch Antikörper die Glykierung von NK-Zellen, beispielsweise mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden. Anschließend können funktionelle Assays durchgeführt werden, um zu untersuchen, ob eine erhöhte Glykierung der NK-Zellen mit einer reduzierten Aktivität korreliert.

Die Zugabe von Dicarbonyl-Verbindungen in das Medium von K562-Zellen führte zu einer Glykierung dieser Zellen, welche dann schlechter von NK-Zellen gebunden und lysiert wurden. Um weiter zu untersuchen, inwieweit eine Glykierung von Tumorzellen die Lyse durch NK-Zellen beeinflusst, könnte man die endogene Menge an Dicarbonyl-Verbindungen in Tumorzelllinien erhöhen, indem man die Aktivität der Glyoxalase I inhibiert. Dies kann entweder durch einen *knockdown* oder durch die Zugabe eines Inhibitors geschehen. Bei Zellen mit einer geringen Glyoxalase-Aktivität sollten sich dann vermehrt AGEs bilden. Anschließend könnten diese glykierten Tumorzellen dann mit NK-Zellen inkubiert werden, um den Einfluss auf die Konjugatbildung und Lyserate zu untersuchen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Sialyltransferasen auf NK-Zellen untersucht. Zunächst fand eine Charakterisierung der NK-Zelllinien und primären NK-Zellen statt. *ST6Gal2* und *ST3Gal6* wurden nur auf NK-Zellen von zwei der drei Spendern gefunden und waren auch nicht in den Zelllinien vorhanden. In weiteren Versuchen sollte deshalb die Expression dieser Sialyltransferasen in primären NK-Zellen genauer untersucht werden. Mit einer größeren Anzahl an Spendern, am besten mit unterschiedlichem Alter und Geschlecht, kann dann der Frage nachgegangen werden, ob diese Transferasen nur auf den NK-Zellen von bestimmten Personen zu finden sind.

Mittels Real-Time PCR konnte außerdem gezeigt werden, dass durch Aktivierung der NK-Zellen mit IL-2 die Expression der Sialyltransferasen *ST8Sia1*, *ST3Gal1* und *ST6Gal1* reduziert war. Dicarbonyl-Stress, ausgelöst durch MGO, reduzierte zudem spezifisch die Expression der α 2,8-Sialyltransferasen *ST8Sia1*, *ST8Sia4* und *ST8Sia6*. Mit Hilfe von Western-Blots könnte die reduzierte Expression der Transferasen auch auf Protein-Ebene bestätigt werden. Eine weitere Möglichkeit, die Veränderung der Proteinmenge zu untersuchen, wäre die Quantifizierung der Sialyltransferasen durch Massenspektrometrie.

In nachfolgenden Versuchen könnte außerdem getestet werden, ob die reduzierte Expression der Sialyltransferasen auch mit einer reduzierten Sialylierung einhergeht. Dazu müssten die Zellen allerdings länger inkubiert werden, da nur neu synthetisierte Proteine und Ganglioside von der reduzierten Sialyltransferasen-Expression betroffen wären. Anschließend können verschiedene Techniken angewandt werden, um die Sialylierung der Zellen zu analysieren. Mittels HPLC-Analyse könnte zunächst die gesamte Menge der Sialinsäuren bestimmt und quantifiziert werden. Um Sialinsäuren in unterschiedlichen Bindungen zu untersuchen, kann auf verschiedene Lektine und Antikörper zurückgegriffen werden. So gibt es Lektine, wie *Maackia amurensis leukoagglutinin* und *Sambucus nigra agglutinin*, die spezifisch Sialinsäuren in α 2,3- bzw. α 2,6-glykosidischen Bindungen erkennen können (Brinkman-Van der Linden et al. 2002). Für die Analyse der Polysialylierung können Antikörper gegen polySia-Strukturen zum Einsatz kommen. Somit kann nicht nur festgestellt werden, ob sich die gesamte Anzahl der Sialinsäuren ändert, sondern auch, ob sich spezifisch die Menge an Sialinsäuren in α 2,3-, α 2,6- und α 2,8-glykosidischen Bindungen verändert.

Nach einer Behandlung mit MGO war eine reduzierte Expression der α 2,8-Sialyltransferasen zu beobachten. Dies führt vermutlich zu einer Reduktion der Sialinsäuren in α 2,8-glykosidischen Bindungen. Es sollte deshalb getestet werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Menge an Dicarbonyl-Verbindungen im Blut und der α 2,8-verknüpften Sialinsäuren auf NK-Zellen existiert. Dazu könnten ebenfalls primäre NK-Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert werden. Zusätzlich zum Grad der Glykierung und der NK-Zell-Aktivität könnte dann auch eine Analyse der Sialinsäuren erfolgen. Somit lassen sich mögliche Zusammenhänge zwischen Glykierung und Sialylierung genauer untersuchen. Zusätzlich sollte die Menge an Dicarbonyl-Verbindungen im Blut des Spenders gemessen werden. Somit kann festgestellt werden, ob die Sialylierung der NK-Zellen möglicherweise als Marker für Dicarbonyl-Stress fungieren kann.

6 Zusammenfassung

Glykierung ist eine nicht-enzymatische Reaktion zwischen einer Aminogruppe und einer Carbonyl-Verbindung, bei der sogenannte *Advanced Glycation Endproducts* (AGEs) entstehen. Bei älteren Menschen und bei altersbedingten Krankheiten, wie Typ-2-Diabetes und Adipositas, kommt es im Körper zu einer abnormalen Anreicherung von Dicarbonyl-Verbindungen, wie Methylglyoxal (MGO) und Glyoxal (GO). Dies wird auch als Dicarbonyl-Stress bezeichnet und resultiert in einer erhöhten Entstehung von AGEs. Gleichzeitig ist mit zunehmendem Alter und bei altersbedingten Krankheiten die Funktion von verschiedenen Immunzellen eingeschränkt. So auch die Funktion der natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen), welche als Zellen des angeborenen Immunsystems an der Bekämpfung von virusinfizierten Zellen und Tumorzellen beteiligt sind, da sie entartete Zellen erkennen und lysieren können. Eine reduzierte NK-Zell-Aktivität führt zu einem höheren Infektionsrisiko und zu einer höheren Wahrscheinlichkeit an Krebs zu erkranken. Unklar ist allerdings, ob es einen Zusammenhang zwischen Dicarbonyl-Stress und Glykierung und einer reduzierten NK-Zell-Funktion gibt. Im ersten Teil der Arbeit wurde deshalb der Einfluss von Dicarbonyl-Verbindungen auf die lytische Aktivität der NK-Zellen untersucht. Eine Inkubation der NK-Zelllinie NK-92 mit MGO oder GO für 4 h sorgte für eine Glykierung der Zellen und resultierte in einer Einschränkung der NK-Zell-Aktivität. Glykierte NK-Zellen konnten schlechter an Tumorzellen binden und waren in ihrer lytischen Aktivität eingeschränkt. Zudem zeigten glykierte Tumorzellen eine schlechtere Konjugatbildung mit NK-Zellen und wurden schlechter von NK-Zellen lysiert. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Dicarbonyl-Verbindungen sich negativ auf die NK-Zell-Funktionen auswirken können. Eine erhöhte Menge an Dicarbonyl-Verbindungen stellt somit einen möglichen Grund für die reduzierte Aktivität der NK-Zellen im Alter und bei altersbedingten Erkrankungen dar.

NK-Zellen tragen, alle Körperzellen, Sialinsäuren auf ihrer Oberfläche. Über die Sialyltransferasen, welche den Transfer von Sialinsäuren auf verschiedene Glykan-Strukturen katalysieren, ist in NK-Zellen hingegen nur wenig bekannt. Im zweiten Teil der Arbeit sollte deshalb die Expression der Sialyltransferasen in NK-Zellen bei Aktivierung und Dicarbonyl-Stress untersucht werden. Zunächst wurden die humanen NK-Zelllinien NK-92, NKL und KHYG-1 sowie primäre NK-Zellen, basierend auf der Expression der Sialyltransferasen, charakterisiert. Mittels Real-Time PCR konnte zudem nachgewiesen werden, dass eine Aktivierung der NK-Zellen mit Interleukin-2 für eine veränderte Expression einiger Sialyltransferasen sorgte. Dicarbonyl-Stress, ausgelöst durch MGO, führte zu einer reduzierten Expression der α 2,8-Sialyltransferasen *ST8SIA1*, *ST8Sia4* und *ST8Sia6*. Eine reduzierte Menge von Sialinsäuren in α 2,8-glykosidischen Bindungen könnte deshalb möglicherweise als Marker für Dicarbonyl-Stress in NK-Zellen fungieren.

7 Abstract

Glycation is a non-enzymatic reaction between amino-groups and reactive carbonyls that lead to the formation of so-called advanced glycation end products (AGEs). During aging and in age-related diseases, such as type-2 diabetes and obesity, the amount of dicarbonyl compounds, like methylglyoxal (MGO) and glyoxal (GO), is abnormally increased. High amounts of dicarbonyl compounds cause dicarbonyl stress and result in an increased formation of AGEs. Moreover, aging and age-related diseases lead to a reduced function of different immune cells, such as natural killer (NK) cells. NK cells are cells of the innate immune system and provide a major defense against tumor cells and virus-infected cells, as they can detect and kill transformed cells. A reduced NK cell activity is associated with a higher risk of infection and a higher risk of developing cancer. The role of carbonyl stress and glycation on NK cell function has not been studied yet. Therefore, in the first part of this thesis, the effect of GO- and MGO-induced glycation on the function of NK cells was investigated. Using the human NK cell line NK-92, it could be demonstrated that incubation with MGO or GO for 4 h lead to glycation of the cells and reduced the NK cell activity. Glycated NK cells had an impaired binding to tumor target cells and showed a reduced lytic activity. In addition, glycation of NK cell targets, such as K562 tumor cells, also interfered with their lysis by NK cells. The results indicate that dicarbonyl compounds act negatively on NK cell function. Therefore, the high levels of dicarbonyls might be one of the reasons for the reduced NK cell activity in older people and in age-related diseases.

As all cell types, NK cells have sialic acids on their surface. Not much is known about the sialyltransferases in NK cells that regulate the transfer of sialic acids to different glycan structures. In the second part of this thesis, it was investigated which sialyltransferases are expressed in NK cells and how their expression is changed during activation and cellular stress. Therefore PCR experiments were used to characterize the human NK cell lines NK-92, NKL and KHYG-1 as well as primary NK cells according to their sialyltransferase expression. Furthermore, using Real-Time PCR it could be shown that activation of human NK cells with interleukin-2 lead to changes in the sialyltransferase expression. Moreover, a downregulation of the α 2,8-sialyltransferases *ST8SIA1*, *ST8Sia4* and *ST8Sia6* was observed when dicarbonyl stress, induced by methylglyoxal, was applied to the NK cells. A reduced formation of α 2,8-linked sialic acids might therefore be used as a marker to identify NK cells which have undergone dicarbonyl stress.

8 Literaturverzeichnis

- Abel, Alex M.; Yang, Chao; Thakar, Monica S.; Malarkannan, Subramaniam (2018): Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. In: *Frontiers in immunology* 9, S. 1869. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01869.
- Abeyweera, Thushara P.; Kaissar, Molly; Huse, Morgan (2013): Inhibitory receptor signaling destabilizes immunological synapse formation in primary NK cells. In: *Frontiers in immunology* 4, S. 410. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00410.
- Akhand, A. A.; Hossain, K.; Kato, M.; Miyata, T.; Du, J.; Suzuki, H. et al. (2001): Glyoxal and methylglyoxal induce lyoxal and methyglyoxal induce aggregation and inactivation of ERK in human endothelial cells. In: *Free radical biology & medicine* 31 (10), S. 1228–1235.
- Al-Attar, Ahmad; Presnell, Steven R.; Peterson, Charlotte A.; Thomas, D. Travis; Lutz, Charles T. (2016): The effect of sex on immune cells in healthy aging: Elderly women have more robust natural killer lymphocytes than do elderly men. In: *Mechanisms of Ageing and Development* 156, S. 25–33. DOI: 10.1016/j.mad.2016.04.001.
- Allaman, Igor; Belanger, Mireille; Magistretti, Pierre J. (2015): Methylglyoxal, the dark side of glycolysis. In: *Frontiers in neuroscience* 9, S. 23. DOI: 10.3389/fnins.2015.00023.
- Almeida-Oliveira, Aline; Smith-Carvalho, Monique; Porto, Luis Cristovão; Cardoso-Oliveira, Juliana; Ribeiro, Aline dos Santos; Falcão, Rosângela Rosa et al. (2011): Age-related changes in natural killer cell receptors from childhood through old age. In: *Human immunology* 72 (4), S. 319–329. DOI: 10.1016/j.humimm.2011.01.009.
- Al-Saraireh, Yousef M. J.; Sutherland, Mark; Springett, Bradley R.; Freiburger, Friedrich; Ribeiro Morais, Goreti; Loadman, Paul M. et al. (2013): Pharmacological inhibition of polysialyltransferase ST8Siall modulates tumour cell migration. In: *PloS one* 8 (8), e73366. DOI: 10.1371/journal.pone.0073366.
- Andersen, Claus Lindbjerg; Jensen, Jens Ledet; Ørntoft, Torben Falck (2004): Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. In: *Cancer research* 64 (15), S. 5245–5250. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496.
- Andrews, P. W.; Damjanov, I.; Simon, D.; Banting, G. S.; Carlin, C.; Dracopoli, N. C.; Fogh, J. (1984): Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human

- teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 50 (2), S. 147–162.
- Attrill, Helen; Imamura, Akihiro; Sharma, Ritu S.; Kiso, Makoto; Crocker, Paul R.; van Aalten, Daan M F (2006): Siglec-7 undergoes a major conformational change when complexed with the alpha(2,8)-disialylganglioside GT1b. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (43), S. 32774–32783. DOI: 10.1074/jbc.M601714200.
- Avril, Tony; North, Simon J.; Haslam, Stuart M.; Willison, Hugh J.; Crocker, Paul R. (2006): Probing the cis interactions of the inhibitory receptor Siglec-7 with alpha2,8-disialylated ligands on natural killer cells and other leukocytes using glycan-specific antibodies and by analysis of alpha2,8-sialyltransferase gene expression. In: *Journal of leukocyte biology* 80 (4), S. 787–796. DOI: 10.1189/jlb.1005559.
- BD Bioscience (2002): Introduction to Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide. Hg. v. BD Bioscience. Online verfügbar unter <https://www.bu.edu/flow-cytometry/files/2010/10/BD-Flow-Cytom-Learning-Guide.pdf>, zuletzt geprüft am 04.07.2019.
- Belisle, Jennifer A.; Horibata, Sachi; Jennifer, Gubbels A A; Petrie, Sarah; Kapur, Arvinder; André, Sabine et al. (2010): Identification of Siglec-9 as the receptor for MUC16 on human NK cells, B cells, and monocytes. In: *Molecular cancer* 9, S. 118. DOI: 10.1186/1476-4598-9-118.
- Bennmann, Dorit; Horstkorte, Rudiger; Hofmann, Britt; Jacobs, Kathleen; Navarrete-Santos, Alexander; Simm, Andreas et al. (2014): Advanced glycation endproducts interfere with adhesion and neurite outgrowth. In: *PloS one* 9 (11), e112115. DOI: 10.1371/journal.pone.0112115.
- Bennmann, Dorit; Kannicht, Christoph; Fisseau, Claudine; Jacobs, Kathleen; Navarrete-Santos, Alexander; Hofmann, Britt; Horstkorte, Rüdiger (2015): Glycation of the high affinity NGF-receptor and RAGE leads to reduced ligand affinity. In: *Mechanisms of Ageing and Development* 150, S. 1–11. DOI: 10.1016/j.mad.2015.07.003.
- Berridge, Michael V.; Herst, Patries M.; Tan, An S. (2005): Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. In: *Biotechnology Annual Review*, Bd. 11: Elsevier, S. 127–152.
- Berrou, Jeannig; Fougeray, Sophie; Venot, Marion; Chardiny, Victor; Gautier, Jean-François; Dulphy, Nicolas et al. (2013): Natural killer cell function, an important target for infection

- and tumor protection, is impaired in type 2 diabetes. In: *PloS one* 8 (4), e62418. DOI: 10.1371/journal.pone.0062418.
- Bezold, Veronika; Rosenstock, Philip; Scheffler, Jonas; Geyer, Henriette; Horstkorte, Rüdiger; Bork, Kaya (2019): Glycation of macrophages induces expression of pro-inflammatory cytokines and reduces phagocytic efficiency. In: *Aging* 11 (14), S. 5258–5275. DOI: 10.18632/aging.102123.
- Bhattacharyya, Nivedita; Pal, Aparajita; Patra, Subrata; Haldar, Arun Kumar; Roy, Syamal; Ray, Manju (2008): Activation of macrophages and lymphocytes by methylglyoxal against tumor cells in the host. In: *International immunopharmacology* 8 (11), S. 1503–1512. DOI: 10.1016/j.intimp.2008.06.005.
- Biassoni, Roberto; Cantoni, Claudia; Pende, Daniela; Sivori, Simona; Parolini, Silvia; Vitale, Massimo et al. (2001): Human natural killer cell receptors and co-receptors. In: *Immunological reviews* 181 (1), S. 203–214. DOI: 10.1034/j.1600-065X.2001.1810117.x.
- Biedler, J. L.; Helson, L.; Spengler, B. A. (1973): Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. In: *Cancer research* 33 (11), S. 2643–2652.
- Biedler, J. L.; Roffler-Tarlov, S.; Schachner, M.; Freedman, L. S. (1978): Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. In: *Cancer research* 38 (11 Pt 1), S. 3751–3757.
- Bork, Kaya; Weidemann, Wenke; Berneck, Beatrice; Kuchta, Magdalena; Bennmann, Dorit; Thate, Annett et al. (2017): The expression of sialyltransferases is regulated by the bioavailability and biosynthesis of sialic acids. In: *Gene expression patterns : GEP* 23-24, S. 52–58. DOI: 10.1016/j.gep.2017.03.003.
- Borrego, F.; Alonso, M. C.; Galiani, M. D.; Carracedo, J.; Ramirez, R.; Ostos, B. et al. (1999): NK phenotypic markers and IL2 response in NK cells from elderly people. In: *Experimental Gerontology* 34 (2), S. 253–265. DOI: 10.1016/S0531-5565(98)00076-X.
- Brings, Sebastian; Fleming, Thomas; Freichel, Marc; Muckenthaler, Martina U.; Herzig, Stephan; Nawroth, Peter P. (2017): Dicarbonyls and Advanced Glycation End-Products in the Development of Diabetic Complications and Targets for Intervention. In: *International Journal of Molecular Sciences* 18 (5). DOI: 10.3390/ijms18050984.
- Brinkman-Van der Linden, Els C. M.; Sonnenburg, Justin L.; Varki, Ajit (2002): Effects of sialic acid substitutions on recognition by Sambucus nigra agglutinin and Maackia

- amurensis hemagglutinin. In: *Analytical biochemistry* 303 (1), S. 98–104. DOI: 10.1006/abio.2001.5539.
- Brownlee, Michael (2001): Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. In: *Nature* 414 (6865), S. 813–820. DOI: 10.1038/414813a.
- Bryceson, Yenan T.; March, Michael E.; Barber, Domingo F.; Ljunggren, Hans-Gustaf; Long, Eric O. (2005): Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. In: *The Journal of experimental medicine* 202 (7), S. 1001–1012. DOI: 10.1084/jem.20051143.
- Bucala, R.; Makita, Z.; Koschinsky, T.; Cerami, A.; Vlassara, H. (1993): Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation in vivo. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (14), S. 6434–6438. DOI: 10.1073/pnas.90.14.6434.
- Burshtyn, Deborah N.; Davidson, Chelsea (2010): Natural Killer Cell Conjugate Assay Using Two-Color Flow Cytometry. In: Kerry S. Campbell (Hg.): *Natural Killer Cell Protocols. Cellular and Molecular Methods*. 2nd. Totowa, NJ: Humana Press (SpringerLink Bücher, 612), S. 89–96.
- Chaplen, F. W.; Fahl, W. E.; Cameron, D. C. (1998): Evidence of high levels of methylglyoxal in cultured Chinese hamster ovary cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (10), S. 5533–5538. DOI: 10.1073/pnas.95.10.5533.
- Chávez-Galán, L.; Arenas-Del Angel, M. C.; Zenteno, E.; Chávez, R.; Lascurain, R. (2009): Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. In: *Cellular & molecular immunology* 6 (1), S. 15–25. DOI: 10.1038/cmi.2009.3.
- Chiavarina, Barbara; Nokin, Marie-Julie; Bellier, Justine; Durieux, Florence; Bletard, Noëlla; Sherer, Félicie et al. (2017): Methylglyoxal-Mediated Stress Correlates with High Metabolic Activity and Promotes Tumor Growth in Colorectal Cancer. In: *International Journal of Molecular Sciences* 18 (1). DOI: 10.3390/ijms18010213.
- Chiavarina, Barbara; Nokin, Marie-Julie; Durieux, Florence; Bianchi, Elettra; Turtoi, Andrei; Peulen, Olivier et al. (2014): Triple negative tumors accumulate significantly less methylglyoxal specific adducts than other human breast cancer subtypes. In: *Oncotarget* 5 (14), S. 5472–5482. DOI: 10.18632/oncotarget.2121.
- Chiu, Bo-Chin; Martin, Brian E.; Stolberg, Valerie R.; Chensue, Stephen W. (2013): The host environment is responsible for aging-related functional NK cell deficiency. In: *Journal of*

- immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 191 (9), S. 4688–4698. DOI: 10.4049/jimmunol.1301625.
- Comelli, Elena M.; Sutton-Smith, Mark; Yan, Qi; Amado, Margarida; Panico, Maria; Gilmartin, Tim et al. (2006): Activation of murine CD4+ and CD8+ T lymphocytes leads to dramatic remodeling of N-linked glycans. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 177 (4), S. 2431–2440. DOI: 10.4049/jimmunol.177.4.2431.
- Cooper, Megan A.; Fehniger, Todd A.; Caligiuri, Michael A. (2001): The biology of human natural killer-cell subsets. In: *Trends in Immunology* 22 (11), S. 633–640. DOI: 10.1016/S1471-4906(01)02060-9.
- Das, Asmita; Long, Eric O. (2010): Lytic granule polarization, rather than degranulation, is the preferred target of inhibitory receptors in NK cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185 (8), S. 4698–4704. DOI: 10.4049/jimmunol.1001220.
- Di Lorenzo, Gabriele; Balistreri, Carmela R.; Candore, Giuseppina; Cigna, Diego; Colombo, Alfredo; Colonna Romano, Giuseppina et al. (1999): Granulocyte and natural killer activity in the elderly. In: *Mechanisms of Ageing and Development* 108 (1), S. 25–38. DOI: 10.1016/S0047-6374(98)00156-0.
- Dolhofer-Bliesener, R.; Gerbitz, K. D. (1990): Impairment by glycation of immunoglobulin G Fc fragment function. In: *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 50 (7), S. 739–746. DOI: 10.3109/00365519009091067.
- Du, Jun; Suzuki, Haruhiko; Nagase, Fumihiko; Akhand, Anwarul A.; Yokoyama, Toshihiro; Miyata, Toshio et al. (2000): Methylglyoxal induces apoptosis in Jurkat leukemia T cells by activating c-Jun N-Terminal kinase. In: *J. Cell. Biochem.* 77 (2), S. 333–344. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4644(20000501)77:2<333::AID-JCB15>3.0.CO;2-Q.
- Duan, Xiu-Mei; Huang, Jing; Ma, Hong-Xi; Wang, Xiao-Qi; Che, Yuan-Yuan; Tan, Yan; work., Yin-Ping Wang# # Both authors contributed equally to the (2011): A flow cytometric assay for simultaneously measuring the proliferation and cytotoxicity of cytokine induced killer cells in combination with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) labeling. In: *AJB* 10 (65), S. 14598–14607. DOI: 10.5897/AJB11.1530.
- Fang, Min; Roscoe, Felicia; Sigal, Luis J. (2010): Age-dependent susceptibility to a viral disease due to decreased natural killer cell numbers and trafficking. In: *The Journal of experimental medicine* 207 (11), S. 2369–2381. DOI: 10.1084/jem.20100282.
- Farag, Sherif S.; Caligiuri, Michael A. (2006): Human natural killer cell development and biology. In: *Blood reviews* 20 (3), S. 123–137. DOI: 10.1016/j.blre.2005.10.001.

- Foti, Rossana; Zucchelli, Silvia; Biagioli, Marta; Roncaglia, Paola; Vilotti, Sandra; Calligaris, Raffaella et al. (2010): Parkinson disease-associated DJ-1 is required for the expression of the glial cell line-derived neurotrophic factor receptor RET in human neuroblastoma cells. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (24), S. 18565–18574. DOI: 10.1074/jbc.M109.088294.
- Frank, Franziska; Bezold, Veronika; Bork, Kaya; Rosenstock, Philip; Scheffler, Jonas; Horstkorte, Rüdiger (2019): Advanced glycation endproducts and polysialylation affect the turnover of the neural cell adhesion molecule (NCAM) and the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE). In: *Biological chemistry* 400 (2), S. 219–226. DOI: 10.1515/hsz-2018-0291.
- Gawlowski, Thomas; Stratmann, Bernd; Stirban, Alin O.; Negrean, Monica; Tschoepe, Diethelm (2007): AGEs and methylglyoxal induce apoptosis and expression of Mac-1 on neutrophils resulting in platelet–neutrophil aggregation. In: *Thrombosis Research* 121 (1), S. 117–126. DOI: 10.1016/j.thromres.2007.03.002.
- Giardino, I.; Edelstein, D.; Brownlee, M. (1994): Nonenzymatic glycosylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity. A model for intracellular glycosylation in diabetes. In: *The Journal of clinical investigation* 94 (1), S. 110–117. DOI: 10.1172/JCI117296.
- Goetze, Andrew M.; Liu, Y. Diana; Arroll, Thomas; Chu, Lily; Flynn, Gregory C. (2012): Rates and impact of human antibody glycation in vivo. In: *Glycobiology* 22 (2), S. 221–234. DOI: 10.1093/glycob/cwr141.
- Gong, J. H.; Maki, G.; Klingemann, H. G. (1994): Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. In: *Leukemia* 8 (4), S. 652–658.
- Gounder, Sellamuthu Subbanna; Abdullah, Basri Johan Jeet; Radzuanb, Nur Ezzati Izyan Binti Mohd; Zain, Farah Dalila Binti Mohd; Sait, Nurhidayah Bt Mohamad; Chua, Corine; Subramani, Baskar (2018): Effect of Aging on NK Cell Population and Their Proliferation at Ex Vivo Culture Condition. In: *Analytical cellular pathology (Amsterdam)* 2018, S. 7871814. DOI: 10.1155/2018/7871814.
- Gouveia, Ricardo; Schaffer, Lana; Papp, Suzanne; Grammel, Nicolas; Kandzia, Sebastian; Head, Steven R. et al. (2012): Expression of glycogenes in differentiating human NT2N neurons. Downregulation of fucosyltransferase 9 leads to decreased Lewis(x) levels and impaired neurite outgrowth. In: *Biochimica et biophysica acta* 1820 (12), S. 2007–2019. DOI: 10.1016/j.bbagen.2012.09.004.

- Guerra, B. A.; Bolin, A. P.; Otton, R. (2012): Carbonyl stress and a combination of astaxanthin/vitamin C induce biochemical changes in human neutrophils. In: *Toxicology in Vitro* 26 (7), S. 1181–1190. DOI: 10.1016/j.tiv.2012.06.010.
- Hansen, Torben Frøstrup; Nederby, Line; Zedan, Ahmed H.; Mejlholm, Inge; Henriksen, Jon R.; Steffensen, Karina D. et al. (2019): Correlation Between Natural Killer Cell Activity and Treatment Effect in Patients with Disseminated Cancer. In: *Translational Oncology* 12 (7), S. 968–972. DOI: 10.1016/j.tranon.2019.04.002.
- Harduin-Lepers, Anne (2010): Comprehensive Analysis of Sialyltransferases in Vertebrate Genomes. In: *Glycobiology Insights* 2, S. 29–61. DOI: 10.4137/GBI.S3123.
- Harduin-Lepers, Anne; Krzewinski-Recchi, Marie-Ange; Colomb, Florent; Foulquier, Francois; Groux-Degroote, Sophie; Delannoy, Philippe (2012): Sialyltransferases functions in cancers. In: *Frontiers in bioscience (Elite edition)* 4, S. 499–515.
- Harduin-Lepers, Anne; Vallejo-Ruiz, Veronica; Krzewinski-Recchi, Marie-Ange; Samyn-Petit, Bénédicte; Julien, Sylvain; Delannoy, Philippe (2001): The human sialyltransferase family. In: *Biochimie* 83 (8), S. 727–737. DOI: 10.1016/S0300-9084(01)01301-3.
- Haucke, Elisa; Navarrete-Santos, Alexander; Simm, Andreas; Silber, Rolf-Edgar; Hofmann, Britt (2014): Glycation of extracellular matrix proteins impairs migration of immune cells. In: *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 22 (2), S. 239–245. DOI: 10.1111/wrr.12144.
- Hayhoe, Richard P. G.; Henson, Sian M.; Akbar, Arne N.; Palmer, Donald B. (2010): Variation of human natural killer cell phenotypes with age: identification of a unique KLRG1-negative subset. In: *Human immunology* 71 (7), S. 676–681. DOI: 10.1016/j.humimm.2010.03.014.
- Hazeldine, Jon; Hampson, Peter; Lord, Janet M. (2012): Reduced release and binding of perforin at the immunological synapse underlies the age-related decline in natural killer cell cytotoxicity. In: *Aging cell* 11 (5), S. 751–759. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2012.00839.x.
- Hazeldine, Jon; Lord, Janet M. (2013): The impact of ageing on natural killer cell function and potential consequences for health in older adults. In: *Ageing research reviews* 12 (4), S. 1069–1078. DOI: 10.1016/j.arr.2013.04.003.
- Henning, Christian; Glomb, Marcus A. (2016): Pathways of the Maillard reaction under physiological conditions. In: *Glycoconjugate journal* 33 (4), S. 499–512. DOI: 10.1007/s10719-016-9694-y.

- Hervé, Jean-Claude; Derangeon, Mickaël; Bahbouhi, Bouchaib; Mesnil, Marc; Sarrouilhe, Denis (2007): The connexin turnover, an important modulating factor of the level of cell-to-cell junctional communication: comparison with other integral membrane proteins. In: *The Journal of membrane biology* 217 (1-3), S. 21–33. DOI: 10.1007/s00232-007-9054-8.
- Hinderlich, Stephan; Weidemann, Wenke; Yardeni, Tal; Horstkorte, Rüdiger; Huizing, Marjan (2015): UDP-GlcNAc 2-Epimerase/ManNAc Kinase (GNE): A Master Regulator of Sialic Acid Synthesis. In: *Topics in current chemistry* 366, S. 97–137. DOI: 10.1007/128_2013_464.
- Hodge, D. L.; Schill, W. B.; Wang, J. M.; Blanca, I.; Reynolds, D. A.; Ortaldo, J. R.; Young, H. A. (2002): IL-2 and IL-12 Alter NK Cell Responsiveness to IFN- γ -Inducible Protein 10 by Down-Regulating CXCR3 Expression. In: *The Journal of Immunology* 168 (12), S. 6090–6098. DOI: 10.4049/jimmunol.168.12.6090.
- Hudson, Barry I.; Lippman, Marc E. (2018): Targeting RAGE Signaling in Inflammatory Disease. In: *Annual review of medicine* 69, S. 349–364. DOI: 10.1146/annurev-med-041316-085215.
- Hussain, Maryam; Bork, Kaya; Gnanapragassam, Vinayaga S.; Bennmann, Dorit; Jacobs, Kathleen; Navarette-Santos, Alexander et al. (2016): Novel insights in the dysfunction of human blood-brain barrier after glycation. In: *Mechanisms of Ageing and Development* 155, S. 48–54. DOI: 10.1016/j.mad.2016.03.004.
- Imai, Kazue; Matsuyama, Satoru; Miyake, Satoshi; Suga, Kenji; Nakachi, Kei (2000): Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. In: *The Lancet* 356 (9244), S. 1795–1799. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)03231-1.
- Jandus, Camilla; Boligan, Kayluz Frias; Chijioke, Obinna; Liu, He; Dahlhaus, Meike; Démoulin, Thomas et al. (2014): Interactions between Siglec-7/9 receptors and ligands influence NK cell-dependent tumor immunosurveillance. In: *The Journal of clinical investigation* 124 (4), S. 1810–1820. DOI: 10.1172/JCI65899.
- Jo, Hwa Yeon; Kim, Yona; Park, Hyung Woo; Moon, Hyo Eun; Bae, Seongtae; Kim, JinWook et al. (2015): The Unreliability of MTT Assay in the Cytotoxic Test of Primary Cultured Glioblastoma Cells. In: *Experimental Neurobiology* 24 (3), S. 235–245. DOI: 10.5607/en.2015.24.3.235.

- Johnsen, Ann-Charlotte; Haux, Johan; Steinkjer, Bjørg; Nonstad, Unni; Egeberg, Kjartan; Sundan, Anders et al. (1999): REGULATION OF APO-2 LIGAND/TRAIL EXPRESSION IN NK CELLS—INVOLVEMENT IN NK CELL-MEDIATED CYTOTOXICITY. In: *Cytokine* 11 (9), S. 664–672. DOI: 10.1006/cyto.1999.0489.
- Kasper, M.; Roehlecke, C.; Witt, M.; Fehrenbach, H.; Hofer, A.; Miyata, T. et al. (2000): Induction of apoptosis by glyoxal in human embryonic lung epithelial cell line L132. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 23 (4), S. 485–491. DOI: 10.1165/ajrcmb.23.4.4117.
- Kaszubowska, Lucyna; Wierzbicki, Piotr Mieczysław; Karsznia, Sylwia; Damska, Marta; Ślebioda, Tomasz Jerzy; Foerster, Jerzy; Kmiec, Zbigniew (2015): Optimal reference genes for qPCR in resting and activated human NK cells—Flow cytometric data correspond to qPCR gene expression analysis. In: *Journal of Immunological Methods* 422, S. 125–129. DOI: 10.1016/j.jim.2015.04.013.
- Kim, Jung Hye; Park, Kahui; Lee, Sang Bae; Kang, Shinae; Park, Jong Suk; Ahn, Chul Woo; Nam, Ji Sun (2019): Relationship between natural killer cell activity and glucose control in patients with type 2 diabetes and prediabetes. In: *Journal of diabetes investigation* 10 (5), S. 1223–1228. DOI: 10.1111/jdi.13002.
- Kim, Yeon-Jeong; Kim, Kyoung-Sook; Do, Su-il; Kim, Cheorl-Ho; Kim, Se-Kwon; Lee, Young-Choon (1997): Molecular Cloning and Expression of Human α 2,8-Sialyltransferase (hST8Sia V). In: *Biochemical and biophysical research communications* 235 (2), S. 327–330. DOI: 10.1006/bbrc.1997.6725.
- Kitagawa, H.; Paulson, J. C. (1994): Differential expression of five sialyltransferase genes in human tissues. In: *Journal of Biological Chemistry* 269 (27), S. 17872–17878.
- Klein, Eva; Vánky, Farkas; Ben-Bassat, Hannah; Neumann, Hava; Ralph, Peter; Zeuthen, Jesper; Polliack, Aaron (1976): Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. In: *Int. J. Cancer* 18 (4), S. 421–431. DOI: 10.1002/ijc.2910180405.
- Klingemann, Hans; Boissel, Laurent; Toneguzzo, Frances (2016): Natural Killer Cells for Immunotherapy - Advantages of the NK-92 Cell Line over Blood NK Cells. In: *Frontiers in immunology* 7, S. 91. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00091.
- Kong, Xiang; Ma, Ming-zhe; Huang, Kai; Qin, Li; Zhang, Hong-mei; Yang, Zhen et al. (2014): Increased plasma levels of the methylglyoxal in patients with newly diagnosed type 2 diabetes 2. In: *Journal of diabetes* 6 (6), S. 535–540. DOI: 10.1111/1753-0407.12160.

- Konjević, Gordana; Vuletić, Ana; Džodić, Katarina Mirjačić Martinović and Radan (2017): The Role of Activating and Inhibitory NK Cell Receptors in Antitumor Immune Response: IntechOpen, 13.12.2017.
- Kopitz, J.; Reitzenstein, C. von; Sinz, K.; Cantz, M. (1996): Selective ganglioside desialylation in the plasma membrane of human neuroblastoma cells. In: *Glycobiology* 6 (3), S. 367–376. DOI: 10.1093/glycob/6.3.367.
- Krishnaraj, Rajabather; Bhooma, Thanikachalam (1996): Cytokine sensitivity of human NK cells during immunosenescence. 2. IL2-induced Interferon gamma secretion. In: *Immunology Letters* 50 (1), S. 59–63. DOI: 10.1016/0165-2478(96)02519-9.
- Krizner, Hadley E.; Haan, David O. de; Kua, Jeremy (2009): Thermodynamics and kinetics of methylglyoxal dimer formation: a computational study. In: *The journal of physical chemistry. A* 113 (25), S. 6994–7001. DOI: 10.1021/jp903213k.
- Krzewski, Konrad; Coligan, John E. (2012): Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis. In: *Frontiers in immunology* 3, S. 335. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00335.
- Kurcon, Tomasz; Liu, Zhongyin; Paradkar, Anika V.; Vaiana, Christopher A.; Koppolu, Sujeethraj; Agrawal, Praveen; Mahal, Lara K. (2015): miRNA proxy approach reveals hidden functions of glycosylation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (23), S. 7327–7332. DOI: 10.1073/pnas.1502076112.
- Lapolla, Annunziata; Reitano, Rachele; Seraglia, Roberta; Sartore, Giovanni; Ragazzi, Eugenio; Traldi, Pietro (2005): Evaluation of advanced glycation end products and carbonyl compounds in patients with different conditions of oxidative stress. In: *Molecular nutrition & food research* 49 (7), S. 685–690. DOI: 10.1002/mnfr.200400093.
- Lee, Miri; Kim, Kyoung-Sook; Fukushi, Abekura; Kim, Dong-Hyun; Kim, Cheorl-Ho; Lee, Young-Choon (2018): Transcriptional Activation of Human GD3 Synthase (hST8Sia I) Gene in Curcumin-Induced Autophagy in A549 Human Lung Carcinoma Cells. In: *International Journal of Molecular Sciences* 19 (7). DOI: 10.3390/ijms19071943.
- Lehoux, Sylvain; Groux-Degroote, Sophie; Cazet, Aurélie; Dhaenens, Claire-Marie; Muraige, Claude-Alain; Caillet-Boudin, Marie-Laure et al. (2010): Transcriptional regulation of the human ST6GAL2 gene in cerebral cortex and neuronal cells. In: *Glycoconjugate journal* 27 (1), S. 99–114. DOI: 10.1007/s10719-009-9260-y.
- Li, Yan; Luo, Shihua; Dong, Weijie; Song, Xiaobo; Zhou, Huimin; Zhao, Lifen; Jia, Li (2016): Alpha-2, 3-sialyltransferases regulate the multidrug resistance of chronic myeloid

- leukemia through miR-4701-5p targeting ST3GAL1. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 96 (7), S. 731–740. DOI: 10.1038/labinvest.2016.50.
- Lisovsky, Irene; Isitman, Gamze; Bruneau, Julie; Bernard, Nicole F. (2015): Functional analysis of NK cell subsets activated by 721.221 and K562 HLA-null cells. In: *Journal of leukocyte biology* 97 (4), S. 761–767. DOI: 10.1189/jlb.4AB1014-499R.
- Ljunggren, H. G.; Kärre, K. (1990): In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. In: *Immunology today* 11 (7), S. 237–244.
- López-Otín, Carlos; Blasco, Maria A.; Partridge, Linda; Serrano, Manuel; Kroemer, Guido (2013): The hallmarks of aging. In: *Cell* 153 (6), S. 1194–1217. DOI: 10.1016/j.cell.2013.05.039.
- Lübbers, Joyce; Rodríguez, Ernesto; van Kooyk, Yvette (2018): Modulation of Immune Tolerance via Siglec-Sialic Acid Interactions. In: *Frontiers in immunology* 9, S. 2807. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02807.
- Ma, Hongye; Cheng, Lei; Hao, Keji; Li, Yanping; Song, Xiaobo; Zhou, Huimin; Jia, Li (2014): Reversal effect of ST6GAL 1 on multidrug resistance in human leukemia by regulating the PI3K/Akt pathway and the expression of P-gp and MRP1. In: *PloS one* 9 (1), e85113. DOI: 10.1371/journal.pone.0085113.
- Ma, Xiaolu; Dong, Weijie; Su, Zhen; Zhao, Lifan; Miao, Yuan; Li, Nana et al. (2016): Functional roles of sialylation in breast cancer progression through miR-26a/26b targeting ST8SIA4. In: *Cell death & disease* 7 (12), e2561. DOI: 10.1038/cddis.2016.427.
- Maillard, L. C. (1912): Action of amino acids on sugars. Formation of melanoidins in a methodical way. In: *Compte-Rendu de l'Academie des Sciences* 154, S. 66–68.
- Maki, G.; Klingemann, H. G.; Martinson, J. A.; Tam, Y. K. (2001): Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92. In: *Journal of hematotherapy & stem cell research* 10 (3), S. 369–383. DOI: 10.1089/152581601750288975.
- Mäkinen, Ville-Petteri; Civelek, Mete; Meng, Qingying; Zhang, Bin; Zhu, Jun; Levian, Candace et al. (2014): Integrative genomics reveals novel molecular pathways and gene networks for coronary artery disease. In: *PLoS genetics* 10 (7), e1004502. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004502.
- Mariani, Erminia; Pulsatelli, Lia; Meneghetti, Alessandra; Dolzani, Paolo; Mazzetti, Ilaria; Neri, Simona et al. (2001): Different IL-8 production by T and NK lymphocytes in elderly

- subjects. In: *Mechanisms of Ageing and Development* 122 (13), S. 1383–1395. DOI: 10.1016/S0047-6374(01)00270-6.
- Masania, Jinit; Malczewska-Malec, Malgorzata; Razny, Urszula; Goralska, Joanna; Zdzienicka, Anna; Kiec-Wilk, Beata et al. (2016): Dicarbonyl stress in clinical obesity. In: *Glycoconjugate journal* 33 (4), S. 581–589. DOI: 10.1007/s10719-016-9692-0.
- Matsuo, Yoshinobu; Drexler, Hans G. (2003): Immunoprofiling of cell lines derived from natural killer-cell and natural killer-like T-cell leukemia–lymphoma. In: *Leukemia Research* 27 (10), S. 935–945. DOI: 10.1016/S0145-2126(03)00024-9.
- Mo, Jingjie; Jin, Renzhe; Yan, Qingrong; Sokolowska, Izabela; Lewis, Michael J.; Hu, Ping (2018): Quantitative analysis of glycation and its impact on antigen binding. In: *mAbs* 10 (3), S. 406–415. DOI: 10.1080/19420862.2018.1438796.
- Moebius, Jeannette M.; Widera, Darius; Schmitz, Juergen; Kaltschmidt, Christian; Piechaczek, Christoph (2007): Impact of polysialylated CD56 on natural killer cell cytotoxicity. In: *BMC immunology* 8, S. 13. DOI: 10.1186/1471-2172-8-13.
- Morcos, Michael; Du, Xueliang; Pfisterer, Friederike; Hutter, Harald; Sayed, Ahmed A. R.; Thornalley, Paul et al. (2008): Glyoxalase-1 prevents mitochondrial protein modification and enhances lifespan in *Caenorhabditis elegans*. In: *Aging cell* 7 (2), S. 260–269. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2008.00371.x.
- Mori, Airi; Hane, Masaya; Niimi, Yuki; Kitajima, Ken; Sato, Chihiro (2017): Different properties of polysialic acids synthesized by the polysialyltransferases ST8SIA2 and ST8SIA4. In: *Glycobiology* 27 (9), S. 834–846. DOI: 10.1093/glycob/cwx057.
- Münster-Kühnel, Anja K.; Tiralongo, Joe; Krapp, Stephan; Weinhold, Birgit; Ritz-Sedlacek, Valentina; Jacob, Uwe; Gerardy-Schahn, Rita (2004): Structure and function of vertebrate CMP-sialic acid synthetases. In: *Glycobiology* 14 (10), 43R-51R. DOI: 10.1093/glycob/cwh113.
- Murugaesu, Nirupa; Iravani, Marjan; van Weverwijk, Antoinette; Ivetic, Aleksandar; Johnson, Damian A.; Antonopoulos, Aristotelis et al. (2014): An in vivo functional screen identifies ST6GalNAc2 sialyltransferase as a breast cancer metastasis suppressor. In: *Cancer discovery* 4 (3), S. 304–317. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-13-0287.
- Nakayama, Jun; Fukuda, Michiko N.; Hirabayashi, Yoshio; Kanamori, Akiko; Sasaki, Katsutoshi; Nishi, Tatsunari; Fukuda, Minoru (1996): Expression Cloning of a Human G Synthase. In: *Journal of Biological Chemistry* 271 (7), S. 3684–3691. DOI: 10.1074/jbc.271.7.3684.

- Navarrete Santos, Alexander; Jacobs, Kathleen; Simm, Andreas; Glaubitz, Nicole; Horstkorte, Rüdiger; Hofmann, Britt (2017): Dicarbonyls induce senescence of human vascular endothelial cells. In: *Mechanisms of Ageing and Development* 166, S. 24–32. DOI: 10.1016/j.mad.2017.07.009.
- Nicoll, Gavin; Avril, Tony; Lock, Kevin; Furukawa, Koichi; Bovin, Nicolai; Crocker, Paul R. (2003): Ganglioside GD3 expression on target cells can modulate NK cell cytotoxicity via siglec-7-dependent and -independent mechanisms. In: *European journal of immunology* 33 (6), S. 1642–1648. DOI: 10.1002/eji.200323693.
- Nigro, Cecilia; Leone, Alessia; Fiory, Francesca; Prevezano, Immacolata; Nicolò, Antonella; Mirra, Paola et al. (2019): Dicarbonyl Stress at the Crossroads of Healthy and Unhealthy Aging. In: *Cells* 8 (7). DOI: 10.3390/cells8070749.
- Nji, Emmanuel; Gulati, Ashutosh; Qureshi, Abdul Aziz; Coincon, Mathieu; Drew, David (2019): Structural basis for the delivery of activated sialic acid into Golgi for sialylation. In: *Nat Struct Mol Biol* 26 (6), S. 415–423. DOI: 10.1038/s41594-019-0225-y.
- Nogusa, Shoko; Murasko, Donna M.; Gardner, Elizabeth M. (2012): Differential effects of stimulatory factors on natural killer cell activities of young and aged mice. In: *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 67 (9), S. 947–954. DOI: 10.1093/gerona/gls079.
- Nokin, Marie-Julie; Durieux, Florence; Peixoto, Paul; Chiavarina, Barbara; Peulen, Olivier; Blomme, Arnaud et al. (2016): Methylglyoxal, a glycolysis side-product, induces Hsp90 glycation and YAP-mediated tumor growth and metastasis. In: *eLife* 5. DOI: 10.7554/eLife.19375.
- Ono, Yuri; Aoki, Shin; Ohnishi, Katsunori; Yasuda, Takuzi; Kawano, Katsumi; Tsukada, Yutaka (1998): Increased serum levels of advanced glycation end-products and diabetic complications. In: *Diabetes Research and Clinical Practice* 41 (2), S. 131–137. DOI: 10.1016/S0168-8227(98)00074-6.
- Orange, Jordan S. (2008): Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. In: *Nature reviews. Immunology* 8 (9), S. 713–725. DOI: 10.1038/nri2381.
- O'Shea, Donal; Cawood, Tom J.; O'Farrelly, Cliona; Lynch, Lydia (2010): Natural killer cells in obesity: impaired function and increased susceptibility to the effects of cigarette smoke. In: *PLoS one* 5 (1), e8660. DOI: 10.1371/journal.pone.0008660.
- Pfaffl, M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. In: *Nucleic acids research* 29 (9), 45e-45. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45.

- Phillips, S. A.; Thornalley, P. J. (1993): The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal. In: *European journal of biochemistry / FEBS* 212 (1), S. 101–105. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb17638.x.
- Piątkiewicz, Paweł; Miłek, Tomasz; Bernat-Karpińska, Małgorzata; Ohams, Monika; Czech, Anna; Ciostek, Piotr (2013): The Dysfunction of NK Cells in Patients with Type 2 Diabetes and Colon Cancer. In: *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 61 (3), S. 245–253. DOI: 10.1007/s00005-013-0222-5.
- Price, Claire L.; Hassi, Hafid O. S. Al; English, Nicholas R.; Blakemore, Alexandra I. F.; Stagg, Andrew J.; Knight, Stella C. (2010): Methylglyoxal modulates immune responses: relevance to diabetes. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 14 (6B), S. 1806–1815. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2009.00803.x.
- Price, Claire L.; Knight, Stella C. (2009): Methylglyoxal. Possible link between hyperglycaemia and immune suppression? In: *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 20 (7), S. 312–317. DOI: 10.1016/j.tem.2009.03.010.
- Price, Claire L.; Sharp, Patrick S.; North, Margaret E.; Rainbow, Sandra J.; Knight, Stella C. (2004): Advanced glycation end products modulate the maturation and function of peripheral blood dendritic cells. In: *Diabetes* 53 (6), S. 1452–1458. DOI: 10.2337/diabetes.53.6.1452.
- Rabbani, Naila; Thornalley, Paul J. (2014a): Dicarbonyl proteome and genome damage in metabolic and vascular disease. In: *Biochemical Society transactions* 42 (2), S. 425–432. DOI: 10.1042/BST20140018.
- Rabbani, Naila; Thornalley, Paul J. (2014b): Measurement of methylglyoxal by stable isotopic dilution analysis LC-MS/MS with corroborative prediction in physiological samples. In: *Nature protocols* 9 (8), S. 1969–1979. DOI: 10.1038/nprot.2014.129.
- Rabbani, Naila; Thornalley, Paul J. (2019): Glyoxalase 1 Modulation in Obesity and Diabetes. In: *Antioxidants & redox signaling* 30 (3), S. 354–374. DOI: 10.1089/ars.2017.7424.
- Rabbani, Naila; Xue, Mingzhan; Thornalley, Paul J. (2016): Dicarbonyls and glyoxalase in disease mechanisms and clinical therapeutics. In: *Glycoconjugate journal* 33 (4), S. 513–525. DOI: 10.1007/s10719-016-9705-z.
- Rachman, Helmy; Kim, Nayoung; Ulrichs, Timo; Baumann, Sven; Pradl, Lydia; Nasser Eddine, Ali et al. (2006): Critical role of methylglyoxal and AGE in mycobacteria-induced

- macrophage apoptosis and activation. In: *PloS one* 1, e29. DOI: 10.1371/journal.pone.0000029.
- Robertson, M. J.; Cochran, K. J.; Cameron, C.; Le, J. M.; Tantravahi, R.; Ritz, J. (1996): Characterization of a cell line, NKL, derived from an aggressive human natural killer cell leukemia. In: *Experimental hematology* 24 (3), S. 406–415.
- Rosenstock, Philip; Horstkorte, Rüdiger; Gnanapragassam, Vinayaga Srinivasan; Harth, Jörg; Kielstein, Heike (2017): Siglec-7 expression is reduced on a natural killer (NK) cell subset of obese humans. In: *Immunol Res* 4, S. 579. DOI: 10.1007/s12026-017-8942-y.
- Rothe, Gregor (2007): Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. In: Ulrich Sack (Hg.): *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*; 163 Tabellen. Basel [u.a.]: Karger (Serial 2013), S. 27–70.
- Ruijter, J. M.; Ramakers, C.; Hoogaars, W. M. H.; Karlen, Y.; Bakker, O.; van den Hoff, M. J. B.; Moorman, A. F. M. (2009): Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. In: *Nucleic acids research* 37 (6), e45-e45. DOI: 10.1093/nar/gkp045.
- Sadowska-Bartosz, Izabela; Bartosz, Grzegorz (2016): Effect of glycation inhibitors on aging and age-related diseases. In: *Mechanisms of Ageing and Development* 160, S. 1–18. DOI: 10.1016/j.mad.2016.09.006.
- Santarius, Thomas; Bignell, Graham R.; Greenman, Chris D.; Widaa, Sara; Chen, Lina; Mahoney, Claire L. et al. (2010): GLO1-A novel amplified gene in human cancer. In: *Genes, chromosomes & cancer* 49 (8), S. 711–725. DOI: 10.1002/gcc.20784.
- Sasaki, K.; Kurata, K.; Kojima, N.; Kurosawa, N.; Ohta, S.; Hanai, N. et al. (1994): Expression cloning of a GM3-specific alpha-2,8-sialyltransferase (GD3 synthase). In: *Journal of Biological Chemistry* 269 (22), S. 15950–15956.
- Schalkwijk, Casper G.; Miyata, Toshio (2012): Early- and advanced non-enzymatic glycation in diabetic vascular complications: the search for therapeutics. In: *Amino Acids* 42 (4), S. 1193–1204. DOI: 10.1007/s00726-010-0779-9.
- Scheijen, Jean L. J. M.; Schalkwijk, Casper G. (2014): Quantification of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in blood and plasma by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry: evaluation of blood specimen. In: *Clinical chemistry and laboratory medicine* 52 (1), S. 85–91. DOI: 10.1515/cclm-2012-0878.

- Schmid, I.; Krall, W. J.; Uittenbogaart, C. H.; Braun, J.; Giorgi, J. V. (1992): Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. In: *Cytometry* 13 (2), S. 204–208. DOI: 10.1002/cyto.990130216.
- Schwartz, Laurent; Supuran, Claudiu T.; Alfarouk, Khalid O. (2017): The Warburg Effect and the Hallmarks of Cancer. In: *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* 17 (2), S. 164–170. DOI: 10.2174/1871520616666161031143301.
- Semchyshyn, Halyna M. (2014): Reactive carbonyl species in vivo. Generation and dual biological effects. In: *TheScientificWorldJournal* 2014, S. 417842. DOI: 10.1155/2014/417842.
- Sewell, Robert; Bäckström, Malin; Dalziel, Martin; Gschmeissner, Steven; Karlsson, Hasse; Noll, Thomas et al. (2006): The ST6GalNAc-I sialyltransferase localizes throughout the Golgi and is responsible for the synthesis of the tumor-associated sialyl-Tn O-glycan in human breast cancer. In: *Journal of Biological Chemistry* 281 (6), S. 3586–3594. DOI: 10.1074/jbc.M511826200.
- Shan, Yulong; Oulaidi, Farah; Lahmann, Martina (2013): Lactosamine from lactulose via the Heyns rearrangement: a practical protocol. In: *Tetrahedron Letters* 54 (30), S. 3960–3961. DOI: 10.1016/j.tetlet.2013.05.086.
- Shehata, Hesham M.; Hoebe, Kasper; Chougnet, Claire A. (2015): The aged nonhematopoietic environment impairs natural killer cell maturation and function. In: *Aging cell* 14 (2), S. 191–199. DOI: 10.1111/accel.12303.
- Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D. et al. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. In: *Analytical biochemistry* 150 (1), S. 76–85. DOI: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- Son, Seunghwan; Hwang, Inhwa; Han, Seung Hyeok; Shin, Jeon-Soo; Shin, Ok Sarah; Yu, Je-Wook (2017): Advanced glycation end products impair NLRP3 inflammasome-mediated innate immune responses in macrophages. In: *The Journal of biological chemistry* 292 (50), S. 20437–20448. DOI: 10.1074/jbc.M117.806307.
- Srivastava, Raghvendra M.; Savithri, B.; Khar, Ashok (2003): Activating and inhibitory receptors and their role in natural killer cell function. In: *Indian journal of biochemistry & biophysics* 40 (5), S. 291–299.

- Stepanenko, A. A.; Dmitrenko, V. V. (2015): Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. In: *Gene* 574 (2), S. 193–203. DOI: 10.1016/j.gene.2015.08.009.
- Sung, Pi-Lin; Wen, Kuo-Chang; Horng, Huann-Cheng; Chang, Chia-Ming; Chen, Yi-Jen; Lee, Wen-Ling; Wang, Peng-Hui (2018): The role of α 2,3-linked sialylation on clear cell type epithelial ovarian cancer. In: *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* 57 (2), S. 255–263. DOI: 10.1016/j.tjog.2018.02.015.
- Takahashi, Hideo Kohka; Mori, Shuji; Wake, Hidenori; Liu, Keyue; Yoshino, Tadashi; Ohashi, Katsuhisa et al. (2009): Advanced glycation end products subspecies-selectively induce adhesion molecule expression and cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 330 (1), S. 89–98. DOI: 10.1124/jpet.109.150581.
- Takahashi, Motoko (2015): Glycation of Proteins. In: Naoyuki Taniguchi, Tamao Endo, Gerald W. Hart, Peter H. Seeberger und Chi-Huey Wong (Hg.): *Glycoscience: Biology and Medicine*, Bd. 40. Tokyo: Springer Japan; Imprint; Springer, S. 1339–1345.
- Takashima, Shou; Ishida, Hide-Ki; Inazu, Toshiyuki; Ando, Takayuki; Ishida, Hideharu; Kiso, Makoto et al. (2002a): Molecular cloning and expression of a sixth type of alpha 2,8-sialyltransferase (ST8Sia VI) that sialylates O-glycans. In: *Journal of Biological Chemistry* 277 (27), S. 24030–24038. DOI: 10.1074/jbc.M112367200.
- Takashima, Shou; Tsuji, Shuichi; Tsujimoto, Masafumi (2002b): Characterization of the second type of human beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase (ST6Gal II), which sialylates Galbeta 1,4GlcNAc structures on oligosaccharides preferentially. Genomic analysis of human sialyltransferase genes. In: *Journal of Biological Chemistry* 277 (48), S. 45719–45728. DOI: 10.1074/jbc.M206808200.
- Talukdar, D.; Chaudhuri, B. S.; Ray, M.; Ray, S. (2009): Critical evaluation of toxic versus beneficial effects of methylglyoxal. In: *Biochemistry. Biokhimiia* 74 (10), S. 1059–1069.
- Tam, Y. K.; Maki, G.; Miyagawa, B.; Hennemann, B.; Tonn, T.; Klingemann, H. G. (1999): Characterization of genetically altered, interleukin 2-independent natural killer cell lines suitable for adoptive cellular immunotherapy. In: *Human gene therapy* 10 (8), S. 1359–1373. DOI: 10.1089/10430349950018030.
- Thornalley, P. J. (1990): The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. In: *The Biochemical journal* 269 (1), S. 1–11.

- Thornalley, P. J.; Langborg, A.; Minhas, H. S. (1999): Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. In: *The Biochemical journal* 344 Pt 1, S. 109–116.
- Thornalley, Paul J. (2008): Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems - role in ageing and disease. In: *Drug metabolism and drug interactions* 23 (1-2), S. 125–150.
- Thornalley, Paul J.; Rabbani, Naila (2011): Glyoxalase in tumourigenesis and multidrug resistance. In: *Seminars in cell & developmental biology* 22 (3), S. 318–325. DOI: 10.1016/j.semcdb.2011.02.006.
- Thornalley, Paul J.; Yurek-George, Alexander; Argirov, Ongian K. (2000): Kinetics and mechanism of the reaction of aminoguanidine with the α -oxoaldehydes glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone under physiological conditions. In: *Biochemical Pharmacology* 60 (1), S. 55–65. DOI: 10.1016/S0006-2952(00)00287-2.
- Tikellis, Chris; Pickering, Raelene J.; Tsorotes, Despina; Huet, Olivier; Cooper, Mark E.; Jandeleit-Dahm, Karin; Thomas, Merlin C. (2014): Dicarbonyl stress in the absence of hyperglycemia increases endothelial inflammation and atherogenesis similar to that observed in diabetes. In: *Diabetes* 63 (11), S. 3915–3925. DOI: 10.2337/db13-0932.
- Tonn, Torsten; Schwabe, Dirk; Klingemann, Hans G.; Becker, Sven; Esser, Ruth; Koehl, Ulrike et al. (2013): Treatment of patients with advanced cancer with the natural killer cell line NK-92. In: *Cytotherapy* 15 (12), S. 1563–1570. DOI: 10.1016/j.jcyt.2013.06.017.
- Topham, Nicola J.; Hewitt, Eric W. (2009): Natural killer cell cytotoxicity. How do they pull the trigger? In: *Immunology* 128 (1), S. 7–15. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2009.03123.x.
- Törnroos, Heidi; Hägerstrand, Henry; Lindqvist, Christer (2019): Culturing the Human Natural Killer Cell Line NK-92 in Interleukin-2 and Interleukin-15 - Implications for Clinical Trials. In: *Anticancer research* 39 (1), S. 107–112. DOI: 10.21873/anticancer.13085.
- Turk, Zdenka; Ljubic, Spomenka; Turk, Nikša; Benko, Bojan (2001): Detection of autoantibodies against advanced glycation endproducts and AGE-immune complexes in serum of patients with diabetes mellitus. In: *Clinica Chimica Acta* 303 (1), S. 105–115. DOI: 10.1016/S0009-8981(00)00389-2.
- Uherek, Christoph; Tonn, Torsten; Uherek, Barbara; Becker, Sven; Schnierle, Barbara; Klingemann, Hans-Georg; Wels, Winfried (2002): Retargeting of natural killer–cell cytolytic activity to ErbB2-expressing cancer cells results in efficient and selective tumor cell destruction. In: *Blood* 100 (4), S. 1265–1273.

- van Heijst, Jeroen W. J.; Niessen, Hans W. M.; Hoekman, Klaas; Schalkwijk, Casper G. (2005): Advanced glycation end products in human cancer tissues: detection of Nepsilon-(carboxymethyl)lysine and argpyrimidine. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1043, S. 725–733. DOI: 10.1196/annals.1333.084.
- Vandesompele, Jo; Preter, Katleen De; Pattyn, Filip; Poppe, Bruce; van Roy, Nadine; Paepe, Anne De; Speleman, Frank (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. In: *Genome Biol* 3 (7), S. 1–12. DOI: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034.
- Varki, Ajit (2007): Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. In: *Nature* 446 (7139), S. 1023–1029. DOI: 10.1038/nature05816.
- Varki, Ajit; Schauer, Roland (2009): Sialic Acids. In: Ajit Varki, Richard D. Cummings, Jeffrey D. Esko, Hudson H. Freeze, Pamela Stanley, Carolyn R. Bertozzi et al. (Hg.): *Essentials of Glycobiology*. 2nd. Cold Spring Harbor (NY).
- Vermes, István; Haanen, Clemens; Steffens-Nakken, Helga; Reutellingsperger, Chris (1995): A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. In: *Journal of Immunological Methods* 184 (1), S. 39–51. DOI: 10.1016/0022-1759(95)00072-1.
- Viel, Sébastien; Besson, Laurie; Charrier, Emily; Marçais, Antoine; Disse, Emmanuel; Bienvenu, Jacques et al. (2017): Alteration of Natural Killer cell phenotype and function in obese individuals. In: *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 177, S. 12–17. DOI: 10.1016/j.clim.2016.01.007.
- Villanueva-Cabello, Tania M.; Mollicone, Rosella; Cruz-Muñoz, Mario E.; López-Guerrero, Delia V.; Martínez-Duncker, Iván (2015): Activation of human naïve Th cells increases surface expression of GD3 and induces neoexpression of GD2 that colocalize with TCR clusters. In: *Glycobiology* 25 (12), S. 1454–1464. DOI: 10.1093/glycob/cwv062.
- Vistoli, G.; Maddis, D. de; Cipak, A.; Zarkovic, N.; Carini, M.; Aldini, G. (2013): Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. In: *Free radical research* 47 Suppl 1, S. 3–27. DOI: 10.3109/10715762.2013.815348.
- Vivier, Eric; Ugolini, Sophie; Blaise, Didier; Chabannon, Christian; Brossay, Laurent (2012): Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. In: *Nature reviews. Immunology* 12 (4), S. 239–252. DOI: 10.1038/nri3174.

- Wang, B.; Brand-Miller, J. (2003): The role and potential of sialic acid in human nutrition. In: *European journal of clinical nutrition* 57 (11), S. 1351–1369. DOI: 10.1038/sj.ejcn.1601704.
- Wang, Bing (2012): Molecular mechanism underlying sialic acid as an essential nutrient for brain development and cognition. In: *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)* 3 (3), 465S–72S. DOI: 10.3945/an.112.001875.
- Wang, Wei; Erbe, Amy K.; Hank, Jacquelyn A.; Morris, Zachary S.; Sondel, Paul M. (2015): NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. In: *Frontiers in immunology* 6, S. 368. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00368.
- Wang, Xin-Jie; Zhang, Hong-Xia; Li, Heng; Zhu, Ai-Hua; Gao, Wen-Yun (2019): Measurement of α -dicarbonyl compounds in human saliva by pre-column derivatization HPLC. In: *Clinical chemistry and laboratory medicine*. DOI: 10.1515/cclm-2019-0350.
- Weiskopf, Daniela; Weinberger, Birgit; Grubeck-Loebenstein, Beatrix (2009): The aging of the immune system. In: *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 22 (11), S. 1041–1050. DOI: 10.1111/j.1432-2277.2009.00927.x.
- Wetzels, Suzan; Wouters, Kristiaan; Schalkwijk, Casper G.; Vanmierlo, Tim; Hendriks, Jerome J. A. (2017): Methylglyoxal-Derived Advanced Glycation Endproducts in Multiple Sclerosis. In: *International Journal of Molecular Sciences* 18 (2). DOI: 10.3390/ijms18020421.
- World Health Organization (2011): Glycated haemoglobin (HbA1c) for the diagnosis of diabetes: World Health Organization.
- Xu, Xue; Li, Jianqiang; Zou, Jinfeng; Feng, Xiaowen; Zhang, Chao; Zheng, Ruiqing et al. (2019): Association of Germline Variants in Natural Killer Cells With Tumor Immune Microenvironment Subtypes, Tumor-Infiltrating Lymphocytes, Immunotherapy Response, Clinical Outcomes, and Cancer Risk. In: *JAMA network open* 2 (9), e199292. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2019.9292.
- Xue, Mingzhan; Rabbani, Naila; Thornalley, Paul J. (2011): Glyoxalase in ageing. In: *Seminars in cell & developmental biology* 22 (3), S. 293–301. DOI: 10.1016/j.semcdb.2011.02.013.
- Yagita, M.; Huang, C. L.; Umehara, H.; Matsuo, Y.; Tabata, R.; Miyake, M. et al. (2000): A novel natural killer cell line (KHYG-1) from a patient with aggressive natural killer cell leukemia carrying a p53 point mutation. In: *Leukemia* 14 (5), S. 922–930.

- Yamaji, Toshiyuki; Teranishi, Takane; Alpey, Magnus S.; Crocker, Paul R.; Hashimoto, Yasuhiro (2002): A small region of the natural killer cell receptor, Siglec-7, is responsible for its preferred binding to alpha 2,8-disialyl and branched alpha 2,6-sialyl residues. A comparison with Siglec-9. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (8), S. 6324–6332. DOI: 10.1074/jbc.M110146200.
- Ye, Zhennan; Mittag, Sonnhild; Schmidt, Martin; Simm, Andreas; Horstkorte, Rüdiger; Huber, Otmar (2019): Wnt Glycation Inhibits Canonical Signaling. In: *Cells* 8 (11). DOI: 10.3390/cells8111320.
- Zhang, J. Q.; Nicoll, G.; Jones, C.; Crocker, P. R. (2000): Siglec-9, a novel sialic acid binding member of the immunoglobulin superfamily expressed broadly on human blood leukocytes. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (29), S. 22121–22126. DOI: 10.1074/jbc.M002788200.
- Zhang, Qibin; Ames, Jennifer M.; Smith, Richard D.; Baynes, John W.; Metz, Thomas O. (2009): A perspective on the Maillard reaction and the analysis of protein glycation by mass spectrometry. Probing the pathogenesis of chronic disease. In: *Journal of proteome research* 8 (2), S. 754–769. DOI: 10.1021/pr800858h.
- Zhang, Xu; Dong, Weijie; Zhou, Huimin; Li, Hongshuai; Wang, Ning; Miao, Xiaoyan; Jia, Li (2015): α -2,8-Sialyltransferase Is Involved in the Development of Multidrug Resistance via PI3K/Akt Pathway in Human Chronic Myeloid Leukemia. In: *IUBMB life* 67 (2), S. 77–87. DOI: 10.1002/iub.1351.
- Zhang, Yan; Wallace, Diana L.; Lara, Catherine M. de; Ghattas, Hala; Asquith, Becca; Worth, Andrew et al. (2007): In vivo kinetics of human natural killer cells: the effects of ageing and acute and chronic viral infection. In: *Immunology* 121 (2), S. 258–265. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2007.02573.x.
- Zhou, Tong; Hu, Zheng; Yang, Shuo; Sun, Lin; Yu, Zhenxiang; Wang, Guixia (2018): Role of Adaptive and Innate Immunity in Type 2 Diabetes Mellitus. In: *Journal of diabetes research* 2018, S. 7457269. DOI: 10.1155/2018/7457269.
- Zimmermann, Maya; Meyer, Norbert (2011): Annexin V/7-AAD Staining in Keratinocytes. In: Martin J. Stoddart (Hg.): *Mammalian cell viability. Methods and protocols*. Totowa, NJ: Humana Press (Methods in molecular biology Mammalian cell viability), S. 57–63.
- Zingoni, Alessandra; Molfetta, Rosa; Fionda, Cinzia; Soriani, Alessandra; Paolini, Rossella; Cippitelli, Marco et al. (2018): NKG2D and Its Ligands: "One for All, All for One". In: *Frontiers in immunology* 9, S. 476. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00476.

Anhang

Bei den durchgeführten Western-Blot-Experimenten wurde die gleichmäßige Beladung mittels Ponceau-Färbung der Membran kontrolliert. Abbildung 34 zeigt die die Membranen der Western-Blots aus Abschnitt 3.1.1.1 und 3.1.2.1 nach der Ponceau-Färbung.

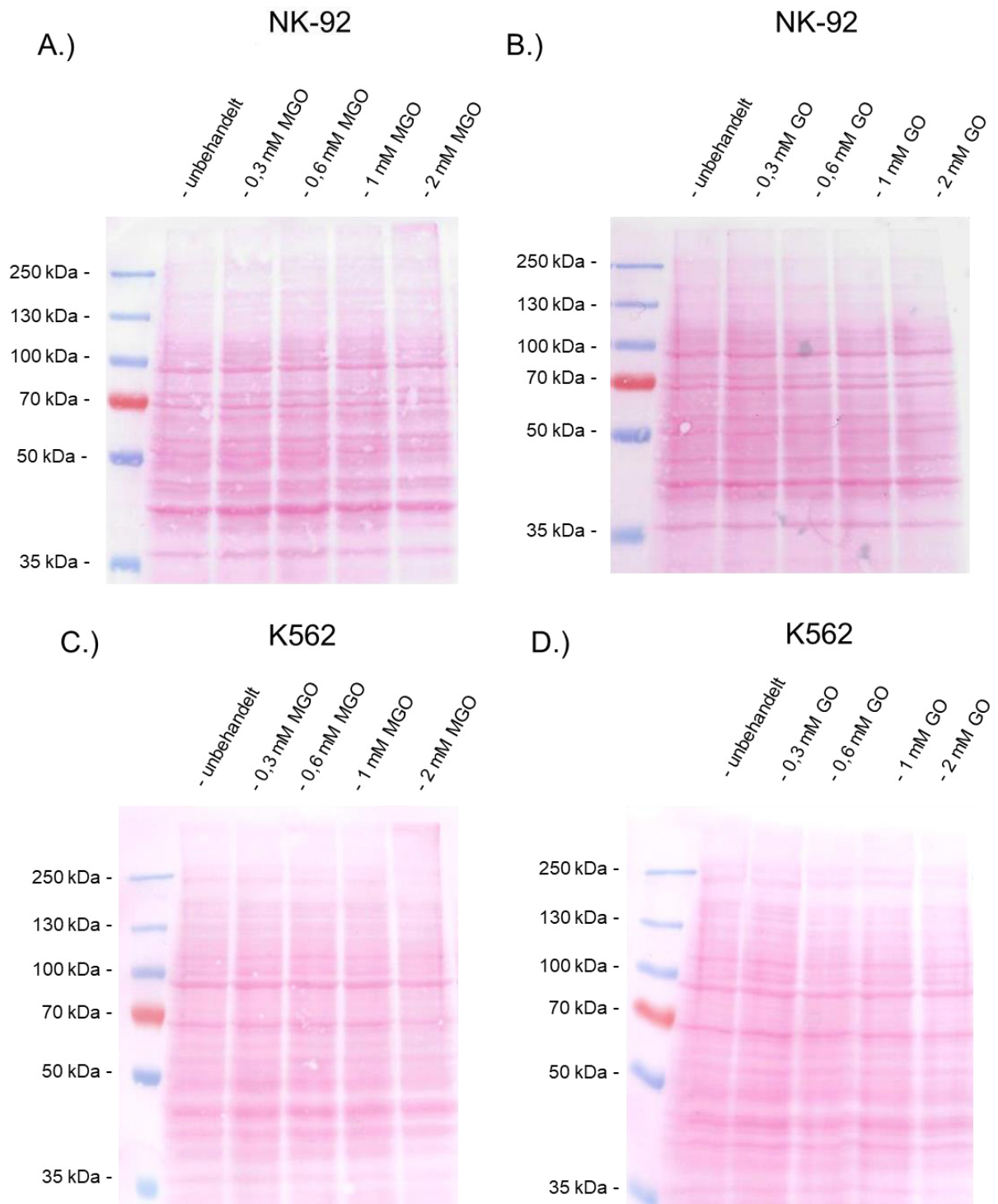


Abbildung 34: Ponceau-Färbung (Anhang)

Gezeigt sind Membranen aus Abbildung 15 (A. und B.) sowie Abbildung 23 (C. und D.) nach der Ponceau-Färbung.

Mit Hilfe des Programms LinRegPCR 2018 wurden die Amplifikationseffizienzen der in der Real-Time-PCR verwendeten Primerpaare bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Amplifikationseffizienzen der verwendeten Primer (Anhang)

| Primer | Amplifikationseffizienz (Mittelwert) | Standardabweichung |
|-------------------|---|---------------------------|
| <i>ST8Sia1</i> | 1,881 | 0,062 |
| <i>ST8Sia4</i> | 1,870 | 0,072 |
| <i>ST8Sia6</i> | 1,902 | 0,062 |
| <i>ST6Gal1</i> | 1,816 | 0,045 |
| <i>ST3Gal1</i> | 1,928 | 0,045 |
| <i>ST3Gal2</i> | 1,801 | 0,023 |
| <i>ST3Gal3</i> | 1,888 | 0,052 |
| <i>ST3Gal4</i> | 1,849 | 0,087 |
| <i>ST3Gal5</i> | 1,914 | 0,076 |
| <i>ST6GalNAc4</i> | 1,857 | 0,048 |
| <i>ST6GalNAc6</i> | 1,922 | 0,114 |
| <i>INF-y</i> | 1,900 | 0,102 |
| <i>B2M</i> | 1,882 | 0,114 |

Publikationsliste

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Rosenstock, Philip; Bezold, Veronika; Bork, Kaya; Scheffler, Jonas; Horstkorte, Rüdiger (2019): Glycation interferes with natural killer cell function.

In: *Mechanisms of Ageing and Development* 178, S. 64–71.

DOI: 10.1016/j.mad.2019.01.006.

Weitere Publikationen:

Bezold, Veronika; **Rosenstock, Philip**; Scheffler, Jonas; Geyer, Henriette; Horstkorte, Rüdiger; Bork, Kaya (2019): Glycation of macrophages induces expression of pro-inflammatory cytokines and reduces phagocytic efficiency.

In: *Aging* 11 (14), S. 5258–5275.

DOI: 10.18632/aging.102123.

Frank, Franziska; Bezold, Veronika; Bork, Kaya; **Rosenstock, Philip**; Scheffler, Jonas; Horstkorte, Rüdiger (2019): Advanced glycation endproducts and polysialylation affect the turnover of the neural cell adhesion molecule (NCAM) and the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE).

In: *Biological chemistry* 400 (2), S. 219–226.

DOI: 10.1515/hsz-2018-0291.

Scheffler, Jonas; Bork, Kaya; Bezold, Veronika; **Rosenstock, Philip**; Gnanapragassam, Vinayaga S.; Horstkorte, Rüdiger (2019): Ascorbic acid leads to glycation and interferes with neurite outgrowth.

In: *Experimental Gerontology* 117, S. 25–30.

DOI: 10.1016/j.exger.2018.08.005.

Oswald, Jana; Büttner, Maximilian; Jasinsky-Bergner, Simon; Jacobs, Roland; **Rosenstock, Philip**; Kielstein, Heike (2018): Leptin affects filopodia and cofilin in NK-92 cells in a dose- and time-dependent manner.

In: *Eur J Histochem* 62 (1).

DOI: 10.4081/ejh.2018.2848.

Rosenstock, Philip; Horstkorte, Rüdiger; Gnanapragassam, Vinayaga Srinivasan; Harth, Jörg; Kielstein, Heike (2017): Siglec-7 expression is reduced on a natural killer (NK) cell subset of obese humans.

In: *Immunol Res* 4, S. 579.

DOI: 10.1007/s12026-017-8942-y.

Bähr, Ina; Goritz, Vincent; Doberstein, Henriette; Hiller, Grit Gesine Ruth; **Rosenstock, Philip**; Jahn, Janine et al. (2017): Diet-Induced Obesity Is Associated with an Impaired NK Cell Function and an Increased Colon Cancer Incidence.

In: *Journal of Nutrition and Metabolism* 2017 (3), S. 1–14.

DOI: 10.1155/2017/4297025.

Lebenslauf

Zur Person:

| | |
|---------------|-------------------|
| Name: | Philip Rosenstock |
| Wohnort: | Halle |
| Geburtsdatum: | 23. Dezember 1989 |
| Geburtsort: | Hannover |
| Nationalität: | deutsch |

Ausbildung:

| | |
|-----------------------|---|
| seit Nov. 2016 | Promotionsstudent am Institut für Philologische Chemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg |
| Okt. 2014 – Okt. 2016 | Biochemie (Master) an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg |
| Okt. 2011 – Okt. 2014 | Biochemie (Bachelor) an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg |
| 2002 – 2009 | Abitur am Gymnasium Schillerschule Hannover |

Berufserfahrung:

| | |
|-----------------------|---|
| Sept. 2010 - Mai 2011 | <i>Work and travel</i> in Australien |
| Jun. 2010 - Aug. 2010 | Krankheitsvertretung in der Stationären Erlössicherung der Medizinischen Hochschule Hannover |
| Aug. 2009 – Apr. 2010 | Zivildienst an der Medizinischen Hochschule Hannover (stationäre Patientenaufnahme) |

Datum, Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuerst gebührt mein herzlichster Dank Herrn Prof. Dr. Rüdiger Horstkorte, der mir ermöglicht hat die Promotion im Institut für Physiologische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg anzufertigen. Für das entgegengebrachte Vertrauen, die fachlichen Ratschläge sowie die Unterstützung und Motivation bin ich ihm sehr dankbar. Zudem war er jederzeit bei Problemen oder Fragen erreichbar, weshalb ich mir keine bessere Betreuung wünschen könnte.

Außerdem möchte ich mich bei Frau PD Dr. Iris Thondorf bedanken, die als Verantwortliche Hochschullehrerin des Instituts für Biochemie und Biotechnologie die Betreuung der Arbeit als Gutachterin übernommen hat.

Herrn Prof. Dr. Lars-Oliver Klotz von der Friedrich-Schiller-Universität Jena danke ich ebenfalls für die Betreuung der Arbeit als Gutachter, sowie seiner Tätigkeit als Betreuer im Graduiertenkolleg ProMoAge.

Zudem gebührt mein Dank dem Graduiertenkolleg ProMoAge (GRK 2155), über welches diese Arbeit finanziert wurde. Außerdem ermöglichten die zahlreichen Workshops und Kurse einen regen Austausch über verschiedene Forschungsgebiete und Methoden und stärkten mein Interesse an der Alternsforschung. Durch das GRK wurde mir auch die Teilnahme an verschiedenen Konferenzen ermöglicht, was mir die Möglichkeit gab meine Forschung mit nationalen und internationalen Wissenschaftlern zu diskutieren.

Herrn Ingo Holstein danke ich für die Bereitstellung der Zelllinien, die als Positivkontrollen für die Primer verwendet wurden. Bei Frau Dr. Chiara Massa möchte ich mich für die Bereitstellung der primären NK-Zellen bedanken.

Dr. Kaya Bork und Dr. Heidi Olzscha danke ich für die vielen konstruktiven Gespräche, Anregungen und Hilfestellungen. Beide waren jederzeit bei Problemen oder Fragen erreichbar und haben mich sehr gut unterstützt.

Darüber hinaus danke ich allen Mitgliedern der AG Horstkorte für die tolle Arbeitsatmosphäre und Zusammenarbeit. Vor allem möchte ich dabei Veronika Bezold, Jonas Scheffler, Philipp Selke und Annett Thate erwähnen. Sowohl bei fachlichen Problemen als auch bei zahlreichen Aktivitäten abseits der Forschung zeigte sich der großartige Zusammenhalt und die gegenseitige Unterstützung in der Arbeitsgruppe.

Außerdem gilt mein Dank natürlich auch meinen Eltern, die mich während des gesamten Studiums unterstützt haben, sowie meiner Freundin Lisa, die mir stets mit Ratschlägen und Aufmunterungen zur Seite stand.

Diese Arbeit wurde von der Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) über das GRK 2155 (ProMoAge) gefördert.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Die eingereichte schriftliche Fassung der Arbeit entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Weiterhin versichere ich, dass die vorliegende Arbeit noch nicht als Abschlussarbeit an anderer Stelle eingereicht wurde. Zudem versichere ich, dass diesem Promotionsverfahren keine gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Datum, Unterschrift