

Aus dem Lübecker Institut für experimentelle Dermatologie

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. R. Ludwig

---

**Validierung therapeutischer Zielstrukturen für die Modifikation  
der Expression der Glykosyltransferasen B4Galt1 und St6Gal1 in  
aktivierten B-Zellen und Plasmazellen**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin –

vorgelegt von  
Friederike Breternitz  
aus Troisdorf

Lübeck 2020

1. Berichterstatterin/Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ralf Ludwig

2. Berichterstatterin/Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. David Juhl

Tag der mündlichen Prüfung: 17.01.2023

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 17.01.2023

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

## **Abstract**

Antibodies play a key role in the humoral adaptive immune response by binding to antigens and opsonizing as well as neutralizing pathogens. They play an important role in immune defense and many disease types just as cancer, inflammatory disorders and autoimmune diseases. Antibodies are glycoproteins which vary in their number of glycosylation sites. They are glycosylated at a single asparagine-297 residue in the Fc-domain. There are two enzymes -  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase (B4Galt1) and  $\alpha$ -2,6-sialyltransferase 1 (St6Gal1) - which are crucial for the addition of galactose or sialic acid. Changes in glycosylation contribute directly to altered effector functions. The glycosylation pattern varies depending on the physiological status of individuals regarding age, sex and pregnancy and have been documented in many different diseases. The loss of glycosylation leads to a pro-inflammatory effector functions while as glycosylated antibodies show an anti-inflammatory effector function.

This project aimed to validate therapeutic targets that influence the expression of B4Galt1 and/or St6Gal1 in activated B cells and plasma cells. Based on a previous screening of the Target Selective Inhibitory Library by Selleck Chemicals 27 substances have been further validated. Therefore, B cells have been isolated from healthy human blood donors, were stimulated with IL21 and Anti-CD40 and analyzed by the proliferation, cytotoxicity and the release of antibodies by the presence or absence of the 27 substances.

This project validated 9 substances which have a significant impact on the expression of the glycosyltransferases B4Galt1 and/or St6Gal1 by not being cytotoxic. 4 substances upregulated and 5 substances down regulated the expression of the glycosyltransferases. Further investigations of these substances are necessary to identify drugs that can be used therapeutically. Therefore, the experiments should be repeated by using another stimulation, analyzing the glycosylation status and the amount of antibodies. In future projects, the identified substances should also be tested in the mouse model and in clinical studies.

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC	Antigenpräsentierende Zellen
B4Galt1	Beta-1,4-galactosyltransferase 1
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
dest. Wasser	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbend Assay
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FcR	Fc-Rezeptor
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht
HRP	Meerrettich-Peroxidase
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
INT	Tetrazoliumsalz 2-[4-Iodphenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid
Kontr.	Kontrolle
LDH	Laktat-Dehydrogenase
MACS	Magnetic-activated cell sorting
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
min	Minute
MNC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
NA	Nicht auswertbar
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NEAA	Non-essential amino-acids
Neg.	Negativ
PE	Phycoerythrin

Pos.	Positiv
rpm	revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
s.	siehe
s.o.	siehe oben
SSC	Seitwärtsstreulicht
St6Gal1	$\beta$ -galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 1
stim.	stimuliert
Tab.	Tabelle
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
unstim.	unstimuliert

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abstract</b>	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Das Immunsystem	1
1.2. B-Lymphozyten	3
1.3. Antikörper	7
1.4. Die Rolle der Glykosylierung bei der Immunantwort	8
1.5. Glykosyltransferasen: B4Galt1 und St6Gal1	12
1.5.1. B4Galt1	12
1.5.2. St6Gal1	13
1.6. Screening der <i>Target Selective Inhibitory Library</i> auf Effekte der Glykosylierung von B-Zellen	14
1.7. Ziel der Arbeit	15
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1. Verwendete Laborgeräte und Materialien	16
2.2. Isolation und Stimulation humaner B-Lymphozyten	22
2.3. Reinheitskontrolle der isolierten B-Lymphozyten	25
2.4. Testung der Substanzen	25
2.5. Durchflusszytometrie	26
2.6. LDH-Zytotoxizitätsassay	29
2.7. ELISA zur Quantifizierung der IgM- und IgG-Konzentration	30
2.8. Auswertung und Statistik	31
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>34</b>
3.1. Die <i>in vitro</i> Stimulation von humanen B-Lymphozyten führten zur Steigerung der Expression von Glykosyltransferasen	34
3.2. Etomidat und SB 525334 zeigten aktivierende Effekte auf die Expression der Glykosyltransferasen bei CD19 <sup>+</sup> Zellen	39
3.3. 15 Substanzen zeigten einen hemmenden Effekt auf die Expression der Glykosyltransferasen	41
3.4. Sechs Substanzen hatten keinen Effekt auf die Expression der Glykosyltransferasen	46
3.5. B-Zellsubtypen spezifische Effekte	46
3.5.1. Aliskiren hemifumarat zeigte einen signifikant aktivierenden Effekt auf die Expression von B4Galt1 in CD19 <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup> Zellen	47
3.5.2. Stattic zeigte einen signifikant hemmenden Effekt auf die Expression von B4Galt1 und St6Gal1 in den B-Zellsubtypen	48
3.6. Substanzen steigern die Antikörpertiter von IgM und IgG	49
3.7. 12 Substanzen zeigten einen signifikant zytotoxischen Effekt und zwei Substanzen einen zytoprotektiven Effekt	51

<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>56</b>
4.1.	Methodenkritik	64
4.2.	Ausblick	66
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>67</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>68</b>
	<b>Anhang</b>	<b>81</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>91</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>93</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein ständig aktives Schutzsystem, das den menschlichen Körper vor Mikroorganismen, fremden Substanzen und entarteten sowie überalterten und geschädigten, körpereigenen Zellen schützt. Es dient der Abwehr von Krankheitserregern und die durch sie verursachten Schäden und fördert die Heilung. Das Immunsystem schützt dabei in vier Schritten: (i) Die immunologische Erkennung dient der gezielten Identifizierung und Lokalisierung einer Infektion; (ii) durch die Immuneffektorfunktion wird die Krankheit eingedämmt oder vollständig abgewehrt; (iii) die Immunregulation verhindert dazu ergänzend einen körpereigenen Schaden; (iv) die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses führt schließlich zu einer langfristig schützenden Immunität (1).

Das Immunsystem besteht aus der angeborenen, unspezifischen und der erworbenen, spezifischen Immunabwehr. Beide Teile lassen sich jeweils nochmals in einen zellulären und humoralen Anteil gliedern. Die vier Teile des Gesamtsystems sind vernetzt und arbeiten zum Schutz vor Krankheit eng zusammen. Die Zellen des Immunsystems gehen aus Vorläuferzellen im Knochenmark, den hämatopoetischen Stammzellen hervor. Daraus entwickeln sich die myeloischen Zellen und die lymphoiden Zellen (2).

Die angeborene Immunantwort, welche entwicklungsgeschichtlich als die Ältere zu betrachten ist, ist ein Schutzsystem, welches sofort verfügbar (wenige Stunden) und auf der Mustererkennung von Oberflächen mittels eines geringen Rezeptorspektrums beruht. Der zelluläre Teil der angeborenen Immunantwort beinhaltet als erste Abwehr gegen Krankheitserreger die Ausstattung des Körpers mit Oberflächenbarrieren. Haut und Schleimhäute dienen als physikalische Barrieren und sind Produktionsstätte chemischer Substanzen, welche toxische Wirkungen oder wachstumshemmende Funktionen auf Mikroorganismen ausüben (3,4).

Die Phagozyten kommen bei einer Infektion als zweiter Schutzmechanismus zum Einsatz. Zu den Phagozyten zählen die Makrophagen, Granulozyten und dendritischen Zellen. Die



langlebigen Makrophagen gehen aus Monozyten im Blut hervor und wandern in alle Gewebe des Körpers ein. Neben ihrer Hauptfunktion, der Phagozytose, führen sie zur Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen sowie anderen chemischen Mediatoren. Dadurch kommt es zur Entstehung von Entzündungen; zudem werden neutrophile Granulozyten und Plasmaproteine zum Infektionsherd geleitet. Die Granulozyten teilen sich in drei Untergruppen auf: neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten. Die kurzlebigen neutrophilen Granulozyten kommen im Blut vor und betreiben Phagozytose. Eosinophile und basophile Granulozyten sind nur in geringen Maße phagozytotisch aktiv. Sie dienen primär der Abwehr von Parasiten und sind an allergischen Entzündungsreaktionen beteiligt. Des Weiteren haben die dendritischen Zellen eine phagozytotische Effektorfunktion. Die Hauptfunktion der dendritischen Zellen besteht jedoch in der Stimulierung und Aktivierung von Zellen des adaptiven Immunsystems, wie den T-Lymphozyten und der Produktion von Zytokinen und Chemokinen (5).

Zum zellulären Teil der unspezifischen Immunantwort gehören zudem die Mastzellen. Sie sind vor allem an allergischen Reaktionen, aber auch der Abwehr von Parasiten und der Freisetzung von Histamin beteiligt. Darüber hinaus sind die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) Teil der unspezifischen Immunantwort. Durch die Freisetzung apoptotischer Substanzen dienen sie der Abwehr gegen Viren und andere intrazelluläre Krankheitserreger (5).

Zum humoralen Teil der unspezifischen Immunantwort zählen die Zytokine, Chemokine und Interferone, sowie das Komplementsystem. Zytokine haben einen aktivierenden Effekt auf ihre Zielzelle, indem Adapterproteine und Signalkaskaden aktiviert werden und die Zellteilung und Differenzierung gefördert wird. Interferone tragen zur Abwehr von viralen Infektionen bei und wirken durch ihre Freisetzung aktivierend auf die Zielzelle. Chemokine sind chemotaktisch aktive Zytokine, welche als Chemoattraktoren Leukozyten zum Infektionsherd leiten. Des Weiteren tragen sie zur Entwicklung und Wanderung von Lymphozyten, der Angiogenese und der Stimulation von Zellen bei (6). Das Komplementsystem ist ein System aus rund 30 Plasmaproteinen, welches mittels kaskadenartiger Reaktionen zur Opsonisierung von Pathogenen, der Mobilisierung von

inflammatorischen und immunkompetenten Zellen sowie zur Lyse von Zellen bzw. Pathogenen durch die Bildung eines membranangreifenden Komplexes führt (7).

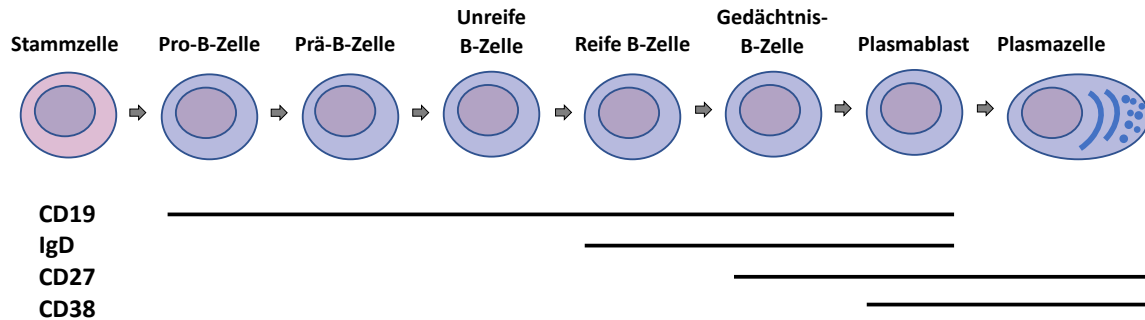
Die erworbene Immunantwort, das phylogenetische jüngere System, bedarf einer längeren Reaktionszeit und beruht auf der Mustererkennung von Oberflächen mittels eines großen Rezeptorspektrums. Die erworbene Immunabwehr ist zuständig für die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses. Der zelluläre Teil der erworbenen Immunantwort beruht auf den B- und T-Lymphozyten und der humorale Teil beinhaltet die Antikörper (3,8).

Die T-Zellen sind wichtige Effektorzellen der zellulären Mechanismen der Immunantwort und dienen nach ihrer Entwicklung im Knochenmark und der weiteren Ausreifung im Thymus der Abwehr von intrazellulären Krankheitserregern und der Aktivierung von B-Zell-Reaktionen. Hierfür kommt es nach Antigenkontakt, mittels molekülspezifischen Antigenrezeptoren (T-Zell-Rezeptoren) auf der T-Zelloberfläche, zur Differenzierung der naiven T-Zellen zu T-Effektorzellen. Zu den T-Effektorzellen zählen die Helfer-T-Zellen, die regulatorischen T-Zellen, die  $T_{FH}$ -Zellen und die cytotoxischen T-Zellen. Helfer-T-Zellen sind  $CD4+$ -Zellen, welche sich nochmals in  $CD4-T_H1$ -Zellen,  $CD4-T_H2$ -Zellen,  $CD4-T_H9$ -Zellen,  $CD4-T_H17$ -Zellen und  $CD4-T_H22$ -Zellen differenzieren. Zu ihren Funktionen zählt die Aktivierung von B-Zellen sowie deren Differenzierung zu Plasmazellen. Regulatorische T-Zellen sind ebenfalls  $CD4+$ -Zellen, welche T-Zell-Reaktionen unterdrücken, inhibitorische Cytokine produzieren und somit eine überschießende Immunantwort regulieren. Des Weiteren sind die  $CD4-T_{FH}$ -Zellen für die Produktion von opsonisierenden Antikörpern zuständig. Cytotoxische T-Zellen sind  $CD8+$ -Zellen, die einen Integritätsverlust der Zellmembran verursachen und somit die Apoptose virusinfizierter Zellen einleiten (9,10).

## **1.2. B-Lymphozyten**

Die B-Lymphozyten (B-Zellen) sind Teil der zellulären Komponente des erworbenen Immunsystems und nehmen als Produzenten der Antikörper eine zentrale Rolle in der Abwehr von Krankheitserregern ein. Durch die Proliferation und Differenzierung der B-Zellen entwickeln sich Plasmazellen, welche als Effektorfunktion für die Produktion der Antikörper, der sezernierten Form des B-Zell-Rezeptors (BCR), zuständig sind. Die

Entwicklung der B-Zellen erstreckt sich über mehrere Entwicklungsschritte (s. Abb. 1.2.1.), woran neben dem BCR, Korezeptoren, Kostimulatoren und Koinhibitoren beteiligt sind (8,11).



**Abb. 1.2.1.: B-Zellentwicklung und die Expression von spezifischen Oberflächenmarkern**

Graphisch dargestellt zeigt sich die B-Zellentwicklung und das Expressionsverhalten der Oberflächenmarker CD19, IgD, CD27 und CD38 (11,12).

Als Ursprung der B-Zell-Entwicklung gelten die hämatopoetischen Stammzellen (HSC), aus welchen die multipotenten Vorläuferzellen (MPP) hervorgehen. Nach einem weiteren Differenzierungsschritt gehen aus der gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle (CLP) die B-Zellen, T-Zellen und NK-Zellen hervor (13).

Die B-Zelle differenziert sich im Weiteren zunächst von der Pro-B-Zelle zur Prä-B-Zelle. In dieser Phase kommt es zur genetischen Rekombination, wodurch ein großes Spektrum an Antikörperrezeptoren geschaffen wird. Es folgt der Übergang von der Prä-B-Zelle zur unreifen B-Zelle und anschließend die Testung auf Autoreaktivität. Zeigt eine unreife B-Zelle ein Reaktionspotenzial gegenüber körpereigenen Antigenen bestehen vier Möglichkeiten der Weiterentwicklung: Das Rezeptor-Editing, die klonale Deletion, die Anergie und die immunologische Ignoranz (13).

Ein weiterer Schritt in der B-Zell-Entwicklung ist die Bildung eines funktionsfähigen B-Zell-Rezeptorkomplexes, bestehend aus einem membranständigen, monomeren Immunglobulinmolekül (sIg) und den akzessorischen Molekülen  $Ig\alpha$  und  $Ig\beta$ . Nach Antigenbindung kommt es zur Aktivierung von Kinasen und Transkriptionsfaktoren, sowie der Bildung von Multiproteinkomplexen, welche für die Differenzierung, Proliferation und

das Überleben der B-Zellen notwendig sind. Im Folgenden werden die verdauten Peptide von den B-Zellen mittels Major Histocompatibility Complex class II (MHC-II) präsentiert (11,14).

Eine Reihe an Korezeptoren, Kostimulatoren und Koinhibitoren beeinflussen die Aktivität des BCRs: Während der Entwicklung von B-Zellen kommt es zur Expression des Glykoproteins CD19 der Immunoglobulinsuperfamilie. CD19 ist allein oder in Kombination mit seinem Komplex aus CD21, CD81 und CD225 ein Verstärker für die Aktivierung der B-Zelle durch Antigene. CD21 ist ein Rezeptor für das Komplementfragment C3dg. Antigene, an denen C3dg gebunden sind, führen zur Quervernetzung des CD19:CD21:CD81:CD225-Komplexes und verursachen die Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne von CD19. Der BCR und sein Korezeptorkomplex führen über den Signalweg der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3-Kinase) zur Rekrutierung und Aktivierung von Signalwegen, welche für das Überleben der Zelle, den Zellzyklus und den Metabolismus von Glucose zuständig sind (11,14).

Einen kostimulatorischen Effekt auf die Entwicklung der B-Zellen zeigen die Rezeptoren der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptorsuperfamilie (TNFRSF: CD40, BAFFR, TACI, BCMA, CD27), durch dessen Wirkung es zur Stimulation der B-Zellen in ihrer Funktion als antigenpräsentierende Zelle kommt. Einen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen zeigen hingegen eine Reihe von Koinhibitoren, wie der Fc- $\gamma$ RIIB-Rezeptor, BTLA (B- und T-Lymphozyten-Attenuator), der PD-1 Rezeptor und CD22, welche zur Blockierung der Signalwege führen (11,14).

Bei der Entwicklung und Differenzierung von B-Zellen sind zudem maßgeblich folliculäre Helfer-T-Zellen beteiligt ( $T_{FH}$ ), welche die von B-Zellen präsentierte Peptid:MHC-Komplexe erkennen und Überlebenssignale auslösen. Des Weiteren kommt es durch die  $T_{FH}$ -Zellen zur Freisetzung von Zytokinen, wie beispielsweise von IL-21, IL-6, IL-4, TGF- $\beta$  und IFN- $\gamma$ , welche die Proliferation und Differenzierung zur Plasma- und B-Gedächtniszelle fördern. Für eine erfolgreiche Signalübermittlung zwischen  $T_{FH}$ -Zelle und B-Zelle sind die interzellulär stabilisierenden Adhäsionsmoleküle der signalübertragenden Lymphozytenaktivierungsmoleküle (SLAM-Familie) erforderlich. Darüber hinaus besteht

die Möglichkeit zur T-Zell unabhängigen Stimulation von B-Zellen. Thymusunabhängige TI-Antigene (thymus independent), wie bakterielle Polysaccharide, polymere Proteine und Lipopolysaccharide (LPS), wirken B-Zell stimulatorisch und fördern die Antikörperproduktion (12).

Verfügt die unreife B-Zelle über einen funktionsfähigen B-Zell-Rezeptorkomplex, kommt es unter Expression von Sphingosin-1-phosphat-Rezeptor 1 (S1PR1) zur Auswanderung in die Peripherie. Über den Blutkreislauf werden die unreifen B-Zellen in die Milz und die Lymphknoten transportiert und eine zweite Testung auf Autoreaktivität erfolgt. Hierbei kommen die klonale Deletion und die Anergie als Reaktion auf reaktive Zellen zum Einsatz. Ein langfristiges Überleben der unreifen B-Zellen in der Peripherie und die finale Reifung ist nur durch Eintritt in die Follikel der Milz und die Expression des B-Zell-aktivierenden Faktors der TNF-Familie (BAFF) gewährleistet. Für die Entwicklung zur reifen B-Zelle in der Milz werden die transitionalen Stadien T1 und T2 (T1 – CD21 exprimiert, T2 – CD21 nicht exprimiert) durchlaufen.

Im weiteren Verlauf aggregiert ein Teil der differenzierten B-Zellen zu Primärfokussen in den Marksträngen der Lymphknoten und der roten Pulpa der Milz, aus welchen die antikörperproduzierende Plasmablasten hervor gehen. Der andere Teil wandert zu einem primären Lymphfollikel und bildet ein Keimzentrum mit proliferierenden B-Zellen. Die B-Zellen durchlaufen den Prozess der somatischen Hypermutation, der aus der Affinitätsreifung und dem Isotypenwechsel besteht. Im Folgenden wandern die B-Zellen in das Knochenmark, in die Markstränge der Lymphknoten und die rote Pulpa der Milz (13).

Es folgt die Differenzierung zu antikörperproduzierenden Plasmazellen oder B-Gedächtniszellen. Zunächst differenzieren sich die proliferierenden B-Zellen zu Antikörperproduzierenden Plasmablasten. Nach einigen Tagen entwickeln sich aus den Plasmablasten im Keimzentrum die langlebigen Plasmazellen. Bei der Plasmazelldifferenzierung werden zu Beginn die hemmenden Transkriptionsfaktoren Pax-5 und Bcl-6 runter reguliert und mittels des Transkriptionsfaktors IRF4 die Expression des Transkriptionsrepressors BLIMP-1 induziert. Ebenfalls wichtig für die Differenzierung und das Überleben der Plasmazellen sind die Signale der T-Zellen. Im Folgenden wird die Proliferation reduziert, die Synthese und Sekretion von Immunglobulinen gesteigert und

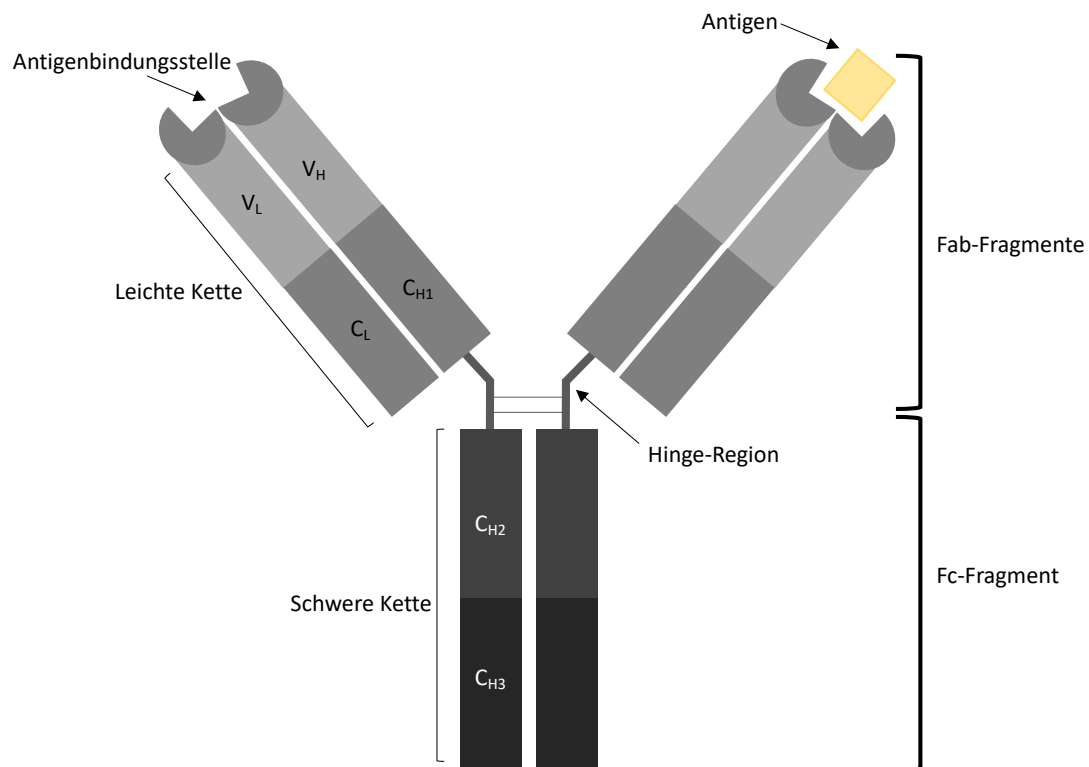
Zelloberflächenveränderungen erfolgen. Die Plasmazellen verlassen das Keimzentrum und gelangen in die peripheren Gewebe. Ein weiterer Teil der B-Zellen der Keimzentren differenziert sich zu B-Gedächtniszellen. Diese werden von Antigenen stimuliert und vermehren sich daraufhin im Keimzentrum. Sie durchlaufen erneut den Prozess des Isotypenwechsels und der somatischen Mutation. Zu gleich besteht die Möglichkeit, dass B-Gedächtniszellen aus kurzlebigen Plasmazellen hervor gehen, die bei der Primärantwort gebildet werden. B-Gedächtniszellen exprimieren Markerproteine wie CD27, ein Vertreter der TNF-Rezeptor-Familie, große Mengen MHC-Klasse-II-Moleküle und den Kostimulator B7.1. Somit wird eine effektive Antigenaufnahme und die  $T_{FH}$ -Zellen Präsentation ermöglicht und eine schnelle Antikörperproduktion gewährleistet. Die B-Gedächtniszellen zirkulieren durch die sekundär lymphatischen Kompartimente und haben eine wichtige Funktion bei der Sekundärantwort, wobei Antikörper aus der Primärreaktion freigesetzt werden (11,12,15).

Die unterschiedlichen Entwicklungsstadien der B-Zellen zeichnen sich durch die Expression verschiedener Oberflächenmarker aus und ermöglichen so eine Differenzierung mittels Immunmarkierung (s. Abb. 1.2.1.). Der Oberflächenmarker CD19 wird in der Entwicklung der B-Zellen früh exprimiert und ist bis ins Stadium der Plasmablasten nachweisbar. Die reifen B-Zellen zeichnen sich durch die Oberflächenmarker IgM und IgD aus. Des Weiteren exprimieren B-Gedächtniszellen den Oberflächenmarker CD27 und Plasmazellen zeichnen sich durch CD38 auf ihrer Zelloberfläche aus (11,12).

### **1.3. Antikörper**

Als humoraler Teil der erworbenen Immunantwort kommen die Antikörper zum Einsatz. Antikörper werden von Plasmazellen, welche wiederum von ihren Vorläuferzellen, den B-Zellen abstammen, produziert. Die antigen-bindenden Glykoproteine bestehen aus zwei schweren (heavy, H-Kette) und zwei leichten (light, L-Kette) Polypeptidketten, welche wiederum jeweils aus einer variablen (V) und einer konstanten (C) Domäne bestehen. Bei den leichten Ketten unterscheidet man zwischen Kappa-( $\kappa$ )- und Lambda-( $\lambda$ )-Kette. Die Antikörper lassen sich in zwei Fab-Fragmente (antigen-binding fragment) und das Fc-Fragment (crystallisable fragment) einteilen (s. Abb. 1.3.1.). Strukturell und funktionell

lassen sich die Antikörper in fünf Klassen (Isotypen) einteilen: IgA (1+2), IgD, IgE, IgG (1-4) und IgM. Ein Isotyp-Wechsel wird durch die Stimulation eines Antigens sowie spezifische Regulationssignale von T-Zellen hervorgerufen. Durch die Bindung eines Antigenepitops sind Antikörper zuständig für die Neutralisierung von Pathogenen, die Opsonisierung und die Komplementaktivierung (16).



**Abb. 1.3.1.: Aufbau eines monomeren Antikörpers**

#### 1.4. Die Rolle der Glykosylierung bei der Immunantwort

Antikörper sind entscheidend für die humorale, erworbene Immunantwort. Als Glykoproteine unterscheiden sie sich in ihrem Glykosylierungsmuster. Die Glykosylierung der Antikörper ist physiologisch und zuständig für die Stabilität und die biologische Halbwertszeit der Antikörper (17). Veränderungen der Glykosylierung haben somit Einfluss auf die Stabilität, die Lebensdauer und die Effektorfunktion der Antikörper (18). Das Glykosylierungsmuster des Individuums wird vom Alter, der geographischen Herkunft, dem Geschlecht, Schwangerschaft und Krankheit beeinflusst (18). Beispielsweise ist in der frühen Kindheit und im Alter die Glykosylierung der Antikörper reduziert (19–21). Hingegen

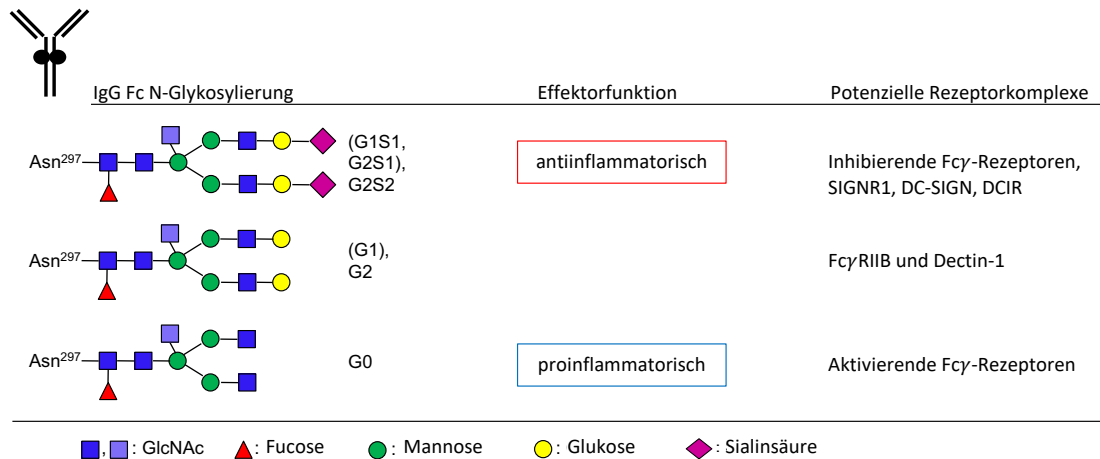
ist im Schwangerschaftsverlauf ein Anstieg der Glykosylierung zu beobachten. Studien zeigen, dass Veränderungen des Glykosylierungsmusters hinsichtlich der Zunahme der Glykosylierung von IgG im Rahmen einer Schwangerschaft möglicherweise ursächlich für die Symptomverbesserung von Autoimmunerkrankungen sein kann (22–24). Zudem wird eine Abnahme der Glykosylierung im Zuge vieler Autoimmunerkrankungen, Infektionen und onkologischer Erkrankungen beobachtet (21,25). Zu den Autoimmunerkrankungen gehören beispielsweise die Rheumatoide Arthritis (22,23,26–32), Systemischer Lupus erythematoses (33,34), Multiple Sklerose (35,36), Diabetes mellitus (37) und das Sjögren-Syndrom (38,39). Ebenfalls werden bei chronischen Infektionen wie bei HIV und Tuberkulose eine Reduktion der Glykosylierung beobachtet (40–44). Zudem spielt die Glykosylierung in der Pathogenese von Krebserkrankungen eine wichtige Rolle, wie sich beispielsweise bei Lungen- (45), Leber- (46,47), Brust- (48,49), Prostata- (50) und Darmkrebs (51,52) sowie bei Leukämie (53) zeigt.

Glykosylierung findet sich bei allen fünf Antikörper Isotypen und unterscheidet sich hinsichtlich der Anzahl, der Lokalisation und des Glykolysierungsmusters, sowie der Effektorfunktion. Im Folgenden wird sich auf die Glykosylierung von Antikörpern des im Serum am häufigsten vorkommenden Isotypes IgG bezogen (54,55). Die Glykosylierung von IgG Antikörper findet an den beiden CH-Ketten der Fc-Domäne über eine N-glykosidische Bindung an Asparagin 297 statt. Die Basis der Glykanstruktur besteht aus vier N-Acetylglucosamin- (GlcNAc) und drei Mannose-Molekülen. Optional wird die Basisstruktur durch ein weiteres GlcNAc- und Fucose-Molekül sowie zwei Galactose- und Sialinsäure-Moleküle erweitert (s. Abb. 1.4.1.) (55,56). Durch verschiedene Kombinationen sind somit 32 unterschiedliche Glykosylierungsmuster möglich. Die Glykosylierung beginnt im endoplasmatischen Retikulum und wird im Golgi-Apparat fortgesetzt (55,58).

Die Galaktosemoleküle sowie ihre benachbarten terminalen Sialinsäuremoleküle sind entscheidend für eine pro- oder antiinflammatorische Effektorfunktion. Je nachdem ob Galaktose und Sialinsäure Teil der Glykanstruktur sind, klassifiziert man die Antikörper in G0, G1, G2, G1S1, G2S1 und G2S2 (G=Glucose, S=Sialinsäure). Ein Galaktose- und Sialinsäure-armer Antikörper verfügt über eine proinflammatorische Effektorfunktion,



während Galaktose- und Sialinsäure-reiche Antikörper sich durch eine antiinflammatorische Wirkung auszeichnen (s. Abb. 1.4.1.) (17,55).



**Abb. 1.4.1.: Die Glykosylierung von Antikörpern hat Einfluss auf die Effektorfunktion**

Die modifizierte Abbildung nach Collin und Ehlers stellt die Glykosylierung von Antikörpern und deren Auswirkung auf die Effektorfunktion dar. IgG Antikörper werden an den beiden CH-Ketten der Fc-Domäne über eine N-glykosidische Bindung an Asparagin 297 glykosyliert. Die Basis der Glykanstruktur besteht aus vier N-Acetylglucosamin- (GlcNAc, blau) und drei Mannose- (grün) Molekülen. Optional wird die Basisstruktur durch ein weiteres GlcNAc- und Fucose- (rot) Molekül sowie zwei Galactose- (gelb) und Sialinsäure- (pink) Moleküle erweitert. Die Antikörper bilden mit den Fc-Rezeptoren vom Typ 1 und 2 Rezeptorkomplexe und üben so ihre Effektorfunktion aus. Galaktose und Sialinsäure reiche Immunkomplexe wirken antiinflammatorisch, während Galaktose und Sialinsäure arme Immunkomplexe eine proinflammatorische Effektorfunktion zeigen (56).

Die pro- oder antiinflammatorischen Effektorfunktionen werden durch die Spezifität und Affinität zum Fc-Rezeptor und sowie durch das Komplementsystem bestimmt. Die Antikörper bilden zusammen mit Antigenen Immunkomplexe, welche zur Expression von Fc-Rezeptoren auf Effektorzellen führen. Die Antikörper können abhängig von ihrem Glykosylierungsstatus mittels ihrer Fc-Domäne Fc-Rezeptoren vom Typ 1 oder 2 binden. Zu den Typ 1 Fc-Rezeptoren zählen die aktivierenden (FcγRIA, FcγRIIA, FcγRIIC, FcγRIIIA, FcγRIIIB) und die inhibierenden (FcγRIIA) Fcγ-Rezeptoren. Typ 2 Fc-Rezeptoren beinhalten Mitglieder der C-Typ Lektin-Domäne Familie 4 (SIGNR1, DC-SIGN, DCIR) und der B-Zell-Rezeptoren (CD22, CD23) (57,59,60). Durch die Aktivierung der aktivierenden Fcγ-Rezeptoren kommt es zur Vernetzung von mehreren Rezeptoren. Als Folge dessen werden Entzündungsmediatoren freigesetzt, die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) ausgelöst, die Regulation der Antikörperproduktion beeinflusst und die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowie Phagozytose eingeleitet. Die Interaktion der

Fc-Domänen mit inhibitorischen Fc $\gamma$ -Rezeptoren führt hingegen zu einer Reduktion der Phagozytose und der Produktion von ROS und Zytokinen. Es resultiert eine Hemmung der Immunreaktion. Darüber hinaus ist der inhibitorische Rezeptor Fc $\gamma$ RIIB zusammen mit Dectin-1 für die Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases) zuständig. Dadurch kommt es zur Blockierung des Komplementfaktors C5a und dem Ausbleiben der C5a-abhängigen entzündlichen Reaktionen (61,62). Die Galaktose- und Sialinsäure-armen Antikörper binden aktivierende Fc $\gamma$ -Rezeptoren und wirken über diesen Reaktionsweg somit proinflammatorisch, während Galaktose- und Sialinsäure-reiche Antikörper über die Bindung von inhibitorischen Fc $\gamma$ -Rezeptoren eine antiinflammatorische Reaktion hervorrufen (s. Abb. 1.4.1.) (57). Die Prozesse, die bei einer Entzündung oder Infektion zu einer Reduktion der Glykosylierung führen sind teils ungeklärt. Diskutiert wird der Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF- $\alpha$  oder Interleukin-1 $\beta$  (63).

Neben der Galactose und der Sialinsäure hat auch Fucose Einfluss auf die Effektorfunktion. Antikörper, die arm an Fucose sind, zeigen eine höhere Affinität zu den aktivierenden Fc $\gamma$ RIIIA- und Fc $\gamma$ RIIIB-Rezeptoren, was zu einer erhöhten zytotoxischen Aktivität führt (64,65). Darüber hinaus sind ca. 30 % der Fab-Domänen des Serum IgGs glykosyliert. Das Glykosylierungsmuster und die Effektorfunktion unterscheidet sich von dem der Fc-Domäne. Studien zeigen, dass die Glykosylierung womöglich die Antigenbindung und die Lebensdauer der Antikörper beeinflusst; zudem haben die terminalen Sialinsäure-Moleküle eine antiinflammatorische Wirkung und verhindern damit die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen wie beispielsweise von Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) und Chemokine Ligand 2 (CCL2) (17,66–68).

Die Glykosylierung von Antikörpern hat klinische Relevanz und findet bereits Anwendung in der systemischen Therapie von hereditären und sekundären Immundefizienzen und Autoimmunerkrankungen mittels Gabe von intravenöser Immunglobulinen (IVIg). Mittels IVIg wird eine Wiederherstellung der IgG Sialylierung gewährleistet und eine antiinflammatorische Wirkung erzielt. Darüber hinaus dienen Impfungen in klinischen Modellen der Analyse des Effektes der Glykosylierung von Antikörpern und werden zudem

therapeutisch eingesetzt, wobei es zur Modifikation des Glykosylierungsmusters kommt (18).

### **1.5. Glykosyltransferasen: B4Galt1 und St6Gal1**

Für die Glykosylierung der Antikörper sind zwei Enzyme von besonderer Bedeutung: die  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase 1 (B4Galt1) und die  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase 1 (St6Gal1). Veränderungen in der Expression dieser Glykosyltransferasen haben Auswirkungen auf die Konformation und die Stabilität von Molekülen und Membranen und beeinflussen transmembranäre Signalwege sowie das Proliferations- und Differenzierungsverhalten der Zellen. Folglich kommt es zur Modifikation der Effektorfunktionen (69,70).

#### **1.5.1. B4Galt1**

Die Galaktosyltransferase  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase 1 (B4Galt1) wird durch das Gen *B4Galt1* codiert, welches auf dem Chromosom 9 lokalisiert ist (71). Das Enzym befindet sich im Golgi-Apparat und ist Mitglied einer siebenköpfigen Galaktosyltransferase-Familie (B4Galt1-7) (72,73). Funktionell dient B4Galt1 dem Transfer von Galaktose von UDP-Galaktose auf ein terminales N-Acetylglucosamin (GlcNAc). Galaktose wird hierbei N-glykosidisch mittels  $\beta$ 1,4-Verknüpfung an ein GlcNAc gebunden (72). Als Typ 2 Transmembranprotein besteht das Enzym strukturell aus einer N-terminalen cytoplasmatischen Domäne, einer  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomäne und einer C-terminalen katalytischen Domäne (74).

Die Expression von B4Galt1 hat bedeutenden Einfluss auf die Entstehung von Krankheiten, durch Beeinflussung der Zelldifferenzierung sowie Proliferation, Apoptose und Zelladhäsion (53,75). Ein verändertes Expressionsmuster von B4Galt1 korreliert mit der Proliferation, Metastasierung, Invasivität und dem Resistenzverhalten gegenüber einer medikamentösen Therapie von Krebszellen (76). Beispielsweise hat die Expression von B4Galt1 Einfluss auf den Hedgehog-Signalweg, wodurch es bei Leukämie zu einer Resistenzentwicklung gegenüber Chemotherapeutika kommt (53,77). Darüber hinaus beeinflusst die Expression von B4Galt1 den EGF-Signalweg und greift somit in die Apoptose, die DNA-Synthese und die Zellteilung ein (78). Aufgrund des weitreichenden Einflusses von

B4Galt1, gilt die Expression von B4Galt1 als prognostischer Faktor bei Krebserkrankungen wie beispielsweise Urothelkarzinomen (75).

Die regulatorischen Mechanismen der Expression von B4Galt1 sind noch weitreichend ungeklärt. Erste Studien zeigen jedoch, dass Arachidonsäure (79) und Östrogen (48) die Expression von B4Galt1 induzieren. Zudem haben der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), das Proto-Onkogen Ras, die c-Jun N-terminale Kinase 1 (JNK1), die Mitogen-aktivierte Kinase ERK1, der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und der Transkriptionsfaktor E1AF Einfluss auf die Expression von B4Galt1 (45,50).

### **1.5.2. St6Gal1**

Die Sialylierung von Antikörpern erfolgt mittels der  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase 1 (St6Gal1). Das codierende Gen befindet sich auf Chromosom 3 und sorgt für die Expression von St6Gal1 im Golgi-Apparat (71,80). Das Enzym katalysiert die N-glykosidische  $\alpha$ 2,6-Verknüpfung von Sialinsäure Monosacchariden an die terminale Position von Galaktose-haltigen Substraten (80). Daher ist die oben beschriebene Galaktosylierung durch B4Galt1 die Voraussetzung für die Sialylierung durch St6Gal1.

Die Expression von St6Gal1 dient vor allem als Schutz vor Zytotoxizität, indem durch die Sialylierung die für Apoptose zuständigen Rezeptoren wie der Fas-Ligand und der Rezeptor TNFR1 blockiert werden (81–83). Als Folge dessen wird die Aktivität von Caspase 3 und 8 reduziert und die Apoptose inhibiert (81). Der Akt- und NF $\kappa$ B-Signalweg sowie die Expression von Cyclin D2 wird hingegen gesteigert und das Überleben der Zelle gefördert (81,84). Zudem wird mittels Sialylierung das proapoptotische Lectin Galectin gebunden (85) sowie CD45 (86), der Wachstumsfaktor EGFR (87), das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül PECAM (88) und  $\beta$ 1-Integrin beeinflusst (89,90). Folglich entsteht ein antiapoptotisches Potenzial und eine Chemoresistenz. Darüber hinaus korreliert die Expression von St6Gal1 mit der Expression von Krebsstammzellmarkern wie ALDH1 und CD133 (91). Eine starke Expression von St6Gal1 kann daher im Zusammenhang mit Erkrankungen als prognostischer Faktor verwendet werden (80).

Eine regulatorische Funktion der Expression von St6Gal1 übernimmt das Proto-Onkogen Ras (92) und der Transkriptionsfaktor Sox-2 (93), durch deren Einfluss die Expression

induziert wird. Darüber hinaus wird die Expression von St6Gal1 mittels Östrogen (94) und durch den Einfluss von Interleukin-1 $\beta$  (95) gesteigert. Demgegenüber steht die Freisetzung von IL 23 durch myeloische Zellen, woraufhin Helfer-T-Zellen 17 (T<sub>H</sub>17) IL 21 und IL 22 sezernieren und die Expression von St6Gal1 in B-Zellen runter regulieren (96).

### **1.6. Screening der *Target Selective Inhibitory Library* auf Effekte der Glykosylierung von B-Zellen**

Die Target Selective Inhibitory Library von Selleck Chemicals ist eine Substanzbibliothek, welche über Inhibitoren verschiedenster Signalwege verfügt. Die Bibliothek umfasst eine große Auswahl an Substanz, die spezifisch für eine Zielstruktur sind, wodurch die Selektivität erhöht wird und sich die Nebeneffekte reduzieren. Die Bibliothek gewährleistet für alle Substanzen eine große Strukturdiversität und beinhaltet ausschließlich biologisch aktive und zellpermeable Substanzen. Zudem stellt Selleck Chemicals eine hohe Reinheit der einzelnen Substanzen sicher. Mit der Bibliothek wird ein großes Spektrum an unterschiedlichsten Signalkaskaden abgedeckt, wodurch sich die Bibliothek für ein Screening für die Identifikation von neuen Zielstrukturen eignet. Das Screening mit solch einer Substanzbibliothek bietet eine günstige Alternative zur Medikamentenentwicklung. Vorteilhaft ist zudem, dass die Substanzen bereits für humane Testungen zugelassen sind und daher ein mögliches Risikopotenzial der Substanzen bekannt ist. Mehrere Studien haben daher bereits Screenings mit der Target Selective Inhibitory Library durchgeführt. Hierzu zählen beispielsweise ein Substanzscreening bei Brustkrebs, ein neuronales Modell zur Pathologie von Tau-Proteinen und ein Screening für Targets zur Behandlung der primären Myelofibrose (97–99).

In einem Vorgängerprojekt wurde ein Screening der Substanzbibliothek in Bezug auf die Expression der Glykosyltransferasen B4Galt1 und St6Gal1 unter Einfluss der getesteten Substanzen durchgeführt. Basierend auf den noch unveröffentlichten Daten von Sirka Marie Sinnecker wurden hierbei im Rahmen ihrer Doktorarbeit am Lübecker Institut für experimentelle Dermatologie (LIED) im Jahr 2018 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ludwig 131 Substanzen auf Ihren Effekt auf die B-Zell-Proliferation gescreent. Für das Screening erfolgte eine Isolation humaner B-Lymphozyten und deren Stimulation mit Interleukin-21

(100 ng/ml dest. Wasser) und Anti-CD40 (1 µg/ml dest. Wasser) für drei Tage. Die Substanzen wurden in einer Konzentration von 1 µM getestet. Von den 131 Substanzen wurden 27 Substanzen positiv validiert. Hierbei wurden nur diejenigen Substanzen positiv validiert, welche basierend auf den normalisierten Daten Ergebnisse von  $\geq 110\%$  und  $\leq 60\%$  aufwiesen. Insgesamt wurden 17 stimulierende Substanzen ( $\geq 110\%$ ) und 10 hemmende Substanzen ( $\leq 60\%$ ) validiert. Unter den stimulierenden Substanzen zeigten drei Substanzen einen Effekt auf die Expression von B4Galt1, 13 Substanzen einen Effekt auf die Expression von St6Gal1 und eine Substanz steigerte die Expression beider Glykosyltransferasen. Bei den hemmenden Substanzen wurde hingegen bei acht Substanzen ein Effekt auf die Expression von B4Galt1 und bei zwei Substanzen ein Effekt auf die Expression beider Glykosyltransferasen beobachtet.

### **1.7. Ziel der Arbeit**

Die Glykosylierung von Antikörpern hat einen maßgeblichen Einfluss auf die Immunantwort. Durch die Reduktion der Glykosylierung kommt es zur Veränderung der Effektorfunktion der Antikörper, wodurch in die Immunantwort eingegriffen und die Pathogenese unterstützt wird (56). Eine Reduktion der Glykosylierung findet sich in vielen Autoimmunerkrankungen, Infektionen und Krebserkrankungen und trägt entscheidend zu der Entstehung und der Manifestation der Erkrankungen bei (18). Darüber hinaus gilt die Glykosylierung von Antikörpern schon heute als prognostischer Faktor in Bezug auf Krankheiten und findet klinische Anwendung bei Impfungen und der Therapie mit IVIG (18,75,80). Es ist daher von Bedeutung, dass therapeutische Angriffspunkte und Substanzen für die Modifikation der Glykosylierung identifiziert werden. Somit könnten neue Therapieoptionen für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen, Infektionen und Krebserkrankungen entwickelt werden. Ziel dieser Arbeit ist daher die Validierung von potenziellen Substanzen, welche das Glykosylierungsmuster gezielt modifizieren. Hierbei wird die Expression der zwei wichtigsten Glykosyltransferasen - B4Galt1 und St6Gal1 - unter Einfluss von 27 Substanzen der Target Selective Inhibitory Library von Selleck Chemicals untersucht. Die Validierung der Substanzen schließt eine Dosisabhängigkeitsprüfung für vier verschiedene Konzentrationen und eine Zytotoxizitätstestung ein.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Verwendete Laborgeräte und Materialien

Tab. 2.1.1.: Reagenzien

Name	Hersteller
B Cell Isolation Kit II, human: B Cell Biotin-AntibodyCocktail, human Anti-Biotin MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Cherry Pick Library (96-well)-L2000- Z246727-100 µl	Selleck Chemicals, München, Deutschland
RPMI-1640, w L-Glutamine, w 2.0 g/L NaHCO <sub>3</sub>	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
RPMI 1640, w stable Glutamine, w/o Glucose, w/o Phenol red, w 2.0 g/L NaHCO <sub>3</sub>	Genaxxon bioscience GmbH, Ulm, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Thermo-Fisher scientific, Waltham, USA
EDTA Dinatriumsalz 0,1M	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Albumin Fraktion V, biotinfrei (BSA, w/o Biotin)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Recombinant Human Interleukin-21	Cell Sciences, Newburyport, USA
Anti-hCD40/TNFRSF5 Antikörper	R&D systems, Minneapolis, USA
Ficoll-Paque PLUS	GE Healthcare, Chicago, USA
Ethanol 70% vergällt	Roth, Karlsruhe, Deutschland
FcR Blocking Reagent, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
APC Mouse Anti-Human CD19	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
FITC Mouse Anti-Human CD3	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Cytofix/Cytoperm	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Perm/Wash	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
PerCP/Cy5.5 anti-human CD19	BioLegend, San Diego, USA
PE anti-human CD27	BioLegend, San Diego, USA

Pacific Blue anti-human CD38	BioLegend, San Diego, USA
Brilliant Violet 510 anti-human IgD	BioLegend, San Diego, USA
anti hSt6Gal1 Affinity Purified Goat IgG	R&D systems, Minneapolis, Kanada
anti hB4Gal1 Affinity Purified Goat IgG	R&D systems, Minneapolis, Kanada
Alexa Fluor™ 488 Antibody Labeling Kit	Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
Alexa Fluor™ 647 Antibody Labeling Kit	Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Natriumazid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ampuwa Spüllösung Plastipur 1000ml	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fetal Bovine Serum Premium	Biowest, Nuaille, Frankreich
Triton X 100	Merck, Darmstadt, Deutschland
Cytotoxicity Detection Kit	Roche, Basel, Schweiz
Minimum-Essential-Medium Non-essential amino-acids (MEM- NEAA)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
MACSQuant Calibration Beads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACSQuant Running Buffer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACSQuant Washing Solution	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACSQuant Storage Solution	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Natriumhypochloritlösung	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Red Blood Cell Lysis Solution	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA



TWEEN®20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
1-Step Turbo TMB-ELISA	Thermo-Fisher scientific, Waltham, USA
Natriumazid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid, >99,8 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat, ≥99,5 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcarbonat, >99,5 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Schwefelsäure 25%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Human IgM ELISA Quantitation Set	Bethyl, Montgomery, USA
Human IgG ELISA Quantitation Set	Bethyl, Montgomery, USA

**Tab. 2.1.2.: Laborgeräte, Verbrauchsmaterialien, Software**

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
S-Monovette EDTA 9 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Schraubröhre 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Safe-Seal-Gefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Falcon® Round-Bottom Polystyrene Tubes, 5 mL	Stemcell Technologies, Köln, Deutschland
Serologische Pipetten 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen, epT.I.P.S. Standard/Bulk 2-200 µl, 20-300 µl	eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Assistent, Sondheim/Rhön, Deutschland
MACS Separation Column LS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Pre-Separation Filter (30 µm)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

Pipetus-Pipettierhilfe	Hirschmann-Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Pasteur-Glaspipette	Assistent, Sondheim/Rhön, Deutschland
Microplate, 96 Well, V-Bottom	greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Microplate, 96 Well, F-Bottom, non-binding	greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
AcroPrep Advance 96 Filter Plate	Pall, New York, USA
TC-Platte 96 Well, Suspension-F	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Nunc™ MicroWell™ 96-Well Mikrotiterplatten	Thermo-Fisher scientific, Waltham, USA
Multiply - µStrip 0,2 ml Kette	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
8er Deckelkette, flach	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Safety-Multifly-Kanüle	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
octenisept	Schülke, Norderstedt, Deutschland
Klebefolie, optisch klar	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Filtropur V50 Filter	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipetten Research plus 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Multipipetten PLUS	eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
QuadroMACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Messzylinder 500 ml	Vitlab, Großostheim, Deutschland
Biological Safety Cabinets Class II TYPE A/B3	NuAire, Plymouth, USA
Sicherheitswerkbank Safe 2020	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
MACSQuant Analyzer 10 Flow Cytometer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mikro20-Zentrifuge	Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland

Megafuge 1.0R	Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Centrifuge 5810	eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5415 R	eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Heracell250i CO <sub>2</sub> -Inkubator	Thermo-Fisher scientific, Waltham, USA
Leica DMI1	Leica, Wetzlar, Deutschland
Waage Precision Standart	OHAUS, Greifensee, Schweiz
Wasserbad Typ 1004	GFL, Burgwedel, Deutschland
heat-stir-plate CB162	Stuart, Staffordshire, UK
Vortexer	Heathrow Scientific, Vernon Hills, USA
Testplattenmischer TPM4	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
pH-Meter pH526	WTW, Weilheim, Deutschland
GloMax Discover Multimode Microplate Reader	Promega, Madison, USA
Office 365	Microsoft, Redmond, USA
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, La Jolla, USA
SigmaPlot 13.0	Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland

### 2.1.3.: Medien und Puffer

Zellkulturmedium für B-Zell-Isolation für Dosisabhängigkeitsprüfung	500 ml RPMI-1640 w L-Glutamine, w Glucose, w Phenolrot 5 ml NEAA 5 ml Penicillin/Streptomycin 50 ml FCS
Zellkulturmedium für B-Zell-Isolation für LDH-Assay	500 ml RPMI-1640 w L-Glutamine, w/o Glucose, w/o Phenolrot 5 ml NEAA 5 ml Penicillin/Streptomycin 5 ml FCS 2 g/L Glucose

Waschpuffer	500 ml DPBS 10 ml 0,1 M EDTA
MACS-Puffer	500 ml DPBS 10 ml 0,1 M EDTA 2,5 g BSA w/o Biotin
FACS-Puffer	500 ml DPBS 5 g BSA
Tris-Puffer	10 ml dest. Wasser 1,21 g TRIS (M=121,14 g/mol)
Dilution-Puffer	100 ml DPBS 0,5 g BSA 500 µl NaN <sub>3</sub>
Mastermix für Verdünnung der Substanzen	3 ml dest. Wasser 158 µl DMSO
Mastermix für Kontrollen	2,85 ml dest. Wasser 150 µl DMSO
Triton-X-100-Lösung (2 %)	250 µl Zellkulturmedium für B-Zell-Isolation für LDH-Assay 5 µl Triton-X-100
Reaction mixture	11,25 ml Dye solution 250 µl Catalyst
Phosphatgepufferte Salzlösung 1x (PBS), pH 7,2	5000 ml dH <sub>2</sub> O 45 g Natriumchlorid (NaCl) 8,7 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O 0,9 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O
ELISA Coating-Puffer, pH 9,6	5,3 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 5,04 g NaHCO <sub>3</sub> 1000 ml dH <sub>2</sub> O
ELISA Blocking-Puffer	200 ml PBS (1x) 0,1 ml TWEEN <sup>®</sup> 20 2 g BSA, biotinfrei
ELISA Wasch-Puffer	2 L PBS (1x)

	1 ml TWEEN®20
ELISA Stopp-Puffer	98 ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 500 ml destilliertes Wasser

## 2.2. Isolation und Stimulation humaner B-Lymphozyten

Für die Experimente wurden humane B-Lymphozyten aus dem Blut gesunder Spender isoliert. Bei keinem der eingeschlossenen Spender bestanden eine vorbekannte Autoimmunerkrankung oder starke Allergien. Im Voraus erfolgte mündlich eine Aufklärung über den Studienzweck und die Risiken der Blutentnahme, ferner wurde einer Einverständniserklärung in schriftlicher Form zugestimmt. Bei Versuchsbeginn lag ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der Universität zu Lübeck vor (Aktenzeichen: 09-140, 13.11.2009) (s. Anhang, Ethikvotum). Pro Spender wurden maximal 72 ml Blut in je 9 ml EDTA Monovetten abgenommen. Das Blut wurde im Anschluss an die Entnahme sofort weiterverarbeitet.

Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten alle an einer sterilen Werkbank, entweder der Biological Safety Cabinets Class II TYPE A/B3 oder an der Sicherheitswerkbank Safe 2020. Im ersten Schritt wurden acht 50 ml Schraubröhren mit je 15 ml Ficoll-Paque PLUS und weitere acht 50 ml Schraubröhren mit je 25 ml Waschpuffer befüllt. In die Schraubröhren mit Waschpuffer wurde jeweils das Spenderblut aus einer 9 ml EDTA Monovette hinzugegeben und durch Pipettieren vermischt. Im Folgenden wurde für die Ficoll-Separation das Gemisch aus Waschpuffer und Blut aus je einer Schraubröhre langsam mittels einer Pipetus-Pipettierhilfe auf die Ficoll-Paque PLUS Lösung einer Schraubröhre geschichtet, ohne dabei zu vermischen. Im Anschluss wurden die Proben mittels der Megafuge 1.0R für 30 min ohne Bremse, bei 1800 rpm (entspricht 400 g) und 20°C zentrifugiert. Die Zentrifugen wurden für alle hier genannten Zentrifugationsschritte verwendet. Durch die Dichtegradientenzentrifugation wurde eine Ficoll-Paque-Separation erzielt, wobei sich die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (MNCs) in der Interphase zwischen Ficoll und Plasma anordnen. Die Plasmaschicht wurde zum größten Teil mittels Pasteur-Glaspipetten abpipettiert und der MNC-Ring von zwei Proberöhrchen

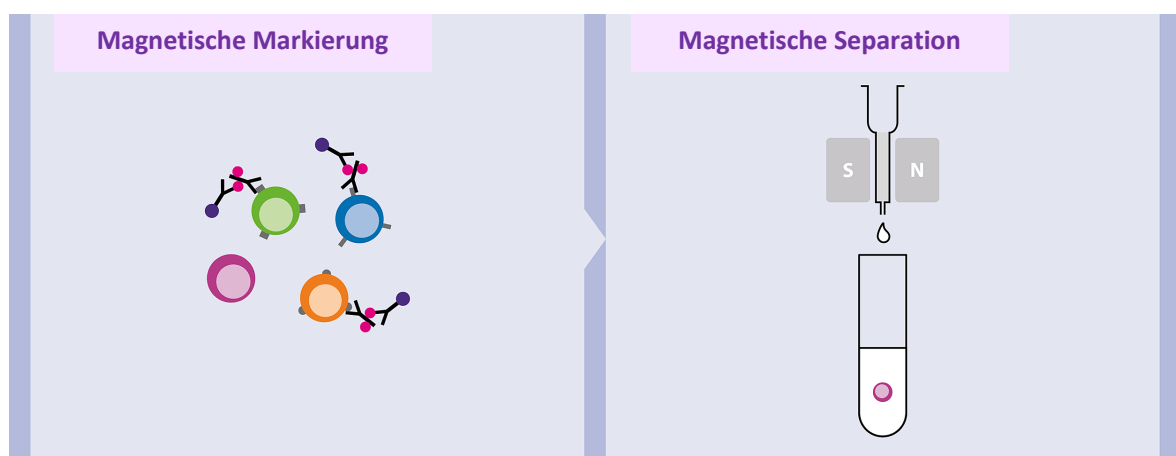
in ein neues 50 ml Schraubröhrchen überführt. Somit reduzierte sich die Anzahl der Proberöhrchen von acht auf vier.

Die Proberöhrchen mit den MNCs wurden jeweils bis zu einem Volumen von 50 ml mit Waschpuffer befüllt. Es folgte die Zentrifugation für 12 min mit Bremse, bei 1400 rpm (entspricht 300 g) und 20°C. Die folgenden Schritte wurden zweimal hintereinander durchgeführt: Die Überstände wurden abpipettiert, die Zellpellets resuspendiert, die Proberöhrchen erneut bis 50 ml mit Waschpuffer befüllt und anschließend für 12 min mit Bremse, bei 1000 rpm (entspricht 200 g) und 20°C zentrifugiert. Im Weiteren wurden die Überstände abpipettiert und die resuspendierten Pellets aller Proben in ein 15 ml Schraubröhrchen überführt. Die Proberöhrchen wurden dreimal mit je 1 ml MACS-Puffer durch Pipettieren gewaschen. Der MACS-Puffer wurde nach dem Waschvorgang aller Proberöhrchen in das 15 ml Schraubröhrchen mit den resuspendierten Pellets hinzugegeben und durch Pipettieren wurde die Zellsuspension gemischt. Zur Bestimmung der Zellzahl folgte eine 1:10-Verdünnung in einem separaten 1,5 ml Safe-Seal-Gefäß: 80 µl MACS-Puffer wurden mit 10 µl Zellsuspension und 10 µl Trypanblau-Lösung gemischt. 10 µl der 1:10 Verdünnungslösung wurde mittels Pipette in die Neubauer-Zählkammer gebracht. Unter Verwendung der Leica DMI1, bei 100-facher Vergrößerung, wurden zwei diagonal gegenüberliegende Großquadrate, unter Berücksichtigung zwei der vier Ränder der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Das arithmetische Mittel wurde gebildet und mit dem Kammerfaktor  $10^4$  und dem Verdünnungsfaktor 10 sowie dem Gesamtvolumen multipliziert. Das Produkt entspricht der Zellzahl MNCs pro Milliliter Zellsuspension.

Die Zellsuspension wurde für 7 min mit Bremse, bei 1400 rpm (entspricht 300 g) und 20°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Zellpellet in 40 µl MACS-Puffer pro  $10^7$  Zellen resuspendiert. Im Folgenden wurde das Licht an der Werkbank ausgeschaltet, da die verwendeten Substanzen lichtreagibel sind. Pro  $10^7$  Zellen wurden 10 µl B Cell Biotin-AntibodyCocktail (enthält biotinylierte monoklonale Antikörper gegen CD2, CD14, CD16, CD36, CD43 und CD235a) vom B Cell Isolation Kit II hinzugefügt. Nach einer 5-minütigen, lichtgeschützten Inkubation bei 4°C wurden pro  $10^7$  Zellen je 30 µl MACS-Puffer und 20 µl Anti-Biotin MicroBeads (enthält an MicroBeads gebundene monoklonale murine IgG1 Antikörper gegen Biotin) aus dem B Cell Isolation Kit II hinzugegeben. Sollte das

Gesamtvolumen 500 µl unterschreiten, wurde MACS-Puffer bis zu einem Gesamtvolumen von 500 µl hinzugefügt. Es folgte eine lichtgeschützte Inkubation von 10 min bei 4°C.

Für die immunmagnetische Separation wurde der Pre-Separation Filter (30 µm), die MACS Separation Column LS und der QuadroMACS Separator verwendet und mit 3 ml MACS-Puffer befeuchtet. Die Zellsuspension ist dann durchmischt durch das Filtersystem gelaufen und im Anschluss wurde die Säule dreimal mit 3 ml MACS-Puffer gespült (s. Abb. 2.2.1).



**Abb. 2.2.1.: Das Verfahren der immunmagnetischen Zellseparation dient der B-Zell-Isolation.**

Im ersten Schritt erfolgt eine indirekte magnetische Markierung der Nichtzielzellen. Im Folgenden wurden die Nichtzielzellen bei der magnetischen Separation in der Trennsäule zurückgehalten und die Zielzellen aufgefangen. Abbildung von [www.miltenyibiotec.com](http://www.miltenyibiotec.com).

Die aufgefangene Zellsuspension wurde für 7 min mit Bremse, bei 1400 rpm (entspricht 300 g) und 20°C zentrifugiert und der Überstand mittels Pasteur-Glaspipette abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 1 ml Zellkulturmedium für B-Zell-Isolation für Dosisabhängigkeitsprüfung resuspendiert. Aus dieser Zellsuspension wird wie oben beschrieben eine 1:10 Verdünnungslösung hergestellt und die B-Zell-Zahl pro Milliliter bestimmt. Die Zellsuspension wird auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter mit dem Zellkulturmedium für B-Zell-Isolation für Dosisabhängigkeitsprüfung verdünnt.

Von der verdünnten Zellsuspension wurden zunächst je 100 µl in drei Wells einer TC-Platte 96 Well, Suspension-F als unstimulierte Negativkontrolle gefüllt. Zudem wurden 50 µl Zellsuspension für die sich anschließende Reinheitskontrolle entnommen. Die restliche

Zellsuspension wurde mit Recombinant Human Interleukin-21 (100ng/ml dest. Wasser) und Anti-hCD40/TNFRSF5 Antikörper (1 µg/ml dest. Wasser) stimuliert. Die stimulierte Zellsuspension wurde dann für die Positivkontrolle (je drei Wells) und die Dosisabhängigkeitsprüfung (je vier Wells pro Substanz) auf die TC-Platte 96 Well, Suspension-F mit je 100 µl pro Well aufgetragen. Folglich enthielt jedes Well 100.000 Zellen, welche entweder stimuliert oder unstimuliert waren.

### **2.3. Reinheitskontrolle der isolierten B-Lymphozyten**

An die Isolation humaner B-Lymphozyten aus dem Blut schloss sich die Reinheitskontrolle mittels Durchflusszytometrie an. Hierfür wurde 50 µl unstimulierte Zellsuspension zusammen mit 100 µl FACS-Puffer in ein 1,5 ml Safe-Seal-Gefäß gefüllt und für 6 min bei 2500 rpm (entspricht 601 g) in der Mikro20-Zentrifuge zentrifugiert. Die Zentrifugationsschritte der Reinheitskontrolle erfolgten alle mit der hier genannten Zentrifuge. Der Überstand wurde dann vorsichtig abgegossen und 50 µl FACS-Puffer und 1 µl FcR Blocking Reagent hinzugefügt und gemischt. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden zur Probe 1 µl APC Mouse Anti-Human CD19 und 1 µl FITC Mouse Anti-Human CD3 gegeben. Durch Schütteln wurde die Probe gemischt und anschließend für 30 min lichtgeschützt bei 4°C inkubiert. Es folgte erneut die Zentrifugation für 6 min bei 2500 rpm (entspricht 601 g) und das anschließende vorsichtige Abkippen des Überstandes. Nach der Zugabe von 300 µl FACS-Puffer wurde das gesamte Probenvolumen in ein 5 ml Falcon® Round-Bottom Polystyrene Tube überführt. Die Probe wurde mittels MACSQuant Analyzer 10 Flow Cytometer analysiert. Zellsuspensionen mit einem Reinheitsgrad von  $\geq 85$  % wurden für die weiteren Versuche verwendet.

### **2.4. Testung der Substanzen**

Für die Dosisabhängigkeitsprüfung wurden 27 Substanzen aus der Cherry Pick Library (96-well)-L2000-Z246727-100 µl von Selleck Chemicals verwendet. Die in DMSO gelösten Originalsubstanzen (10 µM) wurden zunächst auf die Konzentrationen 10 µM, 1 µM, 0,1 µM und 0,01 µM mit destilliertem Wasser (10 µM) oder einem Mastermix (1 µM, 0,1 µM, 0,01 µM) verdünnt. So enthielten die Proben je ein Teil DMSO und neun Teile destilliertes



Wasser, wodurch eine konstante DMSO Konzentration aller Proben gewährleistet wurde. Je 2 µl dieser vier Verdünnungen wurden auf die TC-Platte 96 Well, Suspension-F zu den 100 µl pro Well stimulierten Zellsuspensionen hinzugegeben. Als Volumenausgleich wurden zu der Negativkontrolle (je Well 100 µl unstimulierte Zellsuspension) und der Positivkontrolle (je Well 100 µl stimulierte Zellsuspension) 2 µl vom Mastermix für Kontrollen hinzugefügt. Es wurden dreifach Bestimmungen für die Kontrollen durchgeführt (s. Abb. 2.4.1). Die Platte wurde dann mittels Klebefolie verschlossen und für drei Tage im Heracell250i CO<sub>2</sub>-Inkubator (37°C/5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert.

	1	2	3	4
A	N1	S9 10 µmol	S21 10 µmol	S32 10 µmol
B	N2	S9 1 µmol	S21 1 µmol	S32 1 µmol
C	N3	S9 0.1 µmol	S21 0.1 µmol	S32 0.1 µmol
D	P1	S9 0.01 µmol	S21 0.01 µmol	S32 0.01 µmol
E	P2	S17 10 µmol	S30 10 µmol	S38 10 µmol
F	P3	S17 1 µmol	S30 1 µmol	S38 1 µmol
G		S17 0.1 µmol	S30 0.1 µmol	S38 0.1 µmol
H		S17 0.01 µmol	S30 0.01 µmol	S38 0.01 µmol

Substanzen	Positivkontrolle (DMSO)	Negativkontrolle (ohne aCD40/IL-21)
------------	-------------------------	-------------------------------------

100.000 Zellen + 2ul Substanz oder DMSO in dest. Wasser pro Well

**Abb. 2.4.1.: Beispielhafte Darstellung eines Belegungsplans für die Substanztestung**

Beispielhafter Belegungsplan für die Testung der Substanzen. N = Negativkontrolle, P = Positivkontrolle, S = Substanz.

## 2.5. Durchflusszytometrie

Die Expression der beiden Glykosyltransferasen B4Galt1 und St6Gal1 unter Einfluss von verschiedenen Substanzen wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren zur Analyse von Zellen und wird für die quantitative Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen, sowie Peptiden und DNA verwendet. Das Prinzip beruht auf der Emission optischer Signale der Zellen unter Verwendung eines Laserstrahls und ermöglicht eine Analyse der Zellen hinsichtlich Form, Struktur und Färbung (100).

Vorbereitend dafür wurden nach dreitägiger Inkubation folgende Versuchsschritte ausgeführt: Die Zellen wurden auf eine Microplate, 96 Well, V-Bottom überführt und die

Ursprungsplatte mit 100 µl FACS-Puffer pro Well gewaschen. Der FACS-Puffer wurde nach dem Waschvorgang ebenfalls auf eine neue Platte überführt. Es folgte eine Zentrifugation in der Centrifuge 5810 für 8 min mit Bremse bei 1400 rpm (entspricht 377 g) und Raumtemperatur. Die Zentrifuge und die Einstellungen wurden, wenn nicht anders beschrieben, für alle hier genannten Zentrifugationsschritte verwendet. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen, die Platte gevortext und 1 µl/Well FcR Blocking Reagent, human in FACS-Puffer bei einem Gesamtvolumen von 50 µl/Well hinzugegeben. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde ein Oberflächen-Antikörper-Mix bestehend aus je 1 µl/Well PerCP/Cy5.5 anti-human CD19, PE anti-human CD27, Pacific Blue anti-human CD38 und Brilliant Violet 510 anti-human IgD in FACS-Puffer bei einem Gesamtvolumen von 10 µl/Well hinzugefügt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei 4°C im Dunkeln, woran sich eine Zentrifugation anschloss.

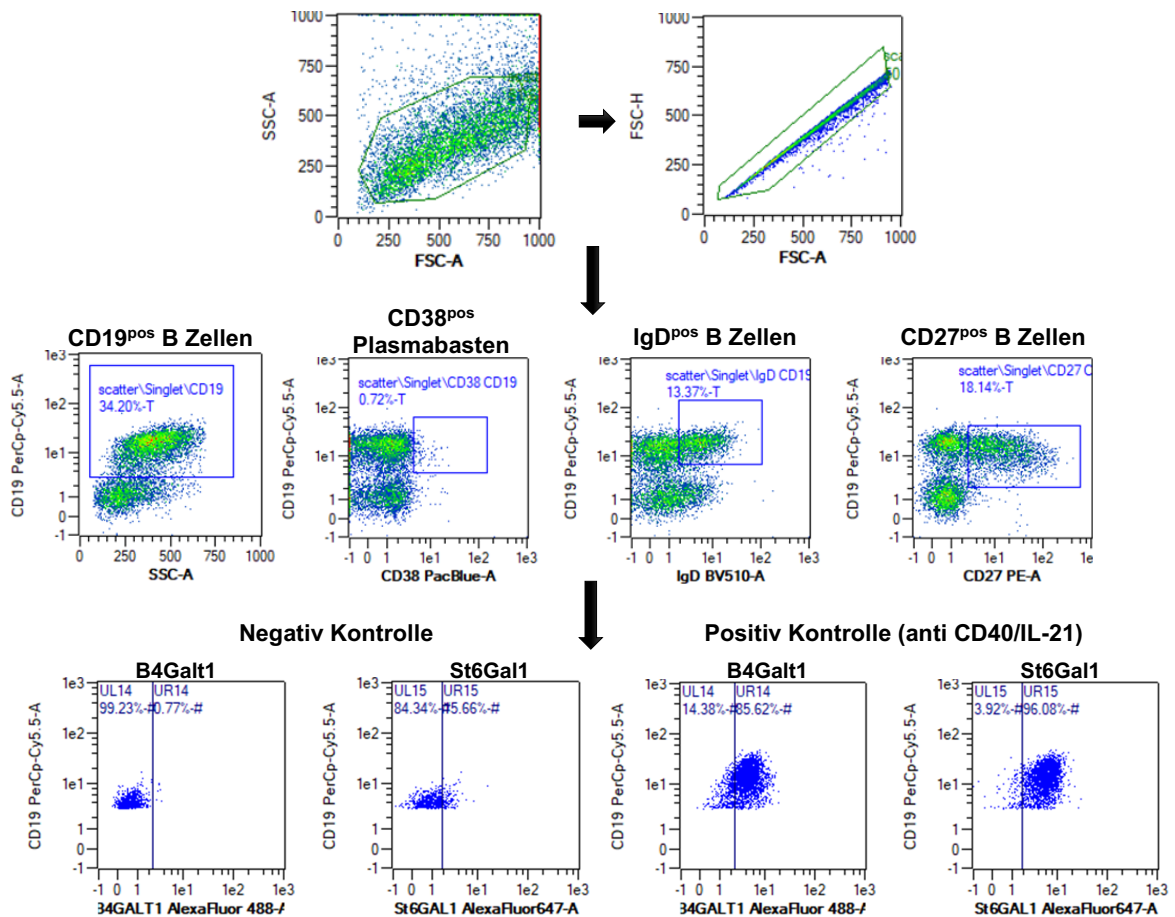
Anschließend wurde der Überstand abpipettiert, die Platte gevortext und je 100 µl/ Well Cytofix/Cytoperm für die Fixierung der Zellen auf die Platte gegeben. Dann wurde für 20 min bei 4°C inkubiert und zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und auf einem Vortex gemischt. Im Folgenden wurde eine 1:10 Verdünnung vom 10-fach verdünnten Perm/Wash in destilliertem Wasser für die Permeabilisierung der Zellmembran hergestellt und 200 µl/Well auf die Platte aufgetragen. Es schloss sich eine Zentrifugation an, und erneut wurde der Überstand abgenommen und gevortext.

Im Folgenden wurde eine Antikörpermarkierung von anti hB4Galt1 Affinity Purified Goat IgG und anti hSt6Gal1 Affinity Purified Goat IgG mittels des Alexa Fluor™ 467 Antibody Labeling Kit und des Alexa Fluor™ 488 Antibody Labeling Kit durchgeführt. Zunächst wurde eine 0,1 M Natriumazid-Lösung mit destilliertem Wasser hergestellt. Je 100 µg anti hB4Galt1 Affinity Purified Goat IgG und 100 µg anti hSt6Gal1 Affinity Purified Goat IgG wurden mit 100 µl der 0,1 M Natriumazid-Lösung vermischt um eine 1mg/ml Lösung herzustellen. Dann wurde die Lösung mit anti hB4Galt1 mit Alexa Fluor™ 467 und anti hSt6Gal1 mit Alexa Fluor™ 488 gemischt und für eine Stunde im Dunkeln bei 4°C auf einem Schüttler gelagert. Um noch reaktive Gruppen zu stoppen wurden im Folgenden je 50 µl Tris-Puffer hinzugegeben und vermischt und weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. In einem letzten Schritt wurden je 350 µl Dilution-Puffer hinzugegeben.

Die Antikörpermarkierung dient der späteren Analyse mittels der Durchflusszytometrie, wobei Alexa Fluor™ 488 und Alexa Fluor™ 467 Färbungen für unterschiedliche Wellenlängen sind. Alexa Fluor™ 488 markiert hierbei anti hSt6Gal1 für das Anregungsspektrum von Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC) bei 488 nm und Alexa Fluor™ 467 markiert anti hB4Galt1 für das Anregungsspektrum von Allophycocyanin (APC) bei 635 nm.

Die hergestellten markierten Antikörper wurden im Weiteren für die intrazelluläre Markierung verwendet. Hierfür wurden je 1 µl/Well APC-anti hB4Galt1 und FITC-anti hSt6Gal1 in Perm/Wash mit einem Gesamtvolumen von 100 µl/Well vermischt und eine 30-minütige Inkubation bei 4°C durchgeführt. Anschließend wurde zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Platte auf dem Vortex gemischt. Von der 1:10 Verdünnung vom 10-fach verdünnten Perm/Wash in dest. Wasser wurden dann 200 µl/Well hinzugefügt, zentrifugiert, der Überstand ein weiteres Mal abgenommen und die Platte gevortext. Das Zellpellet wurde in 100 µl/Well FACS-Puffer resuspendiert und die Zellsuspension auf eine neue Microplate, 96 Well, V-Bottom mit der Einsatzplatte AcroPrep Advance 96 Filter Plate übertragen. Danach wurde für 30-40 min mit Bremse bei 1400 rpm (entspricht 377 g) und Raumtemperatur zentrifugiert bis die komplette Zellsuspension durch das Filtersystem gelaufen war. Anschließend wurde das Zellpellet durch Pipettieren in Lösung gebracht.

Nach Kalibrierung des MACSQuant Analyzer 10 Flow Cytometer mit MACSQuant Calibration Beads wurde die Probenplatte gemessen. Es wurde hierfür folgende Gating Strategie festgelegt: Über das Seitwärtsstreulicht (SSC) und das Vorwärtsstreulicht (FSC) wurde nach Größe und Granularität die Population der Lymphozyten ausgewählt. Basierend auf der durchgeführten Reinheitskontrolle wurde die Annahme erstellt, dass es sich zum größtmöglichen Teil um B-Lymphozyten handelt. Aus der Population der B-Lymphozyten wurden zunächst Zellaggregate durch die Auftragung von Fläche (FSC-A) gegen Höhe (FSC-H) herausgefiltert. Im Folgenden wurden die singular liegenden Zellen nach Vorhandensein der Oberflächenmarker (CD19, CD27, CD38, IgD) und diese wiederum nach Vorhandensein der intrazellulären Marker (B4Galt1, St6Gal1) sortiert (s. Abb. 2.5.1.).



**Abb. 2.5.1.: Gating-Strategie der Durchflusszytometrie**

Bei der Analyse der Durchflusszytometrie wurden zunächst aus allen B-Lymphozyten die Zelldupletten durch die Auftragung der Fläche (FSC-A) gegen die Höhe (FSC-H) detektiert und aussortiert. Im Folgeschritt wurden die singulären B-Lymphozyten nach Oberflächenmarker (CD19, CD27, CD38, IgD) und anschließend nach intrazellulären Markern (B4Galt1, St6Gal1) ausgewählt.

## 2.6. LDH-Zytotoxizitätsassay

Für die Zytotoxizitäts-Testung der 27 Substanzen wurde das Cytotoxicity Detection Kit verwendet. Das Testsystem basiert auf dem Prinzip des Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivitätsnachweises. LDH katalysiert die Oxidation von Lactat zu Pyruvat, wobei gleichzeitig  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH} + \text{H}^+$  reduziert wird. Durch die Zugabe von Tetrazoliumsalz 2-[4-Iodphenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid (INT) und dem Enzym Diaphorase kommt es zur Reduktion vom gelben INT zum rötlichen Formazan bei gleichzeitiger Oxidation von  $\text{NADH} + \text{H}^+$  zu  $\text{NAD}^+$ . Formazan ist photometrisch bei einem Absorptionsmaximum von 500 nm nachweisbar und verhält sich proportional zur LDH-Aktivität im Überstand und korreliert mit der Zytotoxizität (101).

Für den Versuch wurde wie oben beschrieben humane B-Lymphozyten aus dem Blut isoliert und stimuliert. Da Phenolrot und 10 %iges FCS aus dem Zellkulturmedium für B-Zell-Isolation für Dosisabhängigkeitsprüfung störend auf den Zytotoxizitäts-Assay wirken, wurde das Zellkulturmedium für B-Zell-Isolation für LDH-Assay ohne Phenolrot und mit 1 %igen FCS verwendet.

Zwei zusätzliche Kontrollen wurden für den Zytotoxizitäts-Assay in Doppelbestimmung aufgetragen: Eine Positivkontrolle für die maximale Anzahl an toten Zellen, gemessen an der maximalen LDH Freisetzung, welche sich aus 100 µl stimulierte Zellen und 100 µl Triton-X-100-Lösung (2 %) zusammensetzt und einer Negativkontrolle bestehend aus 100 µl Zellkulturmedium für B-Zell-Isolation für LDH-Assay, welche Information über die LDH Aktivität im Zellkulturmedium gibt und als Leerwert verwendet wird. Die Platte wurde mit Klebefolie verschlossen über Nacht im Heracell250i CO<sub>2</sub>-Inkubator (37°C/5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert.

Am Folgetag wurden die Zellen auf eine Microplate, 96 Well, V-Bottom übertragen und die Ursprungsplatte mit 100 µl FACS-Puffer pro Well gewaschen. Der FACS-Puffer wurde nach dem Waschvorgang ebenfalls auf die Microplate, 96 Well, V-Bottom überführt. Es folgte eine Zentrifugation in der Centrifuge 5810 für 8 min mit Bremse bei 1400 rpm (entspricht 377 g) und Raumtemperatur. Pro Well wurden 100 µl des Überstandes auf eine TC-Platte 96 Well, Suspension-F übertragen und zusätzlich 100 µl Reaction mixture des Cytotoxicity Detection Kit (LDH), bestehend aus Dye solution und Catalyst, pro Well hinzugefügt. Nach einer 15-30-minütigen Inkubation im Dunkeln und bei Raumtemperatur wurde die Absorption mittels GloMax Discover Multimode Microplate Reader bei einer Wellenlänge von 490 nm und einer Referenzlänge von 600 nm gemessen.

## **2.7. ELISA zur Quantifizierung der IgM- und IgG-Konzentration**

Für die Quantifizierung der IgM- und IgG-Konzentration aus den Überständen der Proben wurden Enzyme-linked Immunosorbend Assays (ELISA) mit dem Human IgM- und Human IgG ELISA Quantitation Set von Bethyl durchgeführt. Die Protokolle beider Sets unterscheiden sich hingehend der verwendeten Coating- und Sekundärantikörper und der Verdünnung des Referenzserums. In abweichender Zusammensetzung vom Protokoll

wurden ELISA Wasch-, ELISA Blocking-, ELISA-Coating- und ELISA-Stopp-Puffer hergestellt (siehe Tab. 2.1.3.).

Am Vortag des Versuchs wurden 100 µl/ Well Primärantikörper (Affinity purified Goat anti-Human IgG-Fc Coating Antibody bzw. Affinity purified Goat anti-Human IgM Coating Antibody) in einer 1:100 Verdünnung mit ELISA Coating-Puffer auf eine Nunc™ MicroWell™ 96-Well Mikrotiterplatte aufgetragen. Die Platte wurde bei 4°C über Nacht, mit einer Klebefolie verschlossen, gelagert.

Am Versuchstag wurde die Platte dreimal mit ELISA-Wasch-Puffer gewaschen und ausgeklopft. Im Folgenden wurden 200 µl/Well ELISA-Blocking-Puffer hinzugefügt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Erneut wurde die Platte dreimal gewaschen und 100 µl/Well Standard oder Probenüberstand in einer 1:5 Verdünnung in ELISA Blocking-Puffer auf die Platte gegeben. Für Leerwert und Standard wurden für die 1:5 Verdünnung in ELISA Blocking-Puffer das Zellkulturmedium verwendet. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur und dreimaligem Waschen und Ausklopfen wurden 100 µl/Well des Sekundärantikörpers Meerrettich-Peroxidase (HRP) in einer 1:30.000 oder 1:100.000 Verdünnung hinzugegeben.

Es folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur und das dreimalige Waschen und Ausklopfen der Platte. Dann wurden 50 µl/Well 1-Step Turbo TMB-ELISA hinzugegeben und die Platte bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach sichtbarer blauer Farbreaktion wurde die Reaktion mit 50 µl/ Well ELISA-Stopp-Puffer gestoppt. Direkt im Anschluss wurde die Extinktion der Wells am GloMax Discover Multimode Microplate Reader bei 450 nm gemessen.

## **2.8. Auswertung und Statistik**

Für die Analyse der Daten der Durchflusszytometrie wurde die zugehörige Software vom MACSQuant Analyzer 10 Flow Cytometer von Miltenyi Biotec verwendet.

Die Daten für die Dosisabhängigkeitstestung der Substanzen wurden nach der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) unter Verwendung von Office 365 ausgewertet. An Positiv- und

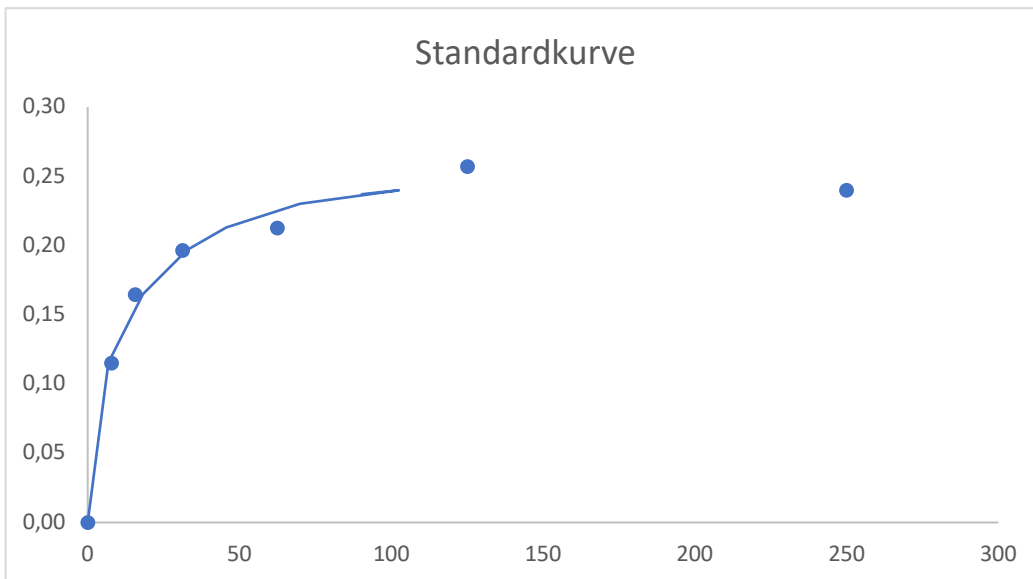
Negativkontrolle wurde ein t-Test durchgeführt, welcher mit einem Wert von  $<0,05$  als signifikant gewertet wurde. Sollte der t-Test kein signifikantes Ergebnis aufweisen, wurden die Daten nicht in der Auswertung berücksichtigt. Folglich weisen die Datensätze der einzelnen B-Zellsubpopulationen unterschiedliche Gesamtzahlen (n) auf.

Des Weiteren wurde eine Normalisierung der Daten in Bezug auf die Positivkontrolle, stimulierte Zellen mit IL21 (100 ng/ml) und anti-hCD40 Antikörper (1 $\mu$ g/ml), vorgenommen.

Die Daten des Zytotoxizitätsassays wurden ebenfalls in Office 365 ausgewertet und es erfolgte eine Normalisierung der Daten in Bezug auf die Positivkontrolle (stimulierte Zellen).

Für die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Daten aus Durchflusszytometrie und Zytotoxizitätsassay wurde GraphPad Prism 6 verwendet. Es erfolgte eine einfaktorische Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) mit multiplem Vergleichstest nach Dunnett gegen die Kontrollgruppe. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p<0,05$  festgelegt.

Die Daten vom ELISA wurden unter Verwendung von Office 365 und SigmaPlot 13.0 ausgewertet und mittels sigmoidaler Standardkurve graphisch dargestellt. Für die Berechnung wurde die Chapman-Richards-Funktion mit folgender Formel verwendet:  $f = a * (1 - \exp(-b * x))^c$ . Die y-Achse bezieht sich auf die Extinktion OD450 und die x-Achse auf die Konzentration in ng/ml. Anhand der Standardkurve wird deutlich, dass mit steigender Konzentration auch die Extinktion zunimmt (s. Abb. 2.8.1.).



**Abb. 2.8.1.: Beispielhafte Standardkurve eines IgG ELISAs.**

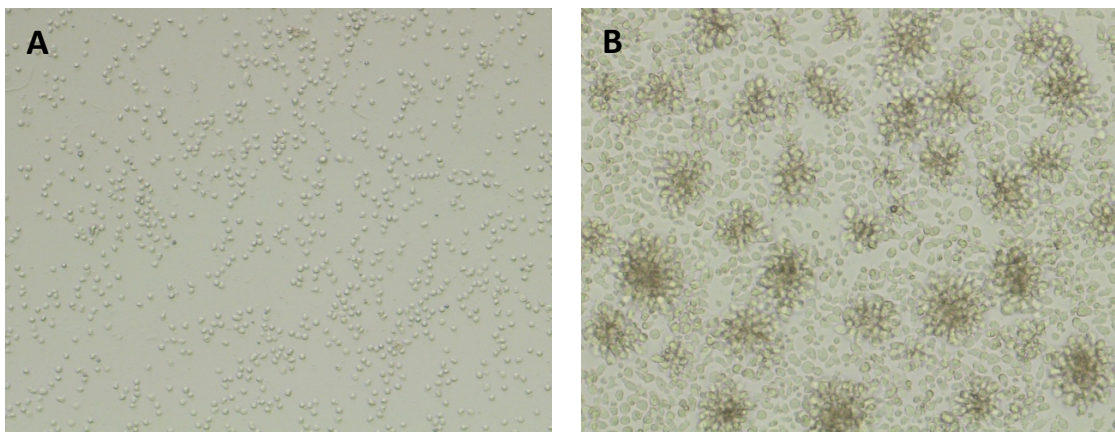
Für die Quantifizierung von IgM- und IgG-Konzentrationen aus den Probenüberständen wurden ELISA mit dem Human IgM- und Human IgG-ELISA Quantitation Set von Bethyl durchgeführt. Für die Berechnung der Standardkurve wurde die Chapman-Richards-Funktion verwendet:  $f = a * (1 - \exp(-b * x))^c$ . X-Achse=Konzentration (ng/ml), y-Achse=OD450.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Die *in vitro* Stimulation von humanen B-Lymphozyten führten zur Steigerung der Expression von Glykosyltransferasen

Um zu untersuchen, ob die Stimulation von humanen B-Lymphozyten zu einer Veränderung des Expressionsmusters der Glykosyltransferasen B4Galt1 und St6Gal1 führt, wurden humane B-Lymphozyten aus dem Blut isoliert und mittels IL-21 (100 ng/ml) und anti-hCD40 Antikörper (1 µg/ml) stimuliert. Nach einer dreitägigen Inkubation zeigten die B-Lymphozyten in der mikroskopischen Analyse, in der Positivkontrolle (stimuliert) im Vergleich zur Negativkontrolle (unstimuliert) vermehrt Zellproliferation, welche anhand von Clusterbildung sichtbar wurde (s. Abb. 3.1.1.).



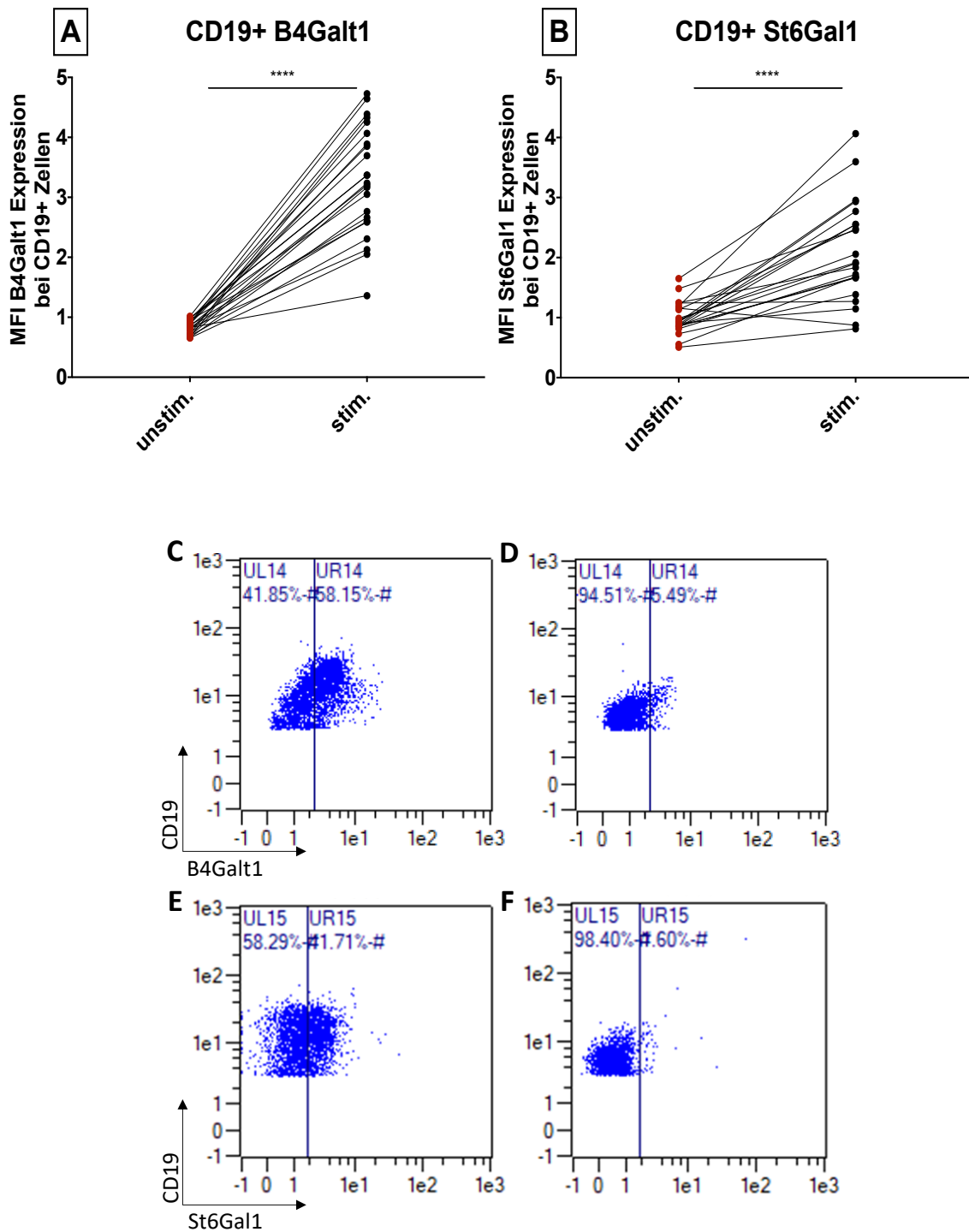
**Abb. 3.1.1.: Stimulierte B-Lymphozyten zeigen Clusterbildung im Vergleich zu unstimulierten B-Lymphozyten nach dreitägiger Inkubation.**

Humane B-Lymphozyten wurden aus dem Blut isoliert, mit IL-21 (100 ng/ml) und anti-CD40 Antikörper (1 µg/ml) stimuliert und für drei Tage inkubiert. Mikroskopische Aufnahmen mit Leica DMI1 bei 100-facher Vergrößerung zeigen **A** unstimulierte Zellen ohne Clusterbildung und **B** stimulierte Zellen mit Clusterbildung.

Für die weitere Auswertung der Daten mittels Durchflusszytometrie wurden ausschließlich B-Lymphozyten mit einer Reinheit von  $\geq 85$  % verwendet. Die Daten wurden in Bezug auf die Positivkontrolle normalisiert, wobei die Positivkontrolle (stimuliert) auf 100 % gesetzt wurde.

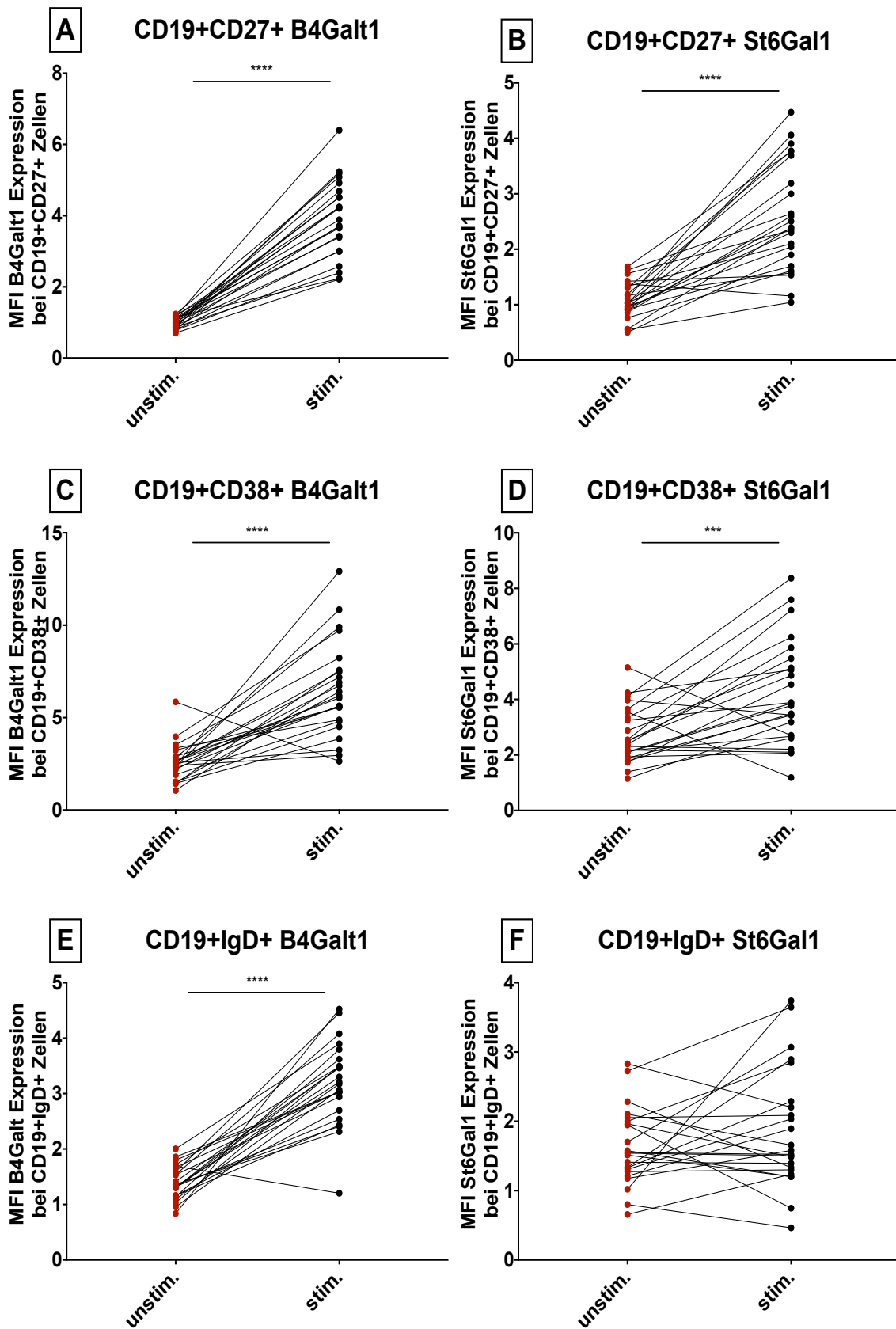
Wie aus den Abbildungen 3.1.2. und 3.1.3. zu entnehmen sind die Ergebnisse der Positiv- und Negativkontrollen in Bezug auf die Expression der beiden Glykosyltransferasen B4Galt1 und St6gal1 signifikant. Es zeigt sich, dass eine Expressionssteigerung der

Glykosyltransferasen für alle vier getesteten extrazelluläre Marker, daher CD19<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> Zellen, signifikant ist. Die Oberflächenmarker sind während den verschiedenen Stadien der B-Zellentwicklung exprimiert, wobei CD19 von der Pro-B-Zelle bis zum Plasmablasten und IgD von der reifen B-Zelle bis zum Plasmablasten exprimiert. CD27 ist als Oberflächenmarker von der Gedächtniszelle bis zur Plasmazelle zu finden und CD38 typisch für Plasmablasten und Plasmazellen (s. Abb. 1.2.1.). Die Stimulation der human B-Lymphozyten hat bei allen Stadien, hinsichtlich der getesteten Oberflächenmarker, der B-Zellentwicklung eine Expressionssteigerung der Glykosyltransferasen B4Gal1 und St6Gal1 zur Folge.



**Abb. 3.1.2.: Die Stimulation von B-Lymphozyten zeigt eine Steigerung der Expression von B4Galt1 und St6Gal1 bei CD19<sup>+</sup> Zellen.**

Humane B-Lymphozyten wurden aus dem Blut isoliert, mit IL-21 (100 ng/ml) und anti-hCD40 Antikörper (1 µg/ml) stimuliert und für drei Tage inkubiert. Dargestellt wurden die Ergebnisse der FACS-Analyse für **C, E** Positiv- (stimuliert) und **D, F** Negativkontrolle (unstimuliert) hinsichtlich der Expression von B4Galt1 und St6Gal1 bei CD19<sup>+</sup> Zellen. Die Daten wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) mit multiplem Vergleichstest nach Dunnett analysiert und graphisch für eine Probenanzahl von n=23 für die **A** B4Galt1 Expression bei CD19<sup>+</sup> Zellen und eine Probenanzahl von n=16 für die **B** St6Gal1 Expression bei CD19<sup>+</sup> Zellen abgebildet. \*\*\*\*p≤0,0001. stim. = stimuliert. unstim. = unstimuliert.

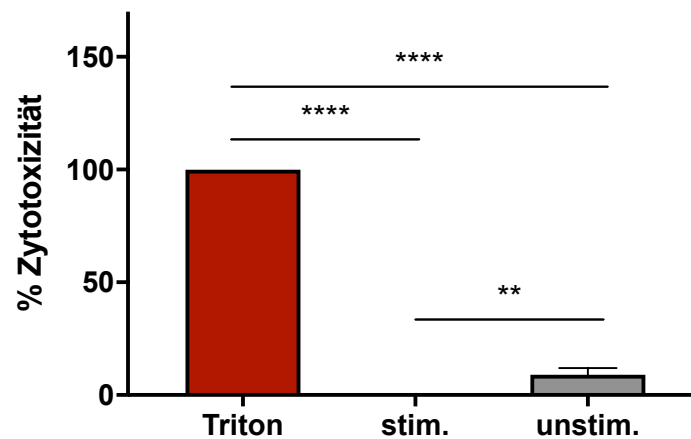


**Abb. 3.1.3.:** Stimulation von B-Lymphozyten zeigt Steigerung der Expression von B4Galt1 und St6Gal1 bei CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> Zellen.

Humane B-Lymphozyten wurden aus dem Blut isoliert, mit IL-21 (100 ng/ml) und anti-hCD40 Antikörper (1 µg/ml) stimuliert und für drei Tage inkubiert. Dargestellt wurden die Ergebnisse der Expression von B4Galt1 und St6Gal1 bei **A, B** CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> (n=23, n=19), **C, D** CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> (n=20, n=7) und **E, F** CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> (n=22, n=5)

Zellen. Die Daten wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) mit multiplem Vergleichstest nach Dunnett analysiert. \*\*\* $p \leq 0,001$ , \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ . stim. = stimuliert. unstim. = unstimuliert.

Die Stimulation der B-Lymphozyten hat keinen Effekt auf die Zytotoxizität. Die Abbildung 3.1.4. zeigt die Ergebnisse der drei Kontrollgruppen: stimulierte Zellen mit Triton, stimulierte Zellen und unstimulierte Zellen. Die stimulierten Zellen mit Triton verhalten sich signifikant zytotoxisch zu den beiden anderen Kontrollen.



**Abb. 3.1.4.: Die Stimulation der B-Lymphozyten zeigt keinen Effekt auf die Zytotoxizität.**

Zur Analyse der Substanzen auf ihre zytotoxischen Effekte bei B-Zellen wurde ein LDH-Zytotoxizitätsassay durchgeführt. Humane B-Lymphozyten wurden aus dem Blut isoliert, mit IL-21 (100 ng/ml) und anti-hCD40 Antikörper (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) stimuliert und über Nacht inkubiert. Dargestellt wurden die Ergebnisse der Kontrollen: Triton = stimulierte Zellen mit Triton-X-100 (2%), stim. = stimulierte Zellen, unstim. = unstimulierte Zellen. Die Daten wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) mit multiplem Vergleichstest nach Dunnett analysiert. \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ .  $n=9$ .

Zudem zeigt die Stimulation keinen Effekt auf die Steigerung von IgG und IgM. Wie den Abbildungen 3.6.1. und 3.6.2. zu entnehmen ist, zeigen die Positivkontrollen (stimulierte Zellen) und die Negativkontrollen (unstimulierte Zellen) der IgM- und IgG-Quantifizierungs-ELISAs keinen signifikanten Unterschied in der Steigerung der beiden Antikörper.

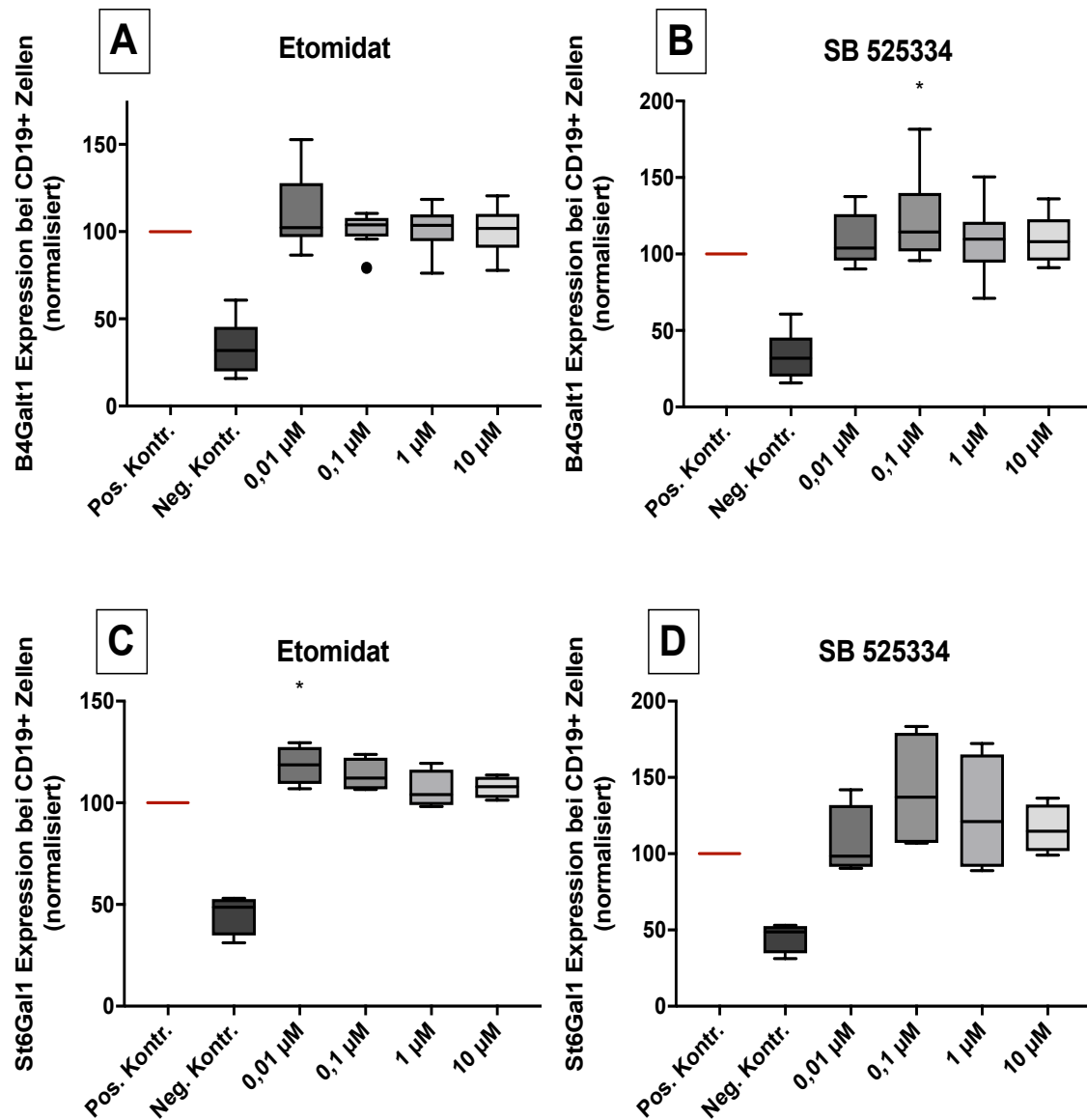
### **3.2. Etomidat und SB 525334 zeigten aktivierende Effekt auf die Expression der Glykosyltransferasen bei CD19<sup>+</sup> Zellen**

Basierend auf dem Substanzscreening von Sirka Marie Sinnecker wurden 131 Substanzen hinsichtlich ihres Effektes auf die B-Zell-Proliferation untersucht. Von den 131 Substanzen wurden 27 Substanzen positiv validiert, die Expression der Glykosyltransferasen B4Gal1 und/oder St6Gal1 zu beeinflussen.

In der hier präsentierten Studie wurden diese 27 Substanzen zur Analyse einer Dosisabhängigkeitsprüfung in vier verschiedenen Konzentrationen (0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM, 10 µM) auf ihren Effekt auf die Expression der Glykosyltransferasen B4Gal1 und St6Gal1 getestet. B-Lymphozyten wurden hierzu aus dem humanen Blut isoliert, mit IL-21 (100 ng/ml) und anti-hCD40 Antikörper (1 µg/ml) stimuliert und anschließend für einen Zeitraum von drei Tagen inkubiert. Es folgte eine Analyse mittels Durchflusszytometrie. Die Daten wurden in Bezug auf die Positivkontrolle normalisiert.

Es zeigte sich, dass zwei Substanzen einen signifikant aktivierenden Effekt auf die Expression von B4Gal1 oder St6Gal1 bei CD19<sup>+</sup> Zellen aufweisen.

Das Hypnotikum Etomidat zeigte einen signifikant aktivierenden Effekt in der Konzentration 0,01 µM auf die Expression von St6Gal1. Es wurde eine Probenanzahl von n=4 berücksichtigt. Für die Expression von B4Gal1 bei einer Probenanzahl von n=9 zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse. Für SB 525334, ein TGF-β-Rezeptor Inhibitor, wurden signifikante Ergebnisse für die Expression von B4Gal1 in der Konzentration 0,1 µM analysiert. Die Ergebnisse basieren auf einer Probenanzahl von n=9. Für die Expression von St6Gal1 wurden keine signifikanten Ergebnisse erzielt (s. Abb. 3.2.1.).



**Abb. 3.2.1.: Aktivierender Effekt auf die Expression von B4GalT1 und St6Gal1 bei CD19<sup>+</sup> Zellen.**

Humane B-Lymphozyten wurden aus dem Blut isoliert und mit IL-21 (100 ng/ml) und anti-hCD40 Antikörper (1 μg/ml) stimuliert. Für die Positivkontrollen und Inhibitoren, in vier verschiedenen Konzentrationen (0,01 μM, 0,1 μM, 1 μM, 10 μM), wurden stimulierte B-Lymphozyten, während für die Negativkontrollen unstimulierte B-Lymphozyten verwendet wurden.

Ergebnisse der Testung der Expression von B4GalT1 bei CD19<sup>+</sup> Zellen wurden für **A** Etomidat (n=9) und **B** SB 525334 (n=9) graphisch dargestellt. Die graphische Darstellung für die Ergebnisse der Testung der Expression von St6Gal1 bei CD19<sup>+</sup> Zellen erfolgte ebenfalls für **C** Etomidat (n=4) und **D** SB 525334 (n=4). Die Daten wurden in Bezug auf die Positivkontrolle normalisiert und mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) mit multiplem Vergleichstest nach Dunnett analysiert. \*p≤0,05. Pos. Kontr. = Positivkontrolle. Neg. Kontr. = Negativkontrolle.

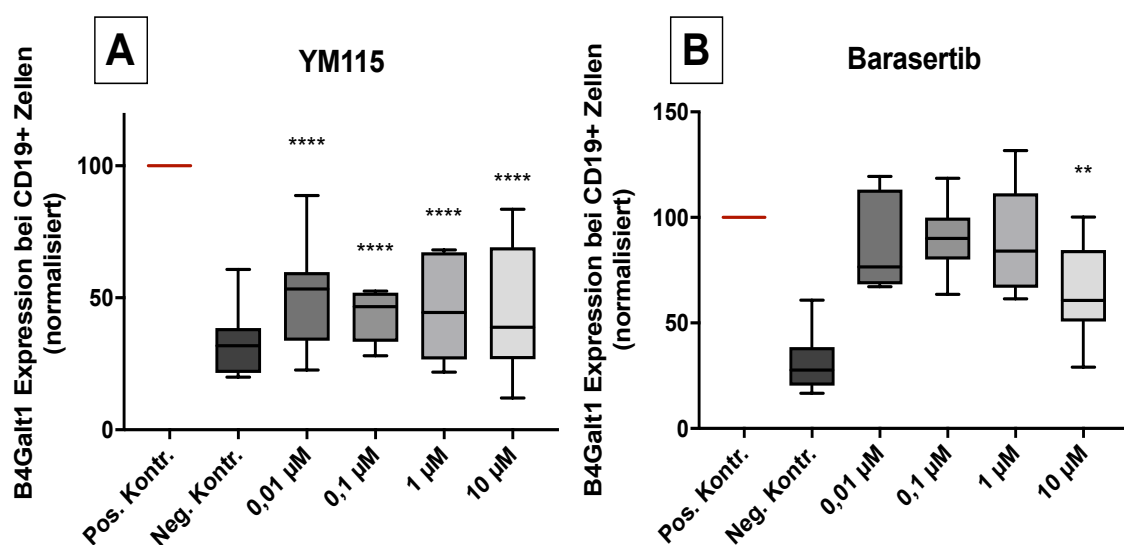
Ein signifikant aktivierender Effekt konnte außerdem bei CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> Zellen für die Expression von B4GalT1 für zwei Substanzen und für die Expression von St6Gal1 für eine Substanz bei CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> Zellen nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigte sich ein

signifikant aktivierender Effekt bei CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> Zellen auf die Expression von St6Gal1 bei einer Substanz. Detaillierte Ergebnisse zu CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> Zellen finden sich im Anhang in Tabelle 7.3.-7.8..

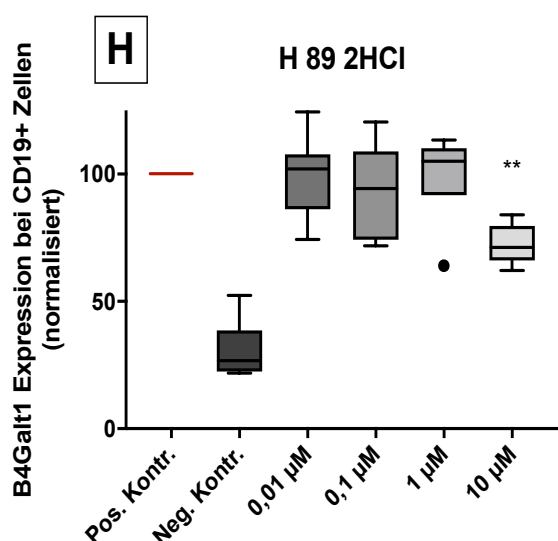
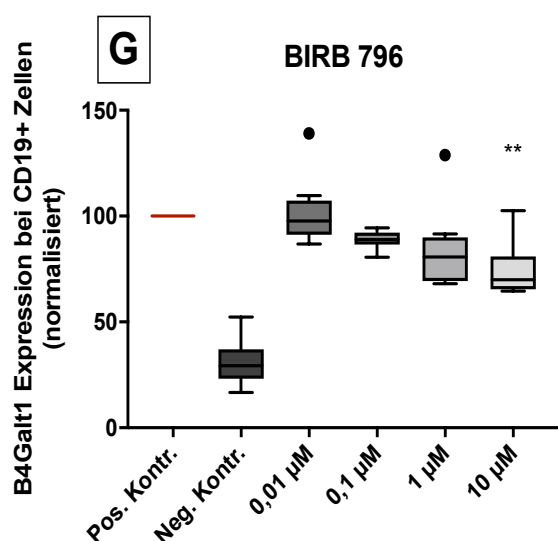
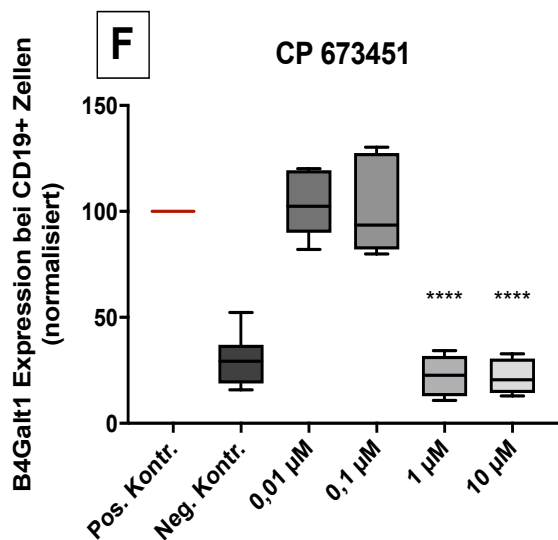
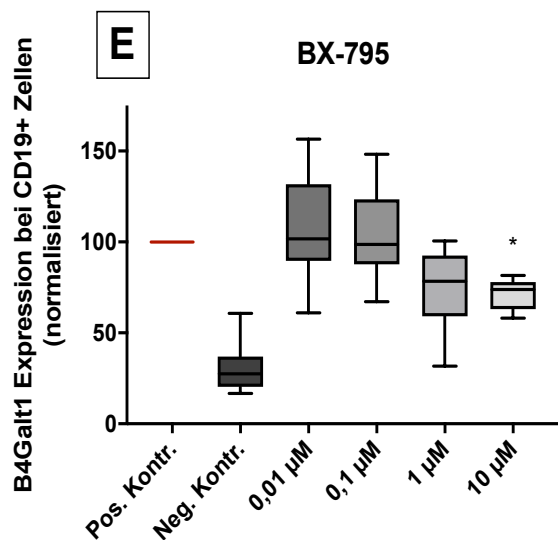
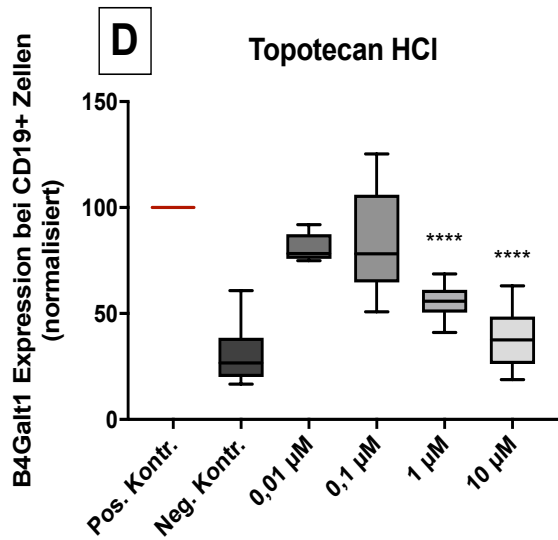
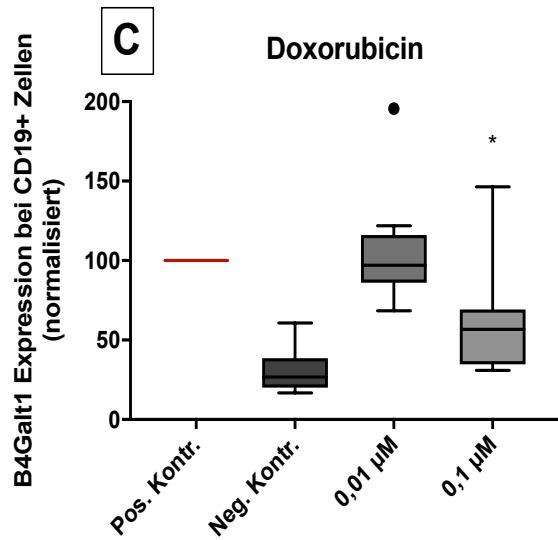
### 3.3. 15 Substanzen zeigten einen hemmenden Effekt auf die Expression der Glykosyltransferasen

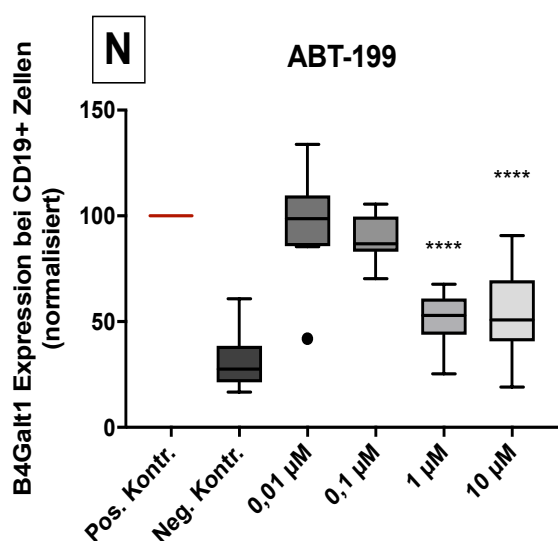
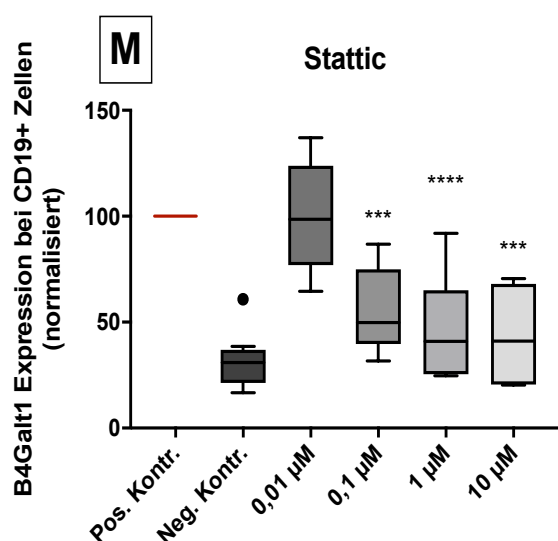
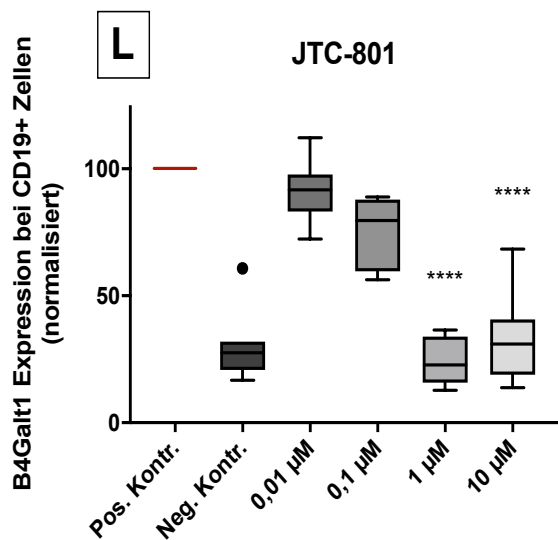
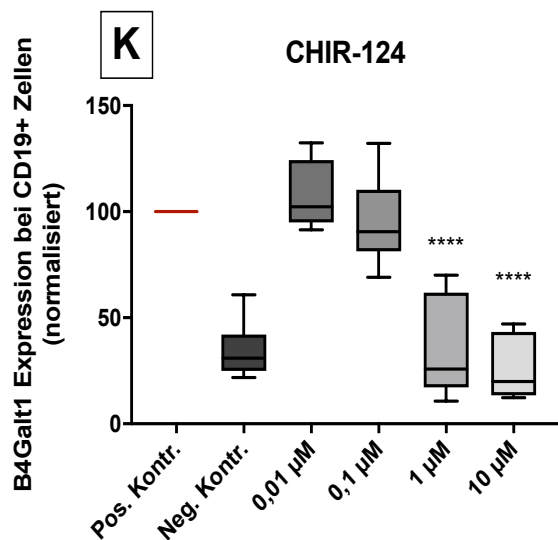
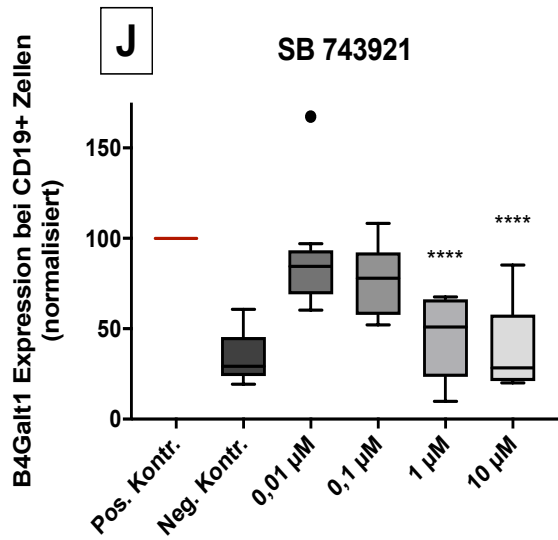
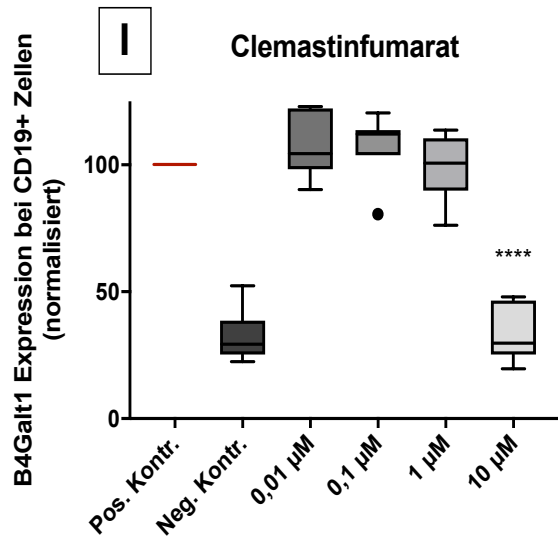
Um zu untersuchen, ob die 27 Substanzen einen hemmenden Effekt auf die Expression der Glykosyltransferasen B4Galt1 und St6Gal1 haben, wurde eine Dosisabhängigkeitsprüfung durchgeführt. Analog zu den aktivierenden Effekten auf die Expression der Glykosyltransferasen werden hier die Ergebnisse der hemmenden Effekte für die Expression der Glykosyltransferasen bei CD19<sup>+</sup> Zellen präsentiert.

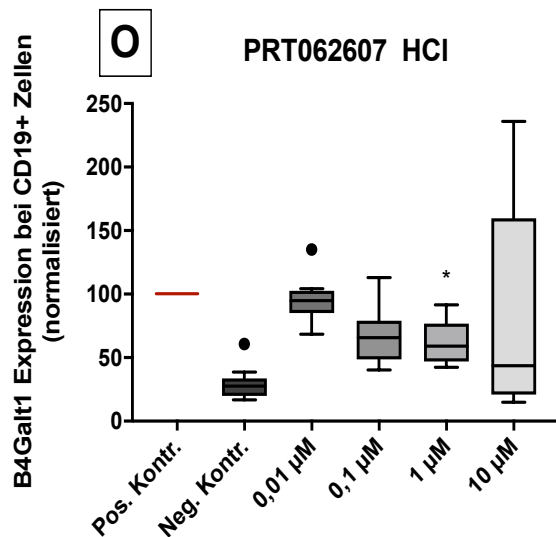
Bei der Analyse zur Dosisabhängigkeit von 27 Substanzen zeigten 15 Substanzen einen signifikant hemmenden Effekt auf die Expression von B4Galt1 bei CD19<sup>+</sup> Zellen (s. Abb. 3.3.1.). Fünf Substanzen zeigten hingegen einen signifikant hemmenden Effekt auf die Expression von B4Galt1 und St6Gal1 bei CD19<sup>+</sup> Zellen (s. Abb. 3.3.1. und Abb. 3.3.2.).





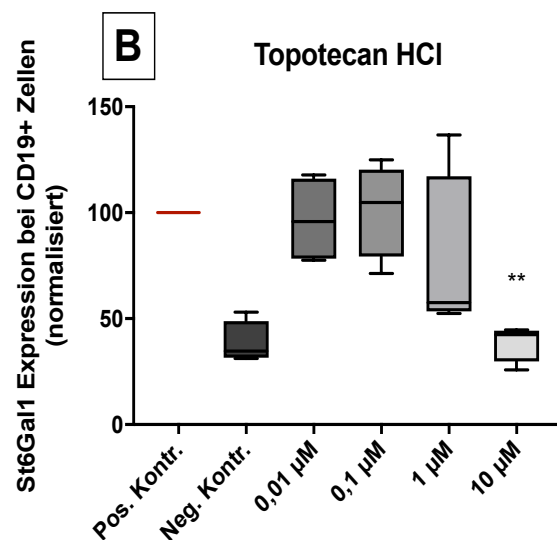
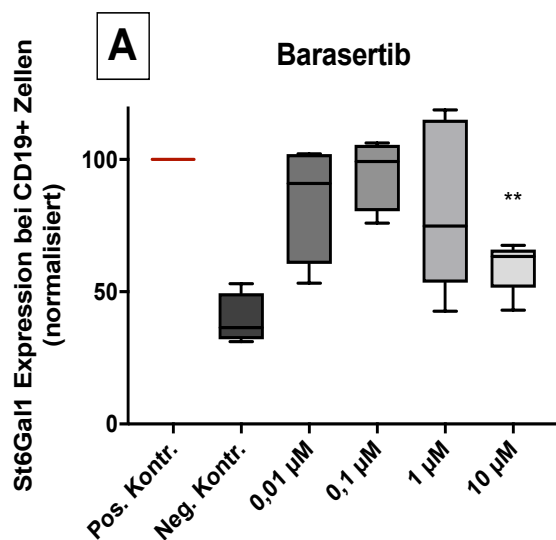


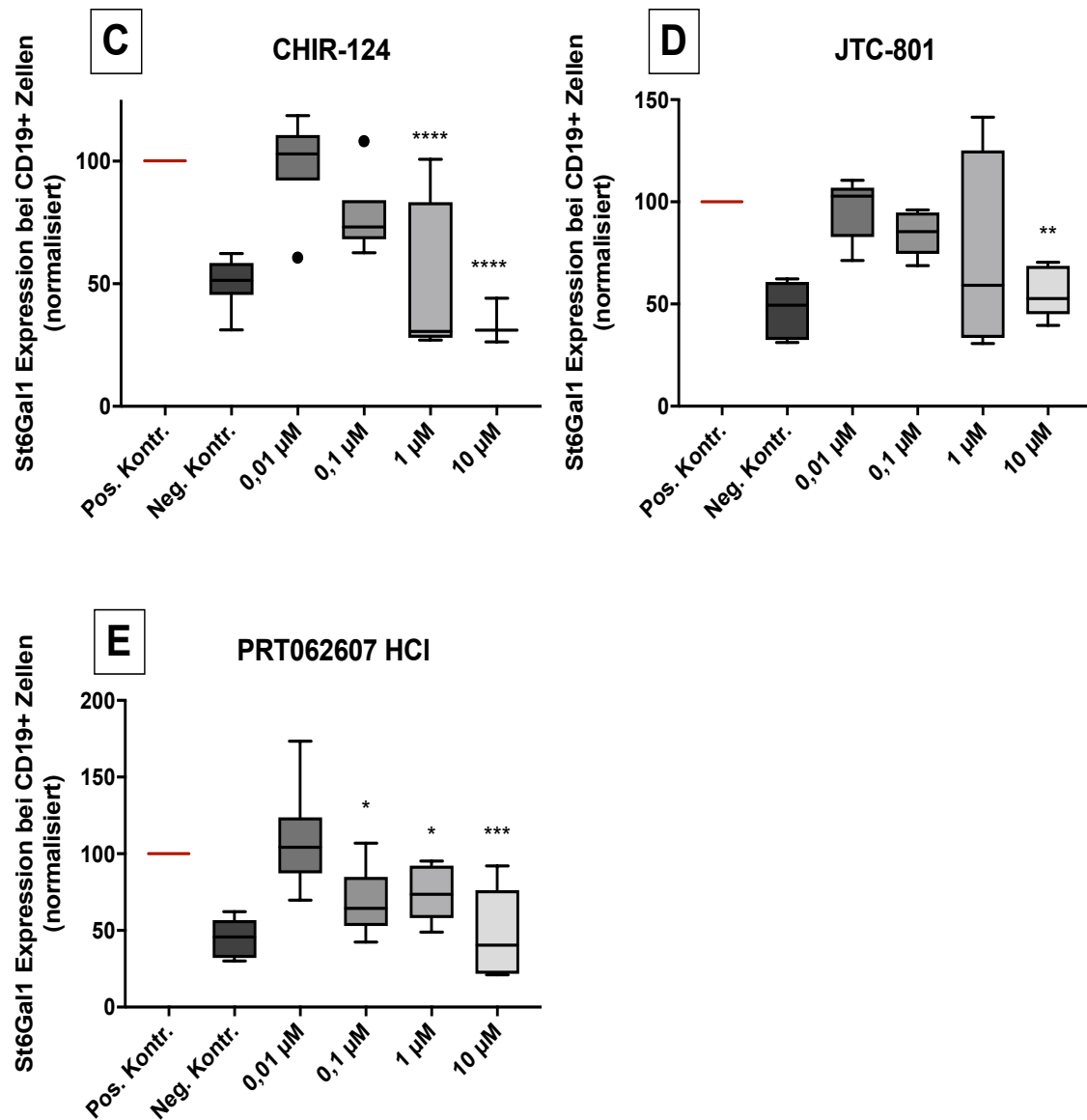




**Abb. 3.3.1.: Substanzen mit hemmendem Effekt auf die Expression von B4Gal1 bei CD19<sup>+</sup> Zellen.**

Im Rahmen der Dosisabhängigkeitsprüfung wurden 15 Substanzen mit einem signifikant hemmenden Effekt auf die Expression von B4Gal1 bei CD19<sup>+</sup> Zellen analysiert. Hierfür wurden B-Lymphozyten aus dem humanen Blut isoliert. Die Negativkontrolle enthält unstimulierte B-Lymphozyten. Die Positivkontrollen und Inhibitoren in vier Konzentrationen (0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM, 10 µM) wurden mit IL-21 (100 ng/ml) und anti-hCD40 Antikörper (1 µg/ml) stimuliert. Folgende Substanzen wurden graphisch dargestellt: **A** YM115 (n=7), **B** Barasertib (n=8), **C** Doxorubicin (n=8), **D** Topotecan HCl (n=8), **E** BX-795 (n=8), **F** CP 673451 (n=8), **G** BIRB 796 (n=8), **H** H 89 2HCl (n=7), **I** Clemastinfumarat (n=7), **J** SB 743921 (n=8), **K** CHIR-124 (n=10), **L** JTC-801 (n=8), **M** Stattic (n=8), **N** ABT-199 (n=10), **O** PRT062607 HCl (n=10). Die Daten wurden mittels einfaktorierter Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) mit multiplem Vergleichstest nach Dunnett analysiert und in Bezug auf die Positivkontrolle normalisiert. \*p≤0,05, \*\*p≤0,01, \*\*\*p≤0,001, \*\*\*\*p≤0,0001. Pos. Kontr. = Positivkontrolle. Neg. Kontr. = Negativkontrolle.





**Abb. 3.3.2.: Substanzen mit hemmendem Effekt auf die Expression von St6Gal1 bei CD19<sup>+</sup> Zellen.**

Fünf Substanzen zeigten zusätzlich zum signifikant hemmenden Effekt auf die Expression von B4Gal1 bei CD19<sup>+</sup> Zellen einen signifikant hemmenden Effekt auf die Expression von St6Gal1 bei CD19<sup>+</sup> Zellen. B-Lymphozyten wurden aus dem humanen Blut isoliert. Die Negativkontrolle enthält unstimulierte B-Lymphozyten. Die Positivkontrollen und Inhibitoren in vier Konzentrationen (0,01 μM, 0,1 μM, 1 μM, 10 μM) wurden mit IL-21 (100 ng/ml) und anti-hCD40 Antikörper (1 μg/ml) stimuliert. Folgende Substanzen wurden graphisch dargestellt: **A** Barasertib (n=5), **B** Topotecan HCl (n=4), **C** CHIR-124 (n=8), **D** JTC-801 (n=6), **E** PRT062607 HCl (n=9). Die Daten wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) mit multiplem Vergleichstest nach Dunnett analysiert und in Bezug auf die Positivkontrolle normalisiert. \*p≤0,05, \*\*p≤0,01, \*\*\*p≤0,001, \*\*\*\*p≤0,0001. Pos. Kontr. = Positivkontrolle. Neg. Kontr. = Negativkontrolle.

Des Weiteren wiesen die Substanzen signifikant hemmende Effekte auf die Expression der Glykosyltransferasen für CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> Zellen auf. 14 Substanzen zeigten einen hemmenden Effekt auf die Expression von B4Gal1 und drei Substanzen auf die Expression von St6Gal1 bei CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> Zellen. Für CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> Zellen

wurden hemmende Effekte auf die Expression von B4Galt1 bei 11 Substanzen und für die Expression von St6Gal1 bei 2 Substanzen analysiert. Darüber hinaus erwiesen sich sechs Substanzen als hemmend auf die Expression von B4Galt1 bei CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> Zellen, während nur eine Substanz hemmend auf die Expression von St6Gal1 wirkte. Die Ergebnisse für CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> Zellen sind den Tabellen 7.3.-7.8. im Anhang zu entnehmen.

### **3.4. Sechs Substanzen hatten keinen Effekt auf die Expression der Glykosyltransferasen**

Um zu untersuchen, ob die Ergebnisse des Substanzscreenings von Sirka Marie Sinnecker mit 27 validierten Substanzen, welche einen signifikanten Effekt auf die Expression von B4Galt1 und/oder St6Gal1 in CD19<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> Zellen aufweisen, reproduzierbar sind, wurde eine Dosisabhängigkeitsprüfung durchgeführt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus dem Vorgängerprojekt, konnten in den hier durchgeführten Versuchen ein signifikanter Effekt nicht für sechs der Substanzen nachgewiesen werden. Folgende Substanzen zeigten keinen signifikanten Effekt: Celecoxib, Doxazosin mesylate, Tadalafil, Allopurinol, Enalaprilat und Xylazin HCl. Die Daten wurden in Bezug auf die Positivkontrolle normalisiert und eine Probenanzahl von n=3-9 bei der Analyse berücksichtigt. Eine Darstellung der Daten mit Mittelwert, Standardabweichung und p-Wert sind für CD19<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> Zellen in Tabelle 7.1.-7.8. im Anhang einzusehen.

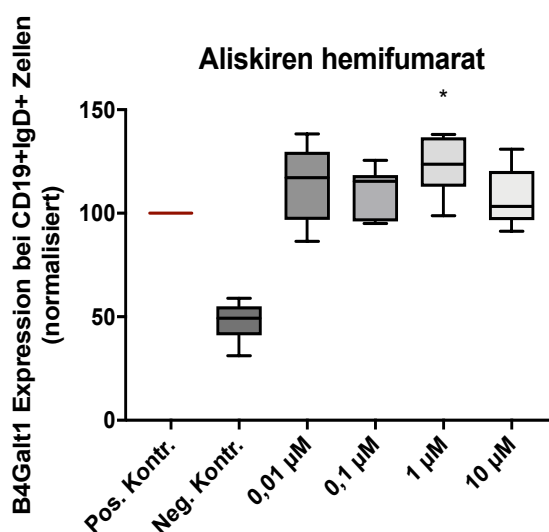
### **3.5. B-Zellsubtypen-spezifische Effekte**

Neben den Effekten auf die Expression der Glykosyltransferasen in CD19<sup>+</sup> Zellen zeigten die Substanzen teilweise weitere signifikante B-Zellsubtypen-spezifische Effekte in CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> und/oder CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> Zellen. Zur Analyse der Dosisabhängigkeit wurden wie oben beschrieben humane B-Lymphozyten aus dem Blut isoliert, stimuliert und eine FACS-Analyse nach dreitägiger Inkubation durchgeführt. Die Daten wurden in Bezug auf die Positivkontrolle normalisiert.

Exemplarisch werden im Folgenden die Ergebnisse zweier Substanzen in Bezug auf ihre B-Zellsubtypen-spezifischen Effekte präsentiert. Eine detaillierte Darstellung der Ergebnisse (Mittelwert, Standardabweichung, p-Wert) der B-Zellsubtypen für alle getesteten Substanzen finden sich im Anhang in Tabelle 7.1.-7.8..

### 3.5.1. Aliskiren hemifumarat zeigte einen signifikant aktivierenden Effekt auf die Expression von B4Galt1 in CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> Zellen

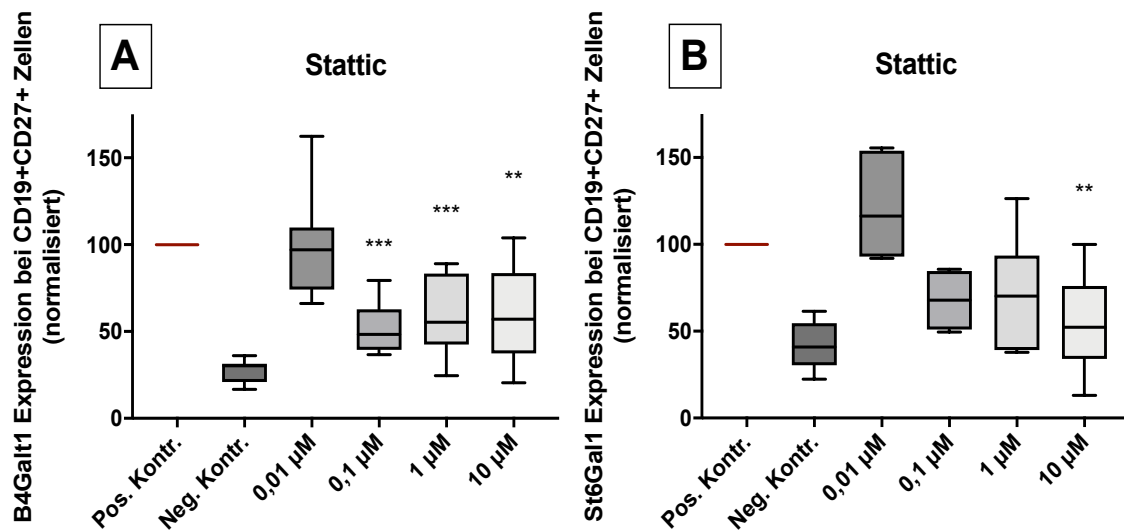
Der Renininhibitor Aliskiren hemifumarat zeigte ausschließlich einen signifikant aktivierenden Effekt auf die Expression von B4Galt1 in CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> Zellen in der Konzentration 1 µM (p=0,0115) (s. Abb. 3.5.1.). Auf die Expression von St6Gal1 in CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> Zellen und auf die Expression von B4Galt1 und St6Gal1 in CD19<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> Zellen konnte kein signifikanter Effekt nachgewiesen werden.

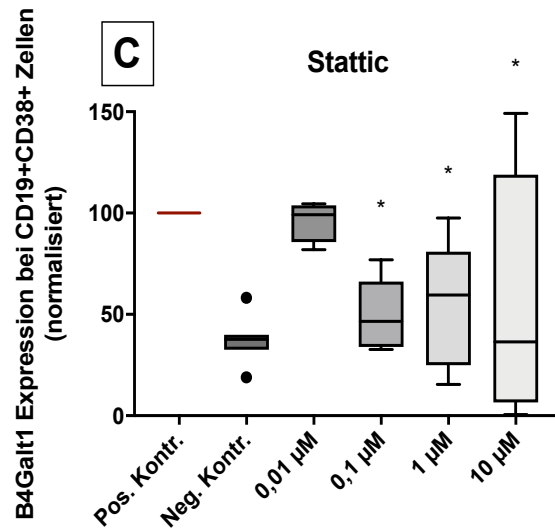


**Abb. 3.5.1.: Aliskiren hemifumarat wirkt aktivierend auf die Expression von B4Galt1 in CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> Zellen.** Um die Wirksamkeit von Aliskiren hemifumarat auf die Expression von B4Galt1 in CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> Zellen zu testen, wurden B-Lymphozyten aus dem humanen Blut isoliert. Die Negativkontrolle enthält unstimulierte B-Lymphozyten. Die Positivkontrolle und Inhibitor (n=7) in vier Konzentrationen (0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM, 10 µM) wurden mit IL-21 (100 ng/ml) und anti-hCD40 Antikörper (1 µg/ml) stimuliert. Die Daten wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) mit multiplem Vergleichstest nach Dunnett analysiert und in Bezug auf die Positivkontrolle normalisiert. \*p≤0,05. Pos. Kontr. = Positivkontrolle. Neg. Kontr. = Negativkontrolle.

### 3.5.2. Stattic zeigte einen signifikant hemmenden Effekt auf die Expression von B4Galt1 und St6Gal1 in den B-Zellsubtypen

Stattic, ein STAT3 Inhibitor, zeigte multiple B-Zellsubtypen spezifische, hemmende Effekte, welche in Bezug auf die Expression der Glykosyltransferasen variierten. Während sich in CD19<sup>+</sup> Zellen ein signifikant hemmender Effekt auf die Expression von B4Galt1 in den Konzentrationen 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M (s. Abb. 3.3.1. **M**) nachweisen ließ, konnte kein signifikanter Effekt auf die Expression von St6Gal1 gezeigt werden. Darüber hinaus wurden signifikante Ergebnisse für CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> Zellen für die Expression von B4Galt1 in den Konzentrationen 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M und für die Expression von St6Gal1 ausschließlich in der Konzentration 10  $\mu$ M analysiert werden (s. Abb. 3.5.2. **A** und **B**). Ebenfalls signifikant für die Expression von B4Galt1 in den Konzentration 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M waren CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> Zellen (s. Abb. 3.5.2. **C**), während kein Effekt auf die Expression von St6Gal1 nachweisbar war. Für CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> Zellen wurde weder für die Expression von B4Galt1 noch derer von St6Gal1 ein signifikantes Ergebnis analysiert.





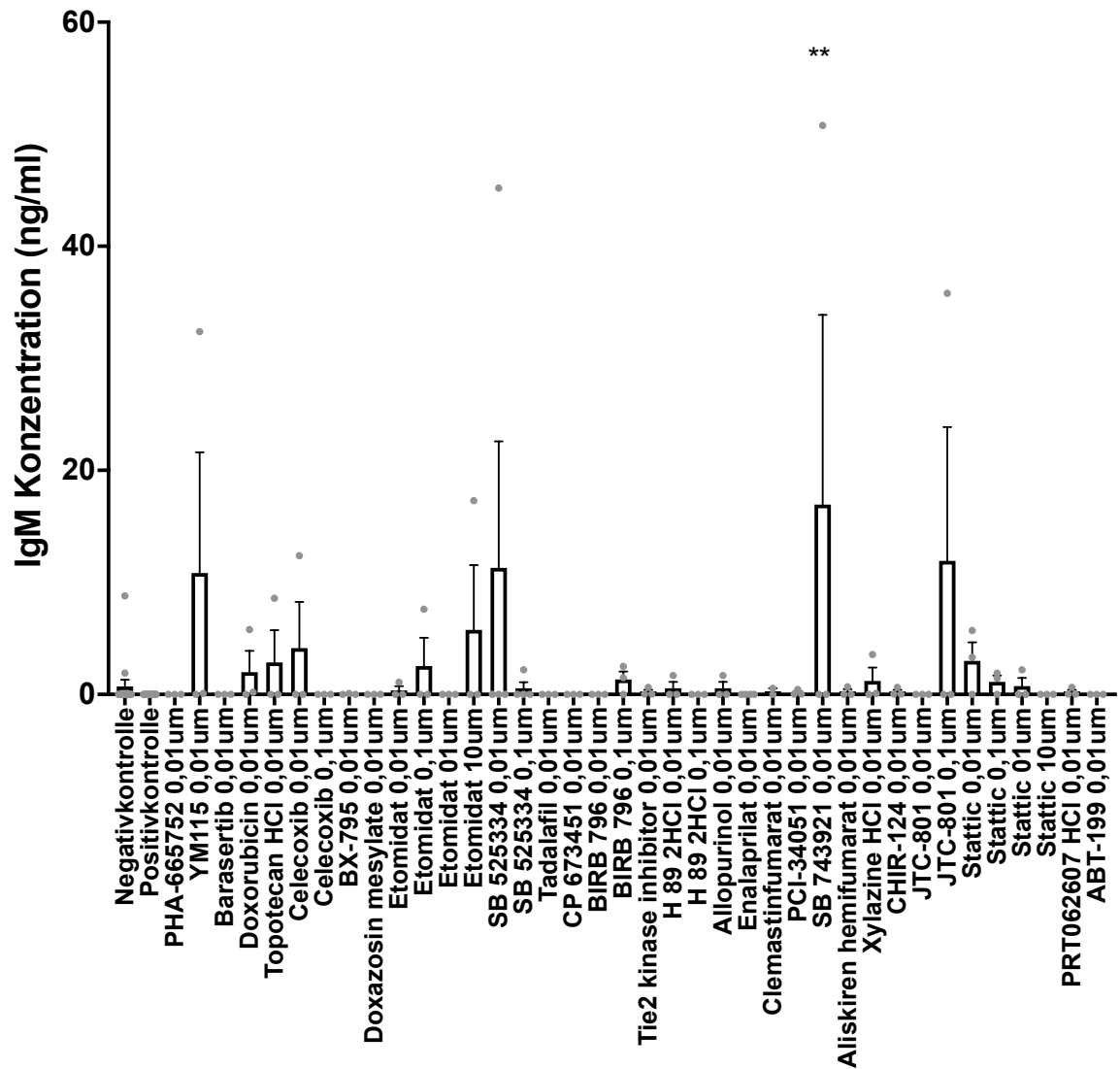
**Abb. 3.5.2.: Stattic mit hemmendem Effekt auf die Expression von B4Galt1 und/oder St6Gal1 bei CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> Zellen.**

Hemmender Effekt von Stattic auf die Expression von B4Galt1 und/oder St6Gal1 der B-Zellsubtypen CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>. B-Lymphozyten wurden aus dem humanen Blut isoliert. Die Negativkontrolle enthält unstimulierte B-Lymphozyten. Die Positivkontrolle und Inhibitor (n=6-8) in vier Konzentrationen (0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM, 10 µM) wurden mit IL-21 (100 ng/ml) und anti-hCD40 Antikörper (1 µg/ml) stimuliert. Dargestellt ist die Expression von **A** B4Galt1 (n=8) und **B** St6Gal1 (n=6) bei CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> Zellen, sowie die Expression von **C** B4Galt1 (n=7) bei CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> Zellen. Die Daten wurden mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) mit multiplern Vergleichstest nach Dunnett analysiert und in Bezug auf die Positivkontrolle normalisiert. \*p≤0,05. Pos. Kontr. = Positivkontrolle. Neg. Kontr. = Negativkontrolle.

### 3.6. Substanzen steigern die Antikörpertiter von IgM und IgG

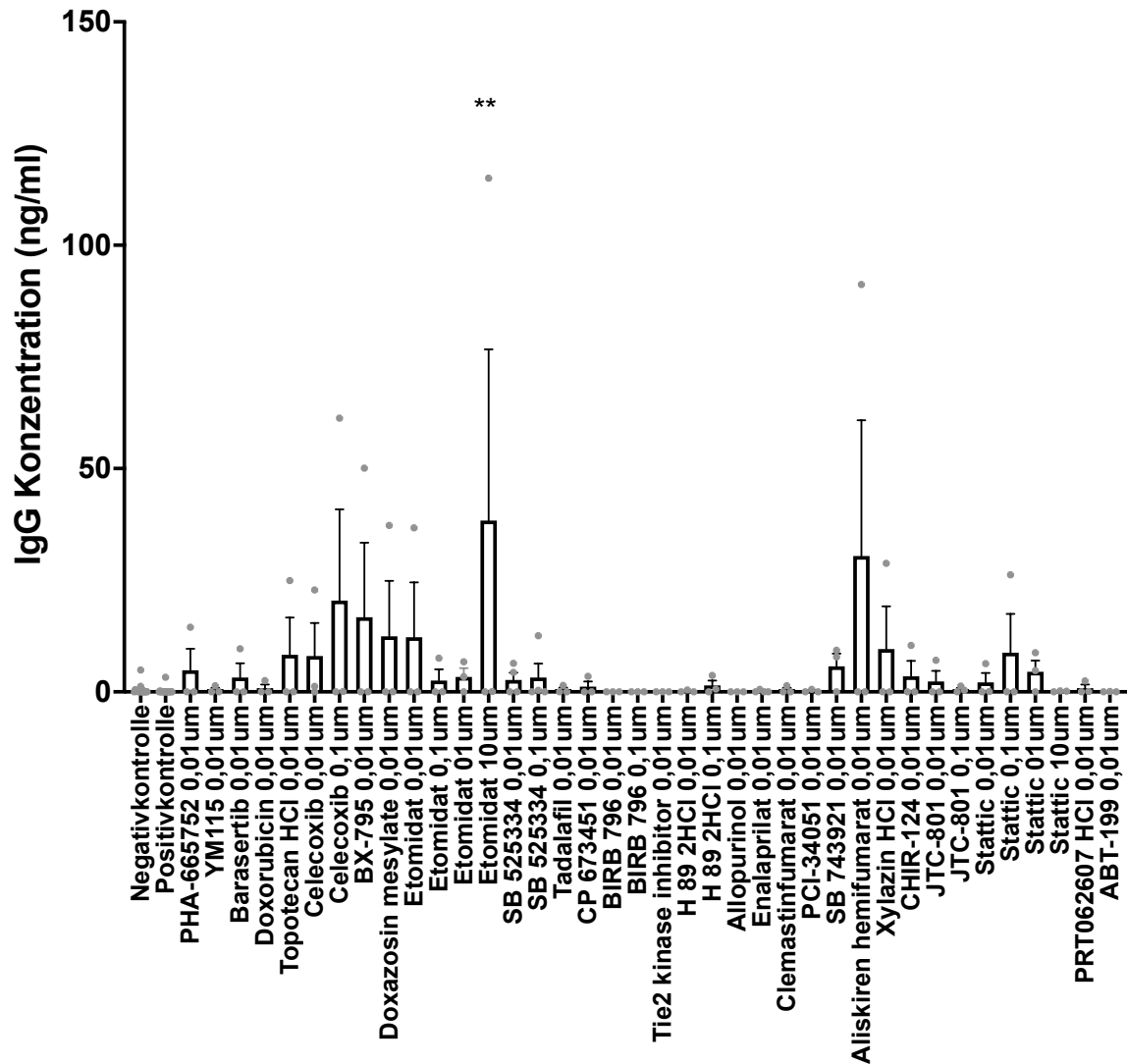
Um zu untersuchen, ob die validierten Substanzen nach drei Tagen Stimulation zu einer Steigerung der IgM und IgG Freisetzung führen, wurden IgM- und IgG-Quantifizierungs-ELISAs durchgeführt. Es wurde wie oben beschrieben eine Isolation, Stimulation und dreitägige Inkubation der B-Lymphozyten durchgeführt. Vor der FACS-Analyse wurden die Überstände entnommen und für die ELISAs verwendet. Abhängig vom IC50-Wert wurden die Substanzen in den Konzentrationen 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM, 10 µM getestet. Die Ergebnisse beziehen sich auf eine Probenanzahl von n=3-4. Es ist eine signifikante Steigerung der Antikörpertiter von IgM bei SB 743921 in der Konzentration 0,01 µM und eine Steigerung der Antikörpertiter von IgG unter Einfluss von Etomidat in der Konzentration 10 µM zu beobachten. In Abb. 3.6.1. und 3.6.2. sind die Ergebnisse der ELISA für IgM und IgG getrennt dargestellt.





**Abb. 3.6.1.: ELISA zur Quantifizierung der IgM-Konzentration.**

Darstellung der Ergebnisse der ELISA für die Quantifizierung der IgM-Konzentration (ng/ml) zur Analyse des Substanzeinflusses auf die Antikörperproduktion von entwickelten Plasmazellen. Die verwendeten B-Lymphozyten wurden stimuliert (IL-21 (100 ng/ml), aCD40Ab (1 µg/ml)) nach dreitägiger Inkubation der Zellüberstand für die ELISA verwendet. Testung der Substanzen abhängig vom IC50 Wert in den Konzentrationen 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM, 10 µM. Die graphische Darstellung erfolgte mittels SigmaPlot 13.0. n=3-4. Negativkontrolle = unstimulierte Zellen. Positivkontrolle = stimulierte Zellen. Die Daten wurden mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) mit multiplem Vergleichstest nach Dunnett analysiert. \*\*p≤0,01.



**Abb. 3.6.2.: ELISA zur Quantifizierung der IgG-Konzentration.**

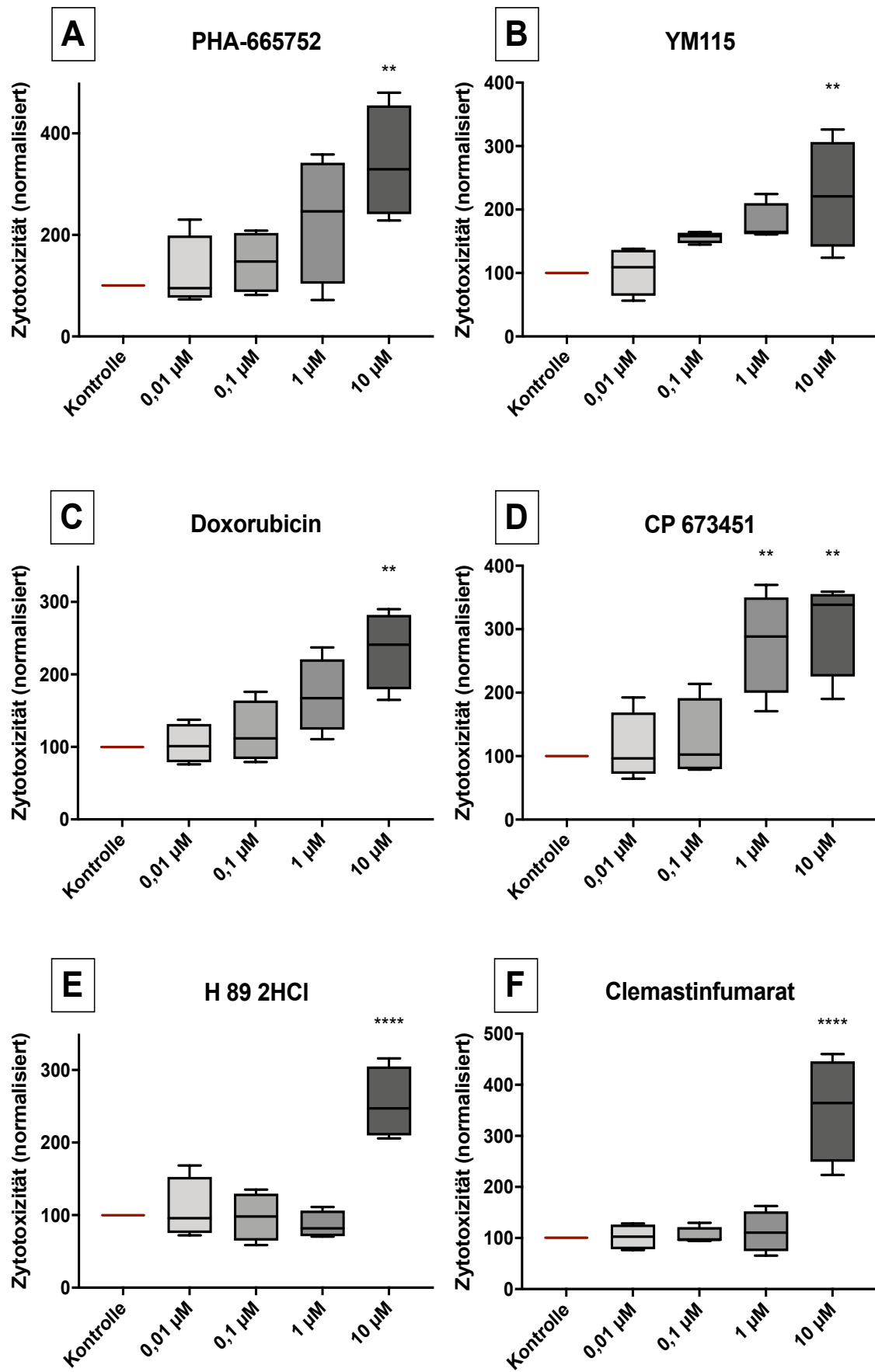
Darstellung der Ergebnisse der ELISA für die Quantifizierung der IgG-Konzentration (ng/ml) zur Analyse des Substanzeinflusses auf die Antikörperproduktion von entwickelten Plasmazellen. Die verwendeten B-Lymphozyten wurden stimuliert (IL-21 (100 ng/ml, aCD40Ab (1 µg/ml)) nach dreitägiger Inkubation der Zellüberstand für die ELISA verwendet. Testung der Substanzen abhängig vom IC50 Wert in den Konzentrationen 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM, 10 µM. Die graphische Darstellung erfolgte mittels SigmaPlot 13.0. n=3-4. Negativkontrolle = unstimulierte Zellen. Positivkontrolle = stimulierte Zellen. Die Daten wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) mit multiplem Vergleichstest nach Dunnett analysiert. \*\*p≤0,01.

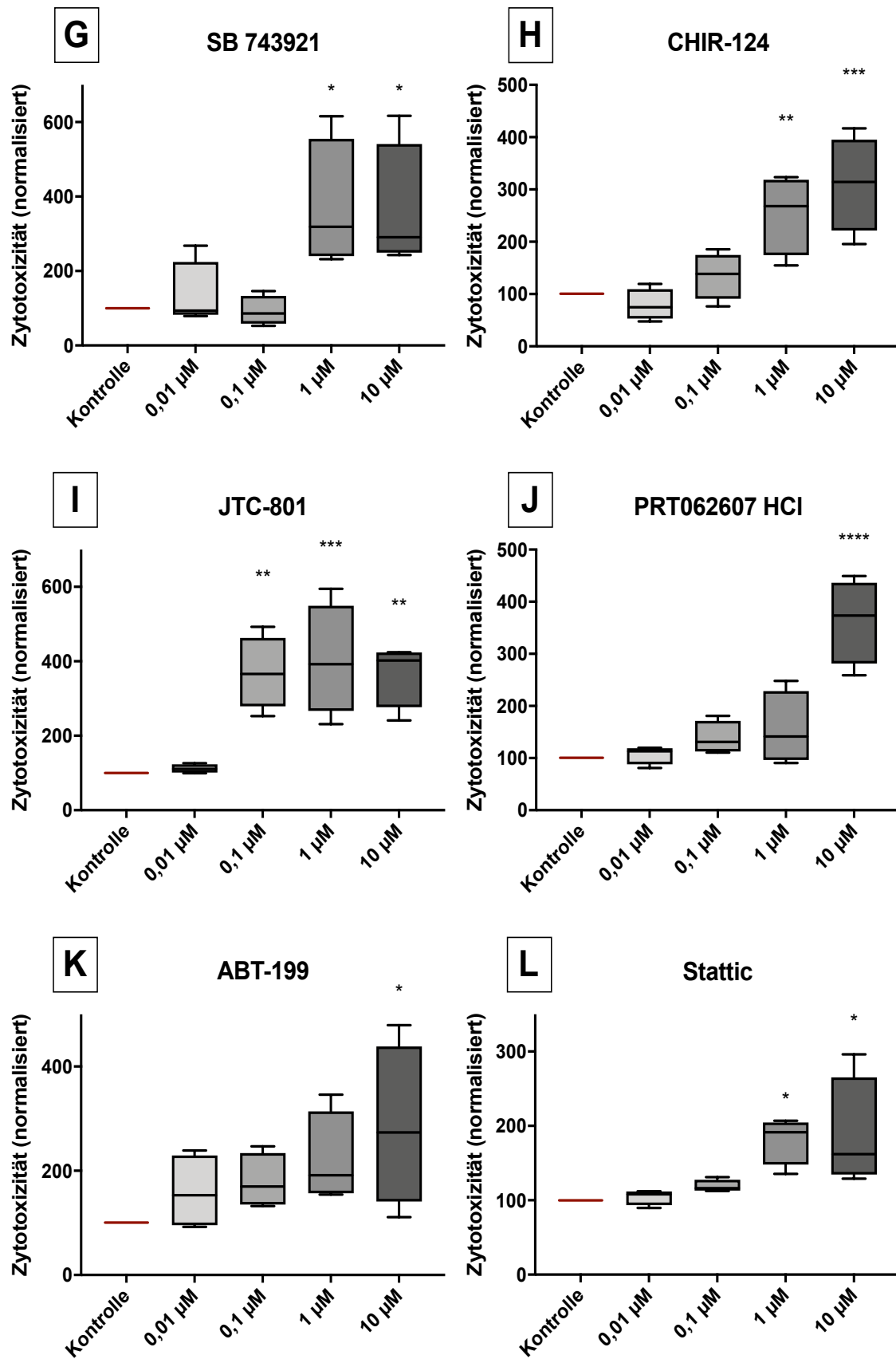
### 3.7.12 Substanzen zeigten einen signifikant zytotoxischen Effekt und zwei Substanzen einen zytoprotektiven Effekt

Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte auf einer Toxizität der Substanzen beruhen, wurden die 27 Substanzen hinsichtlich ihrer Zytotoxizität analysiert. Nach Isolation, Stimulation und eintägiger Inkubation der B-Lymphozyten wurde die LDH-

Freisetzung im Überstand, welche mit der Zytotoxizität korreliert, gemessen. Es wurde der Einfluss der Substanzen auf die Zytotoxizität in vier verschiedenen Konzentrationen (0,01  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ) untersucht. Die Ergebnisse beziehen sich auf eine Probenanzahl von n=3-4.

Es wurden zwölf Substanzen identifiziert, welche einen signifikant zytotoxischen Effekt aufweisen. Der Nociceptin-Rezeptor-Antagonist JTC-801 zeigte ab einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  signifikant zytotoxische Effekte, während sich bei den Substanzen CP 673451, SB 743921, CHIR-124 und Stattic erst ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  signifikante Ergebnisse nachweisen ließen. Die Substanzen PHA-665752, YM115, Doxorubicin, H 89 2HCl, Clemastinfumarat, PRT062607 HCl und ABT-199 wiesen ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  signifikant toxische Ergebnisse (s. Abb. 3.7.1.).



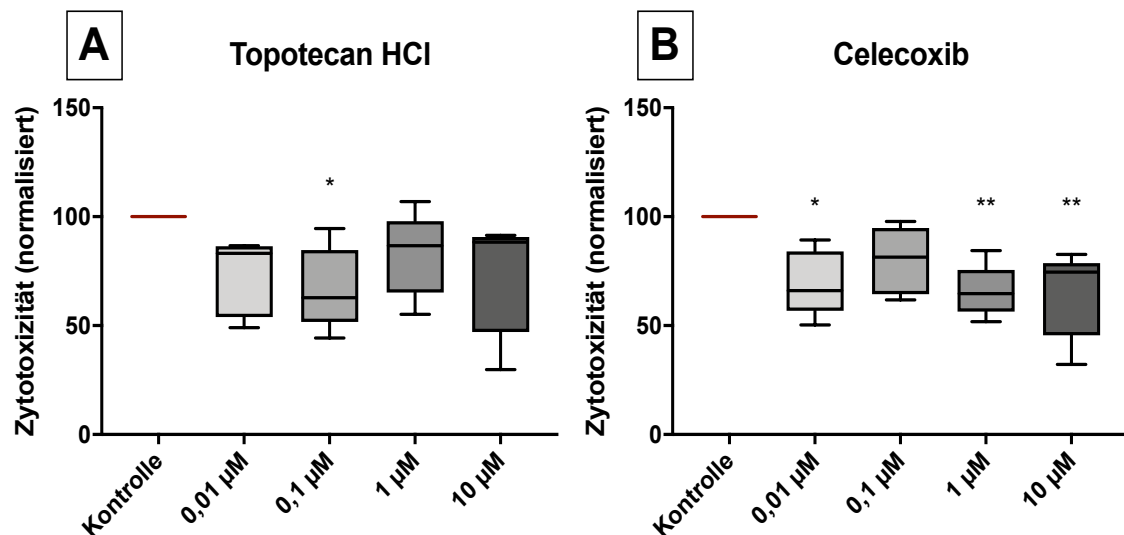


**Abb. 3.7.1.: 12 Substanzen zeigen einen signifikant zytotoxischen Effekt.**

Zur Analyse der Substanzen auf ihre zytotoxischen Effekte bei B-Zellen wurde ein LDH-Zytotoxizitätsassay durchgeführt. Humane B-Lymphozyten wurden aus dem Blut isoliert, stimuliert (IL-21 (100 ng/ml), aCD40Ab (1 µg/ml)) und über Nacht in Anwesenheit der Substanzen (Konzentrationen 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM, 10 µM)

inkubiert. Folgende Substanzen wurden graphisch dargestellt: **A** PHA-665752, **B** YM115, **C** Doxorubicin, **D** CP 673451, **E** H 89 2HCl, **F** Clemastinfumarat, **G** SB 743921, **H** CHIR-124, **I** JTC-801, **J** PRT062607 HCl, **K** ABT-199 und **L** Stattic. Die Daten wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) mit multiplem Vergleichstest nach Dunnett analysiert und in Bezug auf die Positivkontrolle (stim. Zellen) normalisiert. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ , \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ .  $n=4$ .

Für zwei der analysierten Substanzen konnte gezeigt werden, dass sie zytoprotektiv wirken. Der Effekt wurde in der Konzentration 0,1  $\mu\text{M}$  für Topotecan HCl und für die Konzentrationen 0,01  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  für Celecoxib nachgewiesen (s. Abb. 3.7.2.). Die restlichen dreizehn Substanzen zeigten weder einen signifikant zytotoxischen noch einen zytoprotektiven Effekt (s. Tab. 7.9.).



**Abb. 3.7.2.: Zwei Substanzen zeigen einen zytoprotektiven Effekt**

Zur Analyse der Substanzen auf ihre zytotoxischen Effekte in vier verschiedenen Konzentrationen (0,01  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ) wurde ein LDH-Zytotoxizitätsassay durchgeführt. Humane B-Lymphozyten wurden aus dem Blut isoliert, stimuliert (IL-21 (100 ng/ml), aCD40Ab (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )) und über Nacht inkubiert. Folgende Substanzen wurden graphisch dargestellt: **A** Topotecan HCl und **B** Celecoxib. Die Daten wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) mit multiplem Vergleichstest nach Dunnett analysiert und in Bezug auf die Positivkontrolle (stim. Zellen). \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ .  $n=4$ .

#### 4. Diskussion

Die Glykosylierung von Antikörpern und deren Modifikation hat maßgeblich Einfluss auf ihre Effektorfunktion und äußert sich in einer modulierten Immunantwort (18). Die Relevanz der Glykosylierung wird im Zusammenhang mit der Entstehung von Krankheit deutlich, denn die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen, Infektionen und Krebserkrankungen korreliert mit Veränderungen im Glykosylierungsmuster, wie dem Verlust von Galaktosylierung und Sialylierung und einer daraus resultierenden Aktivierung des Immunsystems (18,102). Es gilt daher, neue Zielstrukturen zu identifizieren und Therapieoptionen zu entwickeln, die in der Lage sind das Glykosylierungsmuster spezifisch zu modifizieren, bei gleichzeitigem Ausbleiben von Nebenwirkungen.

In einem bereits durchgeführten Projekt von Sirka Marie Sinnecker wurde ein Substanzscreening der Cherry Pick Library von Selleck Chemicals mit 131 Substanzen durchgeführt, um deren Effekte auf die Expression der Glykosyltransferasen B4Galt1 und St6Gal1 zu untersuchen. Es erfolgte eine B-Zell-Isolation mit humanen B-Lymphozyten und deren Stimulation mit Interleukin-21 (100 µg/ml dest. Wasser) und Anti-CD40 (1 µg/ml dest. Wasser). Es wurden 27 Substanzen positiv validiert, welche im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Fähigkeit hin, aktivierend oder hemmend auf die Expression der beiden Glykosyltransferasen B4Galt1 und/oder St6Gal1 bei vier verschiedenen B-Zellsubtypen zu wirken, untersucht wurden. Hierbei wurden die Substanzen in Bezug auf ihre Dosisabhängigkeit und ihre zytotoxischen Fähigkeiten analysiert. Diese Methode ermöglicht es gezielt zu der Identifikation neuer Zielstrukturen und der Entwicklung neuer Therapieoptionen beizutragen, da die Wirkungsmechanismen der Substanzen und deren Nebenwirkungspotenzial bekannt sind. Es ist eine kostengünstige Methode neue Wirkspektren der Substanzen, in Bezug auf ihre Fähigkeit das Glykosylierungsmuster zu modifizieren, zu identifizieren. Es wurden neun Substanzen validiert, welche einen signifikanten Effekt auf die Expression von B4Galt1 und/oder St6Gal1 zeigten bei gleichzeitigem Ausbleiben einer Zellschädigung (s. Tab. 4.1.).

Name	Biologische Aktivität	IC50 in nM	B4Galt1				St6Gal1				Zytotoxizität
			CD19+	CD19+ IgD+	CD19+ CD27+	CD19+ CD38+	CD19+	CD19+ IgD+	CD19+ CD27+	CD19+ CD38+	
PHA-665752	c-Met Inhibitor	9									
YM115	Survinin Inhibitor	0,54									
Barasertib	Auror kinase B Inhibitor	0,37									
Doxorubicin	Interkalation, Topoisomerase II Inhibitor	0,06									
Topotecan HCl	Topoisomerase I Inhibitor	2									
Celecoxib	COX-2 Inhibitor	40									
BX-795	PDK-1 Inhibitor	6									
Doxazosin mesylate	α1-Adrenozeptor-Antagonist	5									
Etomidat	Hypnotikum	400000									
SB 525334	TGF-β-Rezeptor Inhibitor	14,3									
Tadalafil	Phosphodiesterase-5 Inhibitor	1,8									
CP 673451	PDGF-Rezeptor-α/β Inhibitor	1									
BIRB 796	p38 MAP-Kinase Inhibitor	38									
Tie2 kinase inhibitor	Tie2 Kinase Inhibitor	0,25									
H 89 2HCl	PKA Inhibitor	48									
Allopurinol	Xanthinoxidase Inhibitor	7,82									
Enalaprilat	ACE Inhibitor	1,94									
Clemastinfumarat	H1-Rezeptor Antagonist	3									
PCI-34051	HDAC8 Inhibitor	10									
SB 743921	KSP Inhibitor	0,1									
Aliskiren hemifumarat	Renin Inhibitor	1,5									
Xylazin HCl	α2-Adrenozeptor-Agonist	9									
CHIR-124	Chk1 Inhibitor	0,3									
JTC-801	Nociceptin-Rezeptor-Antagonist	94									
Stattic	STAT3 Inhibitor	5100									
PRT062607 HCl	SYK Inhibitor	1									
ABT-199	Bcl-2 Inhibitor	10									

Hemmende Substanz		Aktivierende Substanz		Zytoprotektiv		Zytotoxisch	
10 µM		10 µM		10 µM		10 µM	
1 µM		1 µM		1 µM		1 µM	
0,1 µM		0,1 µM		0,1 µM		0,1 µM	
0,01 µM		0,01 µM		0,01 µM		0,01 µM	

aktivierend und hemmend    keine Daten vorhanden

**Tab. 4.1.: Übersichtstabelle der Ergebnisse der Dosisabhängigkeitsprüfung und der Zytotoxizitätstestung.**

Darstellung der Ergebnisse der Dosisabhängigkeitsprüfung und der Zytotoxizitätstestung für die 27 getesteten Substanzen. Die Abbildung beinhaltet die biologische Aktivität und den IC50-Wert in nM der Substanzen. Die Farbcodierung (Legende siehe oben) der Ergebnisse der Expression von B4Galt1 und St6Gal1 bei den vier B-Zellsubtypen, sowie der Zytotoxizität bezieht sich auf die Konzentration, bei der das erste signifikante Ergebnis erzielt wurde. Neun Substanzen zeigten einen signifikanten Effekt auf die Expression von B4Galt1 und/oder St6Gal1 in einer der B-Zellsubtypen (CD19<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>) und erwies sich als nicht zytotoxisch. Folglich wurden die Substanzen als positiv validiert.

Die Daten wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) mit multiplem Vergleichstest nach Dunnett analysiert und in Bezug auf die Positivkontrolle normalisiert.

Von den insgesamt neun positiv validierten Substanzen zeigten vier Substanzen einen aktivierenden Effekt und fünf Substanzen einen hemmenden Effekt auf die Expression von B4Galt1 und/oder St6Gal1 bei unterschiedlichen B-Zellsubklassen. Es sind meines Wissens nach bisher keine Studienergebnisse bekannt, welche die hier untersuchten Substanzen in



Bezug auf eine Beeinflussung der Glykosylierung und damit auf die Effektorfunktion der Antikörper, untersucht haben. Auf Grundlage der bekannten Studienergebnisse zu den immunmodulatorischen Fähigkeiten der getesteten Substanzen werden im Folgenden ihre Fähigkeit, das Glykosylierungsmuster zu beeinflussen, diskutiert.

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass **Etomidat** einen signifikant aktivierenden Effekt auf die Expression von St6Gal1 bei CD19<sup>+</sup> Zellen hat. Die Daten bestätigen damit die Ergebnisse von Sirka Marie Sinnecker, wobei Etomidat ebenfalls einen aktivierenden Effekt auf die Expression von St6Gal1 bei CD19<sup>+</sup> Zellen zeigte, jedoch ebenfalls für die Expression von B4Gal1 bei CD19<sup>+</sup> Zellen. Dies ließ sich jedoch nicht bestätigen. Es gilt jedoch zu berücksichtigen, dass nur in der geringsten Konzentration von 0,01 µM ein signifikantes Ergebnis für die Expression von St6Gal1 bei CD19<sup>+</sup> Zellen erzielt wurde und der p-Wert mit  $p=0,0163$  als hoch zu erachten ist. Ein fehlerhaftes Ergebnis oder ein schlechtes Ansprechen der Wirkung der Substanz könnte ursächlich sein. Zudem liegt der IC50-Wert von Etomidat mit 400 nM deutlich über den maximal verwendeten 10 µM, weshalb die verwendete Dosis als zu gering zu bewerten ist und fraglich ist, ob Etomidat ursächlich für die Effekte auf die Expression von St6Gal1 ist.

Etomidat wirkt als GABA-A-Rezeptor-Agonist und ist ein Hypnotikum, welches in der Anästhesiologie als Injektionsanästhetikum zur Narkoseeinleitung verwendet wird (103). Die klinische Verwendung von Etomidat zeigt Nebenwirkungen im Bereich des Respirationstraktes, des Zentralnervensystems und des Endokrinen Systems (104–106). Etomidat hat Einfluss auf die Zellen des Immunsystems, wobei vor allem die Zytokinproduktion von TNF- $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-6 und Interleukin-10 beeinflusst wird (107,108). Zudem hemmt Etomidat die Translokation des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, wodurch die NF- $\kappa$ B-induzierte proinflammatorische Zytokinproduktion in Lymphozyten reduziert wird (109). Darüber hinaus zeigen Studien, dass das Zusammenspiel aus Glukokortikoiden und NF- $\kappa$ B zu einer Hemmung der Aktivierung von NF- $\kappa$ B führen (110). Des Weiteren stimuliert Etomidat die Apoptose von B-Lymphozyten, wodurch die Immunantwort unterdrückt wird (111). Etomidat zeigte sich jedoch in den hier vorgestellten Versuchen nicht als zytotoxisch. Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte ein Unterschied in der verwendeten Konzentration sein.

Auf Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit kann man vermuten, dass Etomidat einen antiinflammatorischen Effekt auf die Immunantwort durch Beeinflussung der Zytokinproduktion ausübt. Demgegenüber stehen die Forschungsergebnisse, welche zu dem Schluss kommen, dass durch Etomidat die Aktivierung von NF- $\kappa$ B gehemmt und die Apoptose der B-Lymphozyten induziert wird (109,111). Eine gestörte Aktivierung von NF- $\kappa$ B beeinträchtigt die B-Zelldifferenzierung und -proliferation, wodurch die B-Zellreifung und die Antikörperdifferenzierung gestört wird (112). Weitere Untersuchungen, hinsichtlich der genauen Wirksamkeit von Etomidat auf die Immunantwort und inwieweit Etomidat für die Modulierung des Glykosylierungsmusters genutzt werden kann, sollten hier Klarheit verschaffen.

Eine weitere untersuchte Substanz ist der Histondeacetylase 8 Inhibitor **PCI-34051**. PCI-34051 greift in die Transkription und den Zellzyklus ein und wirkt somit entzündungshemmend und proapoptotisch (113). Die proapoptotische Wirkung zeigte sich in Studien zur Behandlung von T-Zelllymphomen, wobei PCI-34051 die intrazelluläre Kalzium-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum verursacht. Als Folge dessen kommt es zur Cytochrom c Freisetzung aus den Mitochondrien und die Einleitung der Apoptose erfolgt. Der proapoptotische Effekt konnte jedoch nicht für B-Zellen und Plasmazellen nachgewiesen werden (113). Dies deckt sich mit den Ergebnissen der hier durchgeführten Studie, wonach PCI-34051 sich weder als zytotoxisch noch als zytoprotektiv erwies. Das zytotoxische Verhalten von PCI-34051 bei der Behandlung von T-Zelllymphomen könnte aufgrund von einer höheren verwendeten Konzentration erklärbar sein. Zudem wären fehlende Signalwege in den B-Zellen und Plasmazellen denkbar, sodass PCI-34051 nicht zytotoxisch wirksam sein konnte. Studien diskutieren hier, dass verschiedene Isoformen der Phospholipase  $C\gamma 1$  (PLC $\gamma 1$ ) Grund für die fehlende Apoptoseinduktion in B-Zellen in Frage kommen (113). Das PCI-34051 auch zur Therapie für Autoimmunerkrankungen in Frage kommt, zeigte sich in einem murinen Versuch zur Therapie von Asthma. Hier wurde PCI-34051 als Inhibitor für die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-6, TNF- $\alpha$ ) in LPS-stimulierten PBMCs und isolierten Monozyten identifiziert (114).

Die Versuche dieser Studie ergaben, dass PCI-34051 einen aktivierenden Effekt auf die Expression der Sialyltransferase St6Gal1 bei CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> Zellen bei einer Konzentration von

0,01  $\mu\text{M}$  aufweist. Das Auftreten eines Effektes bei nur einer Konzentration, bei gleichzeitigem hohem p-Wert ( $p=0,0429$ ), spricht für ein fehlerhaftes Ergebnis. Ob PCI-34051 einen aktivierenden Effekt auf die Expressionssteigerung der Glykosyltransferase verursacht und durch die Expressionssteigerung der Sialyltransferase eine antiinflammatorische Wirkung entfaltet sollte in weiteren Versuchen geklärt werden.

Auch **Aliskiren hemifumarat** erwies sich als expressionssteigernd auf B4Galt1 bei CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> Zellen in der Konzentration 1  $\mu\text{M}$ . Aliskiren hemifumarat ist ein Renininhibitor, der in das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) eingreift und die Umwandlung von Angiotensinogen zu Angiotensin I verhindert. Folglich ist die Plasmareninaktivität reduziert (115). Klinische Anwendung findet der Renininhibitor in der Blutdrucktherapie (116).

Darüber hinaus belegen mehrere Studien, dass Aliskiren hemifumarat eine antiinflammatorische Effektorfunktion durch die Hemmung von Entzündungsmarkern aufweist. Hierbei stehen vor allem das Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1 (MCP-1), Interleukin-17, das hochsensitive C-reaktive Protein (hs-CRP), die NF- $\kappa$ B-Expression und die TNF- $\alpha$ -induzierte Gewebefaktorexpression im Vordergrund (117–121). Des Weiteren beeinflusst Aliskiren hemifumarat das Komplementsystem, indem es die Spaltung des Komplementfaktors C3 in C3a und C3b blockiert und somit antiinflammatorisch wirkt (122). Ebenfalls antiinflammatorisch zeigt sich Aliskiren hemifumarat in einer Studie, bei der die Hemmung der TNF- $\alpha$  induzierten Stimulation des Gerinnungsweges in humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene analysiert wurden (120).

Die Wirkung des Renin Inhibitors auf die Expression der Galaktosyltransferase B4Galt1 könnte somit einen zusätzlichen Effekt eines antiinflammatorischen Wirkmechanismus von Aliskiren hemifumarat darstellen. Widersprüchlich erweist sich hier jedoch die Hemmung des NF- $\kappa$ B-Signalweges, wodurch die B-Zelldifferenzierung beeinflusst wird. Zudem ist kritisch zu beurteilen, dass Aliskiren hemifumarat in nur einer Konzentration, bei gleichzeitig hohem p-Wert ( $p=0,0115$ ), wirksam ist.

Ebenfalls wurde die Wirkung von **SB 525334** auf die Expression der Glykosyltransferasen untersucht. Der TGF $\beta$ 1 Rezeptor Inhibitor führt zu einer Expressionssteigerung von B4Galt1 in CD19<sup>+</sup> Zellen. Während eine Expressionssteigerung der Galaktosyltransferase B4Galt1 durch SB 525334 in der Literatur nicht bekannt ist, zeigen Studienergebnisse, dass der

Wachstumsfaktor TGF $\beta$ 1 die Expression der Sialyltransferase St6Gal1 verstärkt. In einem Versuch mit humanen Endometriumzellen führte eine zweitägige Stimulation mit TGF $\beta$ 1 (10  $\mu$ g/ml) zu einer Expressionssteigerung der Sialyltransferase St6Gal1, wodurch die Adhäsion der Endometriumzellen verstärkt wurde. Die Expression von St6Gal1 wurde wie in der hier vorgestellten Studie mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Glykosylierung wurde nicht untersucht (123). Es ist daher anzunehmen, dass durch den Einsatz von SB 525334 die Expression von St6Gal1 runter reguliert wird. Dies ließ sich jedoch in den hier durchgeführten Versuchen nicht bestätigen. Darüber hinaus ist auch SB 525334 nur in einer Konzentration (0,1  $\mu$ M) wirksam und weist einen hohen p-Wert (p=0,0428) auf, weshalb das Ergebnis ebenfalls kritisch zu beurteilen ist.

Das Signalmolekül TGF $\beta$ 1 ist an vielen zellulären Prozessen der B-Zellen beteiligt, wobei das Zellwachstum und die Proliferation gehemmt und die Apoptose verstärkt wird. Durch Inhibierung des TGF $\beta$ 1 Rezeptors wird somit das Überleben und die Differenzierung der B-Zelle gestärkt (124). Die Inhibierung des TGF $\beta$ 1 Rezeptors kann daher als Grundlage dienen Glykosylierung von Antikörpern überhaupt zu ermöglichen. Demgegenüber stehen die hier vorgestellten Studienergebnisse, wonach sich ein zytoprotektiver Effekt für SB 525334 nicht nachweisen ließ. Es bedarf daher weiterer Studien, um die stimulatorische Wirkung der Inhibierung des TGF $\beta$ 1 Rezeptors auf die Glykosylierung zu analysieren.

**Barasertib (AZD1152-HQPA)** ist ein Aurorakinase B Inhibitor, welcher durch seine antineoplastische Funktion in der Krebstherapie zum Einsatz kommt (125–127). Die Hemmung der Serin-Threonin-Kinase hat Auswirkungen auf den Zellzyklus, wobei die Mitose und die Zytokinese gestört werden (128). Als Folge dessen wird die Zellteilung und -proliferation behindert und die Apoptose eingeleitet (129). Einen zytotoxischen Effekt konnte in der Studie jedoch nicht nachgewiesen werden, was an einer zu niedrigen Dosierung von Barasertib liegen könnte. Der Aurorakinase B Inhibitor hat einen hemmenden Effekt auf die Expression von B4Gal1 und St6Gal1 bei CD19<sup>+</sup> und CD27<sup>+</sup> Zellen sowie zusätzlich auf die Expression von B4Gal1 bei CD38<sup>+</sup> Zellen. Jedoch gilt es zu berücksichtigen, dass eine Hemmung der Glykosyltransferasen ebenfalls durch eine Störung der Zelldifferenzierung und -proliferation sowie der Apoptose von B-Lymphozyten durch Wirkung von Barasertib auf die B-Zellentwicklung entstehen kann. Dem steht jedoch gegenüber, dass eine Reduktion der Zellzahl bei Gabe von Barasertib im Vergleich zu den

Kontrollen ohne Zugabe von Barasertib nicht zu beobachten ist. Es bedarf daher weiterer Studien, um den Wirkmechanismus von Barasertib auf die B-Zellentwicklung zu klären.

Ein weiteres Chemotherapeutikum ist der Topoisomerase I Inhibitor **Topotecan HCl**, welcher sich durch seine zytotoxische Effektorfunktion durch Eingriff in die DNA-Replikation auszeichnet. Es stabilisiert die kovalenten Bindungen zwischen der Topoisomerase I und der DNA und führt somit zum Funktionsverlust des Enzyms. Es resultieren DNA-Strangbrüche und als Folge dessen wird die Apoptose eingeleitet (130). Einen proapoptotischen Effekt hat Topotecan HCl zudem durch seinen hemmenden Effekt auf die Aktivierung des antiapoptotischen Akt-Signalweges (131). Die hier durchgeführten Versuche können einen zytotoxischen Effekt von Topotecan HCl nicht nachweisen, stattdessen zeigte sich ein zytoprotektiver Effekt. Ursächlich für die Unterschiede im zytotoxischen Verhalten, könnten Unterschiede in den verwendeten Konzentrationen der Studien sein. Weitere Studien zeigen, dass die Topoisomerase I die Transkription von proinflammatorischen Genen aktiviert. Durch den Einsatz von Topotecan HCl wird jedoch die IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  induzierte proinflammatorische Genexpression gehemmt und eine Immunreaktion unterdrückt (132). Des Weiteren weist Topotecan HCl einen inhibitorischen Effekt auf den NF- $\kappa$ B-Signalweg auf (133). Die Versuchsergebnisse zeigen einen hemmenden Effekt auf die Galaktosyltransferase B4Galt1 bei CD19<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> Zellen sowie für die Sialyltransferase St6Gal1 für CD19<sup>+</sup> Zellen. Ursächlich für die Hemmung der Glykosyltransferasen ist neben dem direkten Effekt durch Topotecan HCl auch der inhibitorische Effekt auf den NF- $\kappa$ B-Signalweg denkbar, wodurch die B-Zelldifferenzierung und -proliferation verhindert wird und als Folge dessen die Expression der Glykosyltransferasen gehemmt wird.

Ebenfalls wurde die Wirkung des PDK1 Inhibitors **BX-795** auf die Expression der Glykosyltransferasen untersucht. Es zeigte sich eine Hemmung der Expression von B4Galt1 bei CD19<sup>+</sup> Zellen. BX-795 hemmt die Aktivität der 3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase-1 (PDK1) durch die Blockierung der Phosphorylierung der Kinasen S6K1, Akt, PKC $\sigma$  und GSK3 $\beta$  (134). Die PDK1 ist ein wichtiges Enzym im PI-3-Kinase-Signalweg und dient der Rekrutierung und Aktivierung weiterer Signalwege. Besonderen Einfluss hat die PDK1 auf die Regulation der B-Zell-Proliferation und -Differenzierung, den

Antikörperwechsel und die Bildung von B-Gedächtniszellen (135,136). Des Weiteren inhibiert BX-795 die Kinasen TBK1 und IKK $\epsilon$  wodurch die Signalwege der Toll-like-Rezeptoren und von NF- $\kappa$ B gehemmt werden (137). Durch den Einsatz von BX-795 wird daher der Zellzyklus und die Entwicklung der B-Zellen stark beeinflusst. Es kommt zur verstärkten Einleitung der Apoptose von Pro-B-Zellen und der Blockierung der B-Zellreifung (135). Demgegenüber steht das Ergebnis der Zytotoxizitätstestung dieser Studie, wonach BX-795 sich nicht zytotoxisch in den getesteten Konzentrationen verhält. Die vorgestellte Studie hat BX-795 in einer Konzentration von 1  $\mu$ M im Rahmen eines murinen Versuchsmodells verwendet und die Daten ebenfalls mittels Durchflusszytometrie analysiert (137). Trotz 10-fach höherer verwendeter Konzentration von BX-795 in der hier durchgeführten Studie ist der analysierte Effekt der Zytotoxizität verschieden. Ursächlich könnten hier Signalwege sein, welche sich zwischen murinem und humanem Modell unterscheiden. Darüber hinaus ist der Einfluss von BX-795 auf die B-Zellentwicklung möglicherweise eine Erklärung für eine reduzierte Expression von B4Gal1 bei CD19<sup>+</sup> Zellen. Weitere Studien sind notwendig um den Einfluss von BX-795 auf die B-Zellentwicklung und deren mögliche Folgen für die Expression der Glykosyltransferasen zu klären.

Eine weitere Substanz mit Einfluss auf die Differenzierung, das Wachstum und die Apoptose von Zellen ist der p38 MAP-Kinase Inhibitor **BIRB 796 (Doramapimod)** (138,139). BIRB 796 wird durch entzündungsfördernde und stressbedingte Reize aktiviert und spielt eine wichtige regulatorische Rolle bei der Produktion von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen, wie beispielsweise TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-10 (140,141). Zudem haben p38 MAP-Kinasen als Teil des B-Zellrezeptors Einfluss auf dessen Signalkaskade (142). BIRB 796 zeigte sich vielversprechend zur Therapie von Autoimmunerkrankungen in präklinischen Studien. Es wurden daher mehrere klinische Studien mit p38 MAPK-Inhibitoren zur Therapie von Autoimmunerkrankungen wie der Rheumatoide Arthritis, Psoriasis und Morbus Crohn durchgeführt, wobei sich lediglich erfolgreich neue Zielstrukturen und Therapieoptionen für die Rheumatoide Arthritis identifizieren ließen (142–144). Ein limitierender Faktor stellte bei den Versuchen die Lebertoxizität dar, sowie zu niedrige Konzentrationen der getesteten Substanz (143,145).

BIRB 796 zeigte in dieser Studie einen hemmenden Effekt auf die Expression von B4Gal1 bei CD19<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> Zellen sowie von St6Gal1 bei CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> Zellen.

Die Wirksamkeit auf die Expression von St6Gal1 bei CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> Zellen ist kritisch zu beurteilen, da zwar in der höchsten Konzentration (10 µM) ein signifikantes Ergebnis erzielt wurde, jedoch mit sehr hohem p-Wert (p=0,0439).

In weiteren Studien sollte geklärt werden, inwieweit die Wirkmechanismen auf die Zytokinproduktion von BIRB 796 das Expressionsverhalten der Glykosyltransferasen beeinflussen und welche Folgen BIRB 796 für die Glykosylierung hat. Zudem sollte analysiert werden, ob BIRB 796 die Hemmung der Expression der Glykosyltransferasen direkt verursacht oder der Einfluss von BIRB 796 auf die B-Zellentwicklung eine Veränderung im Expressionsverhalten verursachen.

Einen hemmenden Effekt auf die Expression der Galaktosyltransferase B4Galt1 zeigte zudem der **Tie2 Kinase Inhibitor**. Tie2 ist ein Angiopoietin-1 Rezeptor, durch dessen Bindung die NF-κB-Aktivierung blockiert wird. Als Folge dessen wird eine Entzündungsreaktion unterdrückt (146). Das Substanzscreening von Sirka Marie Sinnecker hat bereits die Effekte eines NF-κB-Inhibitors unter Verwendung von Natrium 4-Aminosalicylat auf die Expression der Glykosyltransferasen untersucht. Hier konnten weder für B4Galt1 noch für St6Gal1 signifikant hemmende oder aktivierende Ergebnisse gezeigt werden. Zudem sind in der Literatur meines Wissens nach keine Ergebnisse bekannt, welche den Einfluss von NF-κB auf die Glykosylierung beschreiben. Es ist daher davon auszugehen, dass die in dieser Studie erzielten Ergebnisse nicht auf einer direkten Hemmung der Galaktosyltransferase durch den Tie2 Kinase Inhibitor beruhen, sondern die Blockierung des NF-κB-Signalweges zu einer Beeinflussung der B-Zellentwicklung führt und somit indirekt die Expression des Enzyms reguliert. Es bedarf weiterer Studien, um die Effektorfunktion des Tie2 Kinase Inhibitors auf die Glykosylierung besser abschätzen zu können.

#### **4.1. Methodenkritik**

Die hier dargestellten Versuche unterliegen Limitationen, welche es zu berücksichtigen gilt. Die verwendeten chemischen Substanzen, welche als Inhibitoren, Antagonisten, sowie Agonisten wirken, zeichnen sich durch eine hohe Selektivität der Zielmoleküle aus. Trotz der hohen Selektivität sind Nebeneffekte nicht auszuschließen. Als Folge dessen ist die

Aktivierung anderer Signalkaskaden und das Auftreten von unbekanntem Effektorfunktionen möglich. Beispielsweise zeigte BX-795 neben seiner Fähigkeit als PDK1 Inhibitor inhibitorische Effekte auf den JNK/p38 MAP-Kinaseweg, die bei der Hemmung der Herpes-simplex-Virus (HSV)-Replikation zum Einsatz kommen (147).

Zudem ist anzumerken, dass die statistisch verwendbare Versuchszahl mit einem minimalen  $n=2$  recht klein ist und für die verschiedenen Subpopulationen variiert. Für eine bessere statistische Auswertung wäre daher eine Wiederholung der Versuchsreihe mit einer größeren Probandengruppe und einer gleichen Versuchsanzahl für die verschiedenen Subpopulationen sinnvoll. Dabei wäre es zudem ratsam, gleich viele Frauen wie Männer als Probanden in die Studie aufzunehmen, um einen möglichen Einfluss von Geschlechterunterschieden auszuschließen und eine statistische Variabilität zu ermöglichen.

Darüber hinaus sind die Versuchsergebnisse unter Berücksichtigung einer Reinheit von  $\geq 85\%$  zu bewerten. Zudem kann die verwendete Stimulation (Interleukin-21 (100ng/ml) und Anti-hCD40 Antikörper (1  $\mu\text{g/ml}$ )) die B-Zellreifung beeinflussen und unerwünschte Effekte verursachen. Eine Versuchsreihe mit anderen B-Zellstimulatoren ist daher als Folgeversuch notwendig, um mögliche Stimulationseffekte auszuschließen. Hierbei würde der gleiche Versuchsaufbau mit den gleichen Substanzen, in den vier getesteten Konzentrationen, bestehen bleiben. Somit kann überprüft werden, dass der Effekt auf die Expression der Glykosyltransferasen substanz- und nicht stimulationsabhängig ist.

Ebenfalls gilt es zu berücksichtigen, dass für die verwendeten Substanzen Effekt auf die Proliferation und Differenzierung der B-Lymphozyten bekannt sind. Hierbei steht vor allem die Beeinflussung des NF- $\kappa$ B-Signalweges im Vordergrund. Im Rahmen der Versuche sind reduzierte Zellzahlen der B-Zellsubpopulationen, insbesondere der CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> Zellen, auffällig. Weitere Versuche sollten auch hier klären, ob es substanz- oder stimulationsabhängig zu einer Zellzahlreduktion der einzelnen B-Zellsubpopulationen kommt.

Limitierende Faktoren bei der Beurteilung der Ergebnisse stellen zudem die richtige Wahl des Messzeitpunktes der Expression der Glykosyltransferasen dar, sowie die Halbwertszeit



der Substanzen. Im Zeitverlauf kommt es zu einer Abnahme der Expression der Glkosaltransferasen und eine Reduktion der Substanzmenge ist möglich, weshalb fälschlicherweise hemmende Effekte der Substanzen analysiert werden können. Es sollten daher Versuche zu unterschiedlichen Zeitpunkten und eine Substanztestung mit Bestimmung der Halbwertszeit erfolgen.

Insbesondere ist anzumerken, dass die Versuche nicht den Glykosylierungsstatus untersucht haben. Somit ist es nicht möglich eine Aussage über die Effekte der Expressionssteigerung- und/oder -hemmung auf die Modifikation des Glykosylierungsmusters zu tätigen.

#### **4.2. Ausblick**

Die Glykosylierung von Antikörpern ist ein wichtiger immunmodulatorischer Faktor und gilt als Zielstruktur für die Entwicklung neuer Therapieoptionen von Autoimmunerkrankungen, Infektionen und Krebserkrankungen (18,56). Auf Grundlage der Versuchsergebnisse dieser Studie sollten daher weitere Versuche erfolgen, um eine oder mehrere Substanzen zu identifizieren, die das Glykosylierungsmuster gezielt modifizieren. Die positiv validierten neun Substanzen, die einen signifikant hemmenden und/oder aktivierenden Effekt auf die Expression der Glykosyltransferasen B4Gal1 und St6Gal1 zeigen, sollten in einem weiteren Versuch, nach dem gleichen Versuchsaufbau unter einer anderen Stimulation und über einen längeren Zeitraum, getestet werden. So lassen sich stimulationsbedingte Effekte wiederlegen und die Auswirkungen der Substanzen über einen längeren Wirkungszeitraum abschätzen. Zudem sollte die Menge der Antikörper analysiert werden, um die Effekte der Substanzen auf die B-Zellentwicklung und die Antikörperproduktion zu ermitteln. Ebenfalls gilt es den Glykosylierungsstatus zu untersuchen, um die Effekte der Expressionssteigerung oder -hemmung der Glykosyltransferasen zu beurteilen. In einem weiteren Schritt kommen dann experimentelle Versuche an immunisierten Tieren in Frage. Zeigen die tierexperimentellen Versuche signifikante Ergebnisse in Bezug auf die Glykosylierung, bei Ausbleiben von toxischen Effekten und anderen Nebenwirkungen, so ist der Versuch an gesunden Probanden denkbar. In einem letzten Schritt wäre eine klinische Studie an einem Patientenkollektiv, die an einer Autoimmunerkrankung, einer Infektion oder einer Krebserkrankung leiden, möglich.

## 5. Zusammenfassung

Das erworbene Immunsystem spielt eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Krankheitserregern. Eine wichtige Komponente des erworbenen Immunsystems sind die B-Lymphozyten, aus welchen die Plasmazellen hervorgehen und Antikörper sezernieren. Antikörper sind Glykoproteine, welche sich in ihren Subklassen und ihrem Glykosylierungsmuster unterscheiden. Veränderungen im Glykosylierungsmuster werden im Zuge von Autoimmunerkrankungen, Infektionen und onkologischen Erkrankungen beobachtet. Antikörper binden abhängig vom Glykosylierungsstatus mit Galaktose- und Sialinsäuremolekülen an inhibierende oder aktivierende Fc-Rezeptoren, wodurch die Effektorfunktion der Antikörper und damit die Immunantwort beeinflusst wird. Es zeigt sich, dass Galaktose- und Sialinsäure-reiche Immunkomplexe eine antiinflammatorische Wirkung haben, während Galaktose- und Sialinsäure-arme Immunkomplexe sich durch eine proinflammatorische Effektorfunktion auszeichnen. Für die Modifikation der Antikörper sind die Glykosyltransferasen B4Galt1 und St6Gal1 notwendig.

Basierend auf einem Substanzscreening der Target Selective Inhibitory Library von Selleck Chemicals wurde die Expression der Glykosyltransferasen B4Galt1 und St6Gal1 unter Einfluss von 27 Substanzen mittels einer Dosisabhängigkeitsprüfung analysiert, eine Zytotoxizitätsprüfung durchgeführt und IgM- und IgG-Konzentrationen gemessen. Für die Versuche wurden humane B-Lymphozyten aus dem Blut isoliert und mit Interleukin-21 und Anti-hCD40 Antikörper stimuliert. Es wurden neun Substanzen positiv validiert: Etomidat, PCI-34051, SB 525334 und Aliskiren hemifumarat wirkten expressionssteigernd, während Barasertib, Topotecan HCl, BX-795, BIRB 796 und der Tie2 Kinase Inhibitor expressionshemmend auf die Glykosyltransferasen wirkten.

Die Versuchsergebnisse dieser Arbeit dienen als Grundlage für weitere Forschung an der Therapieentwicklung von Autoimmunerkrankungen, Infektionen und Krebserkrankungen. Es sind weitere Versuche notwendig, um die validierten Substanzen auf ihre Wirksamkeit zur Modifizierung des Glykosylierungsmusters zu prüfen.

## Literaturverzeichnis

1. Murphy KM: Effektormechanismen der Immunität. In: Murphy KM, Weaver C (Hrsg.): Janeway Immunologie. 9. Aufl., 31-41, Springer Spektrum, Berlin, 2018
2. Sedlacek HH: Die unterschiedlichen Abwehrsysteme. In: Sedlacek HH (Hrsg.): Immunologie - die Immunabwehr des Menschen. 2. Aufl., 1-4, De Gruyter, Berlin/Boston, 2014
3. Campbell NA, Reece JB: Erkennung und Abwehr. In: Campbell NA, Reece JB, Urry LA, Cain ML, Wasserman SA, Minorsky PV, Jackson RB (Hrsg.): Campbell Biologie. 10. Aufl., 1271, Pearson Studium, Hallbergmoos, 2016
4. Murphy KM: Anatomische Barrieren und erste chemische Abwehrmechanismen. In: Murphy KM, Weaver C (Hrsg.): Janeway Immunologie. 9. Aufl., 49-60, Springer Spektrum, Berlin, 2018
5. Murphy KM: Grundlagen der angeborenen Immunität. In: Murphy KM, Weaver C (Hrsg.): Janeway Immunologie. 9. Aufl., 7-16, Springer Spektrum, Berlin, 2018
6. Murphy KM: Induzierte angeborene Reaktionen auf eine Infektion. In: Murphy KM, Weaver C (Hrsg.): Janeway Immunologie. 9. Aufl., 131-162, Springer Spektrum, Berlin, 2018
7. Murphy KM: Das Komplementsystem und die angeborene Immunität. In: Murphy KM, Weaver C (Hrsg.): Janeway Immunologie. 9. Aufl., 60-87, Springer Spektrum, Berlin, 2018
8. Murphy KM: Grundlagen der adaptiven Immunität. In: Murphy KM, Weaver C (Hrsg.): Janeway Immunologie. 9. Aufl., 16-31, Springer Spektrum, Berlin, 2018
9. Murphy KM: Die T-Zell-vermittelte Immunität. In: Murphy KM, Weaver C (Hrsg.): Janeway Immunologie. 9. Aufl., 444-504, Springer Spektrum, Berlin, 2018
10. Campbell NA, Reece JB: Adaptive Immunität und die Abwehr von Infektionen in Körperzellen und Körperflüssigkeiten. In: Campbell NA, Reece JB, Urry LA, Cain ML, Wasserman SA, Minorsky PV, Jackson RB (Hrsg.): Campbell Biologie. 10. Aufl., 1284-1289, Pearson Studium, Hallbergmoos, 2016
11. Sedlacek HH: B-Lymphozyten und ihre Rezeptoren. In: Sedlacek HH (Hrsg.): Immunologie - die Immunabwehr des Menschen. 2. Aufl., 310-328, De Gruyter, Berlin/Boston, 2014
12. Murphy KM: Die humorale Immunantwort. In: Murphy KM, Weaver C (Hrsg.): Janeway Immunologie. 9. Aufl., 518-570, Springer Spektrum, Berlin, 2018
13. Murphy KM: Entwicklung der B-Lymphocyten. In: Murphy KM, Weaver C (Hrsg.): Janeway Immunologie. 9. Aufl., 379-401, Springer Spektrum, Berlin, 2018

14. Murphy KM: Signale der Antigenrezeptoren und die Aktivierung von Lymphocyten. In: Murphy KM, Weaver C (Hrsg.): Janeway Immunologie. 9. Aufl., 340-368, Springer Spektrum, Berlin, 2018
15. Murphy KM: Das immunologische Gedächtnis. In: Murphy KM, Weaver C (Hrsg.): Janeway Immunologie. 9. Aufl., 614-639, Springer Spektrum, Berlin, 2018
16. Sedlacek HH: Antikörper als Ergebnis der Entwicklung von B-Lymphocyten zu Plasmazellen. In: Sedlacek HH (Hrsg.): Immunologie - die Immunabwehr des Menschen. 2. Aufl., 272-277, De Gruyter, Berlin/Boston, 2014
17. van de Bovenkamp FS, Hafkenschied L, Rispens T, Rombouts Y: The Emerging Importance of IgG Fab Glycosylation in Immunity. *The Journal of Immunology* 196,1435–1441 (2016)
18. Alter G, Ottenhoff THM, Joosten SA: Antibody glycosylation in inflammation, disease and vaccination. *Seminars in Immunology* 39, 102–110 (2018)
19. Parekh R: Age-related galactosylation of the N-linked oligosaccharides of human serum IgG. *Journal of Experimental Medicine* 167, 1731–1736 (1988)
20. Krištić J, Vučković F, Menni C, Klarić L, Keser T, Beceheli I: Glycans Are a Novel Biomarker of Chronological and Biological Ages. *The Journals of Gerontology* 69, 779–789 (2014)
21. Gudelj I, Lauc G, Pezer M: Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. *Cellular Immunology* 333, 65–79 (2018)
22. van de Geijn FE, Wuhrer M, Selman MH, Willemsen SP, de Man YA, Deelder AM, Hazes JMW, Dolhain RJEM: Immunoglobulin G galactosylation and sialylation are associated with pregnancy-induced improvement of rheumatoid arthritis and the postpartum flare: results from a large prospective cohort study. *Arthritis Research & Therapy* 11, R193 (2009)
23. Bondt A, Hafkenschied L, Falck D, Kuijper TM, Rombouts Y, Hazes JMW, Wuhrer M, Dolhain RJEM: ACPA IgG galactosylation associates with disease activity in pregnant patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 77, 1130-1136 (2018)
24. Rook GA, Steele J, Brealey R, Whyte A, Isenberg D, Sumar N, Nelson JL, Bodman KB, Young A, Roitt IM: Changes in IgG glycoform levels are associated with remission of arthritis during pregnancy. *J Autoimmun* 4, 779–794 (1991)
25. Lu J, Gu J: Significance of  $\beta$ -Galactoside  $\alpha$ 2,6 Sialyltransferase 1 in Cancers. *Molecules* 20, 7509–7527 (2015)
26. Parekh RB, Dwek RA, Sutton BJ, Fernandes DL, Leung A, Stanworth D, Rademacher TW, Mizuochi T, Taniguchi T, Matsuta K, Takeuchi F, Nagano Y, Miyamoto T, Kobata A: Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature* 316, 452–457 (1985)

27. Gudelj I, Salo PP, Trbojević-Akmačić I, Albers M, Primorac D, Perola M, Lauc G: Low galactosylation of IgG associates with higher risk for future diagnosis of rheumatoid arthritis during 10 years of follow-up. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1864, 2034–2039 (2018)
28. Rombouts Y, Willemze A, van Beers JJBC, Shi J, Kerkman PF, van Toorn L, Janssen GM, Zaldumbide A, Hoeben RC, Puijn GJ, Deelder AM, Wolbink G, Rispens T, van Veelen PA, Huizinga TWJ, Wuhrer M, Trouw LA, Scherer HU, Toes RE: Extensive glycosylation of ACPA-IgG variable domains modulates binding to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 75, 578–585 (2016)
29. Rombouts Y, Ewing E, van de Stadt LA, Selman MHJ, Trouw LA, Deelder AM, Huizinga TWJ, Wuhrer M, van Schaardenburg D, Toes REM, Scherer HU: Anti-citrullinated protein antibodies acquire a pro-inflammatory Fc glycosylation phenotype prior to the onset of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 74, 234–241 (2015)
30. Scherer HU, van der Woude D, Ioan-Facsinay A, el Bannoudi H, Trouw LA, Wang J, Haeupl T, Burmester GR, Deelder AM, Huizinga TWJ, Wuhrer M, Toes REM: Glycan profiling of anti-citrullinated protein antibodies isolated from human serum and synovial fluid. *Arthritis Rheum* 62, 1620–1629 (2010)
31. Scherer HU, Wang J, Toes REM, van der Woude D, Koeleman CAM, de Boer AR, Huizinga TWJ, Deelder AM, Wuhrer M: Immunoglobulin 1 (IgG1) Fc-glycosylation profiling of anti-citrullinated peptide antibodies from human serum. *Proteomics Clin Appl* 3, 106–115 (2009)
32. Bartsch YC, Rahmöller J, Mertes MMM, Eiglmeier S, Lorenz FKM, Stoehr AD, Braumann D, Lorenz AK, Winkler A, Lilienthal GM, Petry J, Hobusch J, Steinhaus M, Hess C, Holeccka V, Schoen CT, Oefner CM, Leliavski A, Blanchard V, Ehlers M: Sialylated Autoantigen-Reactive IgG Antibodies Attenuate Disease Development in Autoimmune Mouse Models of Lupus Nephritis and Rheumatoid Arthritis. *Frontiers in Immunology* 9, 1183 (2018)
33. Vučković F, Krištić J, Gudelj I, Teruel M, Keser T, Pezer M, Pučić-Baković M, Štambuk J, Trbojević-Akmačić I, Barrios C, Pavić T, Menni C, Wang Y, Zhou Y, Cui L, Song H, Zeng Q, Guo X, Pons-Estel BA, McKeigue P, Leslie Patrick A, Gornik O, Spector TD, Harjaček M, Alarcon-Riquelme M, Molokhia M, Wang W, Lauc G: Association of Systemic Lupus Erythematosus With Decreased Immunosuppressive Potential of the IgG Glycome. *Arthritis & Rheumatology* 67, 2978–2989 (2015)
34. Tomana M, Schrohenloher RE, Reveille JD, Arnett FC, Koopman WJ: Abnormal galactosylation of serum IgG in patients with systemic lupus erythematosus and members of families with high frequency of autoimmune diseases. *Rheumatology International* 12, 191–194 (1992)
35. Decker Y, Schomburg R, Németh E, Vitkin A, Fousse M, Liu Y, Fassbender K: Abnormal galactosylation of immunoglobulin G in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Multiple Sclerosis Journal* 22, 1794–1803 (2016)

36. Wuhrer M, Selman MHJ, McDonnell LA, Kümpfel T, Derfuss T, Khademi M, Olsson T, Hohlfeld R, Meinl E, Krumbholz M: Pro-inflammatory pattern of IgG1 Fc glycosylation in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Journal of Neuroinflammation* 12, 235 (2015)
37. Bermingham ML, Colombo M, McGurnaghan SJ, Blackbourn LAK, Vučković F, Pučić Baković M, Trbojević-Akmačić I, Lauc G, Agakov F, Agakova AS, Hayward C, Klarić L, Palmer CNA, Petrie JR, Chalmers J, Collier A, Green F, Lindsay RS, Macrury S, McKnight JA, Patrick AW, Thekkepat S, Gornik O, McKeigue PM, Colhoun HM: N-Glycan Profile and Kidney Disease in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*. 41, 79–87 (2018)
38. Bond A, Alavi A, Axford JS, Youinou P, Hay FC: The relationship between exposed galactose and N-acetylglucosamine residues on IgG in rheumatoid arthritis (RA), juvenile chronic arthritis (JCA) and Sjögren's syndrome (SS). *Clin Exp Immunol* 105, 99–103 (1996)
39. Youinou P, Penneç Y-L, Casburn-Budd R, Dueymes M, Letoux G, Lamour A: Galactose terminating oligosaccharides of IgG in patients with primary Sjögren's syndrome. *Journal of Autoimmunity* 5, 393–400 (1992)
40. Moore JS, Wu X, Kulhavy R, Tomana M, Novak J, Moldoveanu Z, Brown R, Goepfert PA, Mestecky J: Increased levels of galactose-deficient IgG in sera of HIV-1-infected individuals. *AIDS* 19, 381–389 (2005)
41. Lu LL, Chung AW, Rosebrock TR, Ghebremichael M, Yu WH, Grace PS, Schoen MK, Tafesse F, Martin C, Leung V, Mahan AE, Sips M, Kumar MP, Tedesco J, Robinson H, Tkachenko E, Draghi M, Freedberg KJ, Streeck H, Suscovich TJ, Lauffenburger DA, Restrepo BI, Day C, Fortune SM, Alter G: A Functional Role for Antibodies in Tuberculosis. *Cell* 167, 433-443 (2016)
42. Vadrevu SK, Trbojevic-Akmacic I, Kossenkov AV, Colomb F, Giron LB, Anzurez A, Lynn K, Mounzer K, Landay AL, Kaplan RC, Pappasavvas E, Montaner LJ, Lauc G, Abdel-Mohsen Mu: Frontline Science: Plasma and immunoglobulin G galactosylation associate with HIV persistence during antiretroviral therapy. *Journal of Leukocyte Biology* 104, 461–471 (2018)
43. Pilkington C, Yeung E, Isenberg D, Lefvert AK, Rook GA: Agalactosyl IgG and antibody specificity in rheumatoid arthritis, tuberculosis, systemic lupus erythematosus and myasthenia gravis. *Autoimmunity* 22, 107–111 (1995)
44. Rook GA, Onyebujoh P, Wilkins E, Ly HM, al Attiyah R, Bahr G, Corrah T, Hernandez H, Stanford JL: A longitudinal study of per cent agalactosyl IgG in tuberculosis patients receiving chemotherapy, with or without immunotherapy. *Immunology* 81, 149–154 (1994)
45. Zhu X, Jiang J, Shen H, Wang H, Zong H, Li Z, Yang Y, Niu Z, Liu W, Chen X, Hu Y, Gu J: Elevated beta1,4-galactosyltransferase I in highly metastatic human lung cancer cells. Identification of E1AF as important transcription activator. *J Biol Chem* 280, 12503–12516 (2005)

46. Wei Y, Liu D, Zhou F, Ge Y, Xu J, Yun X, Gu J, Jiang J: Identification of beta-1,4-galactosyltransferase I as a target gene of HBx-induced cell cycle progression of hepatoma cell. *J Hepatol* 49, 1029–1037 (2008)
47. Zhao Y, Li Y, Ma H, Dong W, Zhou H, Song X, Zhang J, Jia L: Modification of sialylation mediates the invasive properties and chemosensitivity of human hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Proteomics* 13, 520–36 (2014)
48. Choi H-J, Chung T-W, Kim C-H, Jeong H-S, Joo M, Youn B, Ha KT: Estrogen induced  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase 1 expression regulates proliferation of human breast cancer MCF-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 426, 620–625 (2012)
49. Recchi MA, Hebbar M, Hornez L, Harduin-Lepers A, Peyrat JP, Delannoy P: Multiplex reverse transcription polymerase chain reaction assessment of sialyltransferase expression in human breast cancer. *Cancer Res* 58, 4066–4070 (1998)
50. Radhakrishnan P, Chachadi V, Lin M-F, Singh R, Kannagi R, Cheng P-W: TNF $\alpha$  enhances the motility and invasiveness of prostatic cancer cells by stimulating the expression of selective glycosyl- and sulfotransferase genes involved in the synthesis of selectin ligands. *Biochem Biophys Res Commun* 409, 436–441 (2011)
51. Poeta ML, Massi E, Parrella P, Pellegrini P, De Robertis M, Copetti M, Rabitti C, Perrone G, Muda AO, Molinari F, Zanellato E, Crippa S, Caputo D, Caricato M, Frattini M, Coppola R, Fazio VM: Aberrant promoter methylation of beta-1,4 galactosyltransferase 1 as potential cancer-specific biomarker of colorectal tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 51, 1133–1143 (2012)
52. Lise M, Belluco C, Perera SP, Patel R, Thomas P, Ganguly A: Clinical correlations of alpha2,6-sialyltransferase expression in colorectal cancer patients. *Hybridoma* 19, 281–286 (2000)
53. Zhou H, Ma H, Wei W, Ji D, Song X, Sun J, Zhang J, Jia L: B4GALT family mediates the multidrug resistance of human leukemia cells by regulating the hedgehog pathway and the expression of p-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 1. *Cell Death Dis* 4, e654 (2013)
54. Shade K-T, Anthony R: Antibody Glycosylation and Inflammation. *Antibodies* 2 ,392–414 (2013)
55. Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA: The Impact of Glycosylation on the Biological Function and Structure of Human Immunoglobulins. *Annual Review of Immunology* 25, 21–50 (2007)
56. Collin M, Ehlers M: The carbohydrate switch between pathogenic and immunosuppressive antigen-specific antibodies. *Experimental Dermatology* 22, 511-514 (2013)
57. Seeling M, Brückner C, Nimmerjahn F: Differential antibody glycosylation in autoimmunity: sweet biomarker or modulator of disease activity? *Nature Reviews Rheumatology* 13, 621–630 (2017)

58. Biermann MHC, Griffante G, Podolska MJ, Boeltz S, Stürmer J, Muñoz LE, Bilyy R, Herrmann M: Sweet but dangerous – the role of immunoglobulin G glycosylation in autoimmunity and inflammation. *Lupus* 25, 934–942 (2016)
59. Nimmerjahn F: Divergent Immunoglobulin G Subclass Activity Through Selective Fc Receptor Binding. *Science* 310, 1510–1512 (2005)
60. Nimmerjahn F, Ravetch JV: Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nature Reviews Immunology* 8, 34–47 (2008)
61. Karsten CM, Pandey MK, Figge J, Kilchenstein R, Taylor PR, Rosas M, McDonald JU, Orr SJ, Berger M, Petzold D, Blanchard V, Winkler A, Hess C, Reid DM, Majoul IV, Strait RT, Harris NL, Köhl G, Wex E, Ludwig R, Zillikens D, Nimmerjahn F, Finkelman FD, Brown GD, Ehlers M, Köhl J: Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of FcγRIIB and dectin-1. *Nature Medicine* 18, 1401–1406 (2012)
62. Smith KGC, Clatworthy MR: FcγRIIB in autoimmunity and infection: evolutionary and therapeutic implications. *Nature Reviews Immunology* 10, 328–343 (2010)
63. Kreisman LS, Cobb BA: Infection, inflammation and host carbohydrates: A Glyco-Evasion Hypothesis. *Glycobiology* 22, 1019–1030 (2012)
64. Shields RL, Lai J, Keck R, O’Connell LY, Hong K, Meng YG, Weikert SHA, Presta LG: Lack of Fucose on Human IgG1 *N*-Linked Oligosaccharide Improves Binding to Human FcγRIII and Antibody-dependent Cellular Toxicity. *Journal of Biological Chemistry* 277, 26733–26740 (2002)
65. Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, Sakurada M, Uchida K, Anazawa H, Satoh M, Yamasaki M, Hanai N, Shitara K: The Absence of Fucose but Not the Presence of Galactose or Bisecting *N*-Acetylglucosamine of Human IgG1 Complex-type Oligosaccharides Shows the Critical Role of Enhancing Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry* 278, 3466–3473 (2003)
66. Käsermann F, Boerema DJ, Rügsegger M, Hofmann A, Wymann S, Zuercher AW, Miescher S: Analysis and functional consequences of increased Fab-sialylation of intravenous immunoglobulin (IVIg) after lectin fractionation. *PLoS ONE* 7, e37243 (2012)
67. Leibiger H, Wüstner D, Stigler RD, Marx U: Variable domain-linked oligosaccharides of a human monoclonal IgG: structure and influence on antigen binding. *Biochem J* 338, 529–538 (1999)
68. Wiedeman AE, Santer DM, Yan W, Miescher S, Käsermann F, Elkon KB: Contrasting mechanisms of interferon-α inhibition by intravenous immunoglobulin after induction by immune complexes versus Toll-like receptor agonists. *Arthritis Rheum* 65, 2713–2723 (2013)



69. Schultz MJ, Swindall AF, Bellis SL: Regulation of the metastatic cell phenotype by sialylated glycans. *Cancer and Metastasis Reviews* 31, 501–518 (2012)
70. Schauer R: Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Curr Opin Struct Biol* 19, 507–514 (2009)
71. Lauc G, Huffman JE, Pučić M, Zgaga L, Adamczyk B, Mužinić A, Novokmet M, Polašek O, Gornik O, Krištić J, Keser T, Vitart V, Scheijen B, Uh HW, Molokhia M, Patrick AL, McKeigue P, Kolčić I, Lukić IK, Swann O, van Leeuwen FN, Ruhaak LR, Houwing-Duistermaat JJ, Slagboom PE, Beekman M, de Craen AJ, Deelder AM, Zeng Q, Wang W, Hastie ND, Gyllensten U, Wilson JF, Wuhrer M, Wright AF, Rudd PM, Hayward C, Aulchenko Y, Campbell H, Rudan I: Loci Associated with N-Glycosylation of Human Immunoglobulin G Show Pleiotropy with Autoimmune Diseases and Haematological Cancers. *PLoS Genetics* 9, e1003225 (2013)
72. Kornfeld R, Kornfeld S: Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 54, 631–664 (1985)
73. Amado M, Almeida R, Schwientek T, Clausen H: Identification and characterization of large galactosyltransferase gene families: galactosyltransferases for all functions. *Biochim Biophys Acta* 1473, 35–53 (1999)
74. Paulson JC, Colley KJ: Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *J Biol Chem* 264, 7615–7618 (1989)
75. Xie H, Zhu Y, Zhang J, Liu Z, Fu H, Cao Y, Li G, Shen Y, Dai B, Xu J, Ye D: B4GALT1 expression predicts prognosis and adjuvant chemotherapy benefits in muscle-invasive bladder cancer patients. *BMC Cancer* 18, 590 (2018)
76. Xie H, Zhu Y, An H, Wang H, Zhu Y, Fu H, Wang Z, Fu Q, Xu J, Ye D: Increased B4GALT1 expression associates with adverse outcome in patients with non-metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget* 7, 32723–32730 (2016)
77. Zhou H, Zhang Z, Liu C, Jin C, Zhang J, Miao X, Jia L: B4GALT1 gene knockdown inhibits the hedgehog pathway and reverses multidrug resistance in the human leukemia K562/adriamycin-resistant cell line. *IUBMB Life* 4, 889–900 (2012)
78. Sato T, Furukawa K: Sequential action of Ets-1 and Sp1 in the activation of the human beta-1,4-galactosyltransferase V gene involved in abnormal glycosylation characteristic of cancer cells. *J Biol Chem* 282, 27702–27712 (2007)
79. Villegas-Comonfort S, Serna-Marquez N, Galindo-Hernandez O, Navarro-Tito N, Salazar EP: Arachidonic acid induces an increase of  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase I expression in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 113, 3330–3341 (2012)
80. Wichert B, Milde-Langosch K, Galatenko V, Schmalfeldt B, Oliveira-Ferrer L: Prognostic role of the sialyltransferase ST6GAL1 in ovarian cancer. *Glycobiology* 28, 898–903 (2018)

81. Holdbrooks AT, Britain CM, Bellis SL: ST6Gal-I sialyltransferase promotes tumor necrosis factor (TNF)-mediated cancer cell survival via sialylation of the TNF receptor 1 (TNFR1) death receptor. *Journal of Biological Chemistry* 293, 1610–1622 (2018)
82. Swindall AF, Bellis SL: Sialylation of the Fas Death Receptor by ST6Gal-I Provides Protection against Fas-mediated Apoptosis in Colon Carcinoma Cells. *Journal of Biological Chemistry* 286, 22982–22990 (2011)
83. Liu Z, Swindall AF, Kesterson RA, Schoeb TR, Bullard DC, Bellis SL: ST6Gal-I Regulates Macrophage Apoptosis via  $\alpha$ 2-6 Sialylation of the TNFR1 Death Receptor. *Journal of Biological Chemistry* 286, 39654–39662 (2011)
84. Britain CM, Dorsett KA, Bellis SL: The Glycosyltransferase ST6Gal-I Protects Tumor Cells against Serum Growth Factor Withdrawal by Enhancing Survival Signaling and Proliferative Potential. *Journal of Biological Chemistry* 292, 4663–4673 (2017)
85. Zhuo Y, Bellis SL: Emerging Role of  $\alpha$ 2,6-Sialic Acid as a Negative Regulator of Galectin Binding and Function. *Journal of Biological Chemistry* 286, 5935–5941 (2011)
86. Amano M, Galvan M, He J, Baum LG: The ST6Gal I sialyltransferase selectively modifies N-glycans on CD45 to negatively regulate galectin-1-induced CD45 clustering, phosphatase modulation, and T cell death. *J Biol Chem* 278, 7469–7475 (2003)
87. Park J-J, Yi JY, Jin YB, Lee Y-J, Lee J-S, Lee Y-S, Ko YG, Lee M: Sialylation of epidermal growth factor receptor regulates receptor activity and chemosensitivity to gefitinib in colon cancer cells. *Biochem Pharmacol* 83, 849–857 (2012)
88. Kitazume S, Imamaki R, Ogawa K, Komi Y, Futakawa S, Kojima S, Hashimoto Y, Marth JD, Paulson JC, Taniguchi N: Alpha2,6-sialic acid on platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM) regulates its homophilic interactions and downstream antiapoptotic signaling. *J Biol Chem* 285, 6515–6521 (2010)
89. Hou S, Hang Q, Isaji T, Lu J, Fukuda T, Gu J: Importance of membrane-proximal N-glycosylation on integrin  $\beta$ 1 in its activation and complex formation. *FASEB J* 30, 4120–4131 (2016)
90. Seales EC, Jurado GA, Brunson BA, Wakefield JK, Frost AR, Bellis SL: Hypersialylation of beta1 integrins, observed in colon adenocarcinoma, may contribute to cancer progression by up-regulating cell motility. *Cancer Res* 65, 4645–4652 (2005)
91. Swindall AF, Londoño-Joshi AI, Schultz MJ, Fineberg N, Buchsbaum DJ, Bellis SL: ST6Gal-I protein expression is upregulated in human epithelial tumors and correlates with stem cell markers in normal tissues and colon cancer cell lines. *Cancer Res* 73, 2368–2378 (2013)
92. Dalziel M, Dall’Olio F, Mungul A, Piller V, Piller F: Ras oncogene induces beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase (ST6Gal I) via a RalGEF-mediated signal to its housekeeping promoter. *Eur J Biochem* 271, 3623–3634 (2004)

93. Boumahdi S, Driessens G, Lapouge G, Rorive S, Nassar D, Le Mercier M, Delatte B, Caauwe A, Lenglez S, Nkusi E, Brohée S, Salmon I, Dubois C, del Marmol V, Fuks F, Beck B, Blanpain C: SOX2 controls tumour initiation and cancer stem-cell functions in squamous-cell carcinoma. *Nature* 511, 246–250 (2014)
94. Engdahl C, Bondt A, Harre U, Raufer J, Pfeifle R, Camponeschi A, Wuhrer M, Seeling M, Mårtensson IL, Nimmerjahn F, Krönke G, Scherer HU, Forsblad-d'Elia H, Schett G: Estrogen induces St6gal1 expression and increases IgG sialylation in mice and patients with rheumatoid arthritis: a potential explanation for the increased risk of rheumatoid arthritis in postmenopausal women. *Arthritis Research & Therapy* 20, 84 (2018)
95. Bassagañas S, Allende H, Cobler L, Ortiz MR, Llop E, de Bolós C, Peracaula R: Inflammatory cytokines regulate the expression of glycosyltransferases involved in the biosynthesis of tumor-associated sialylated glycans in pancreatic cancer cell lines. *Cytokine* 75, 197–206 (2015)
96. Pfeifle R, Rothe T, Ipseiz N, Scherer HU, Culemann S, Harre U, Ackermann JA, Seefried M, Kleyer A, Uderhardt S, Haugg B, Hueber AJ, Daum P, Heidkamp GF, Ge C, Böhm S, Lux A, Schuh W, Magorivska I, Nandakumar KS, Lönnblom E, Becker C, Dudziak D, Wuhrer M, Rombouts Y, Koeleman CA, Toes R, Winkler TH, Holmdahl R, Herrmann M, Blüml S, Nimmerjahn F, Schett G, Krönke G: Regulation of autoantibody activity by the IL-23–TH17 axis determines the onset of autoimmune disease. *Nature Immunology* 18, 104–113 (2017)
97. Tomuleasa C, Selicean S, Gafencu G, Petrushev B, Pop L, Berce C, Jurj A, Trifa A, Rosu AM, Pasca S, Magdo L, Zdrenghea M, Dima D, Tanase A, Frinc I, Bojan A, Berindan-Neagoe I, Ghiaur G, Ciurea SO: Fibroblast dynamics as an in vitro screening platform for anti-fibrotic drugs in primary myelofibrosis. *J Cell Physiol* 233, 422–433 (2018)
98. Pickhardt M, Tassoni M, Denner P, Kurkowsky B, Kitanovic A, Möhl C, Fava E, Mandelkow E: Screening of a neuronal cell model of tau pathology for therapeutic compounds. *Neurobiology of Aging* 76, 24–34 (2019)
99. Vijay GV, Zhao N, Den Hollander P, Toneff MJ, Joseph R, Pietila M, Taube JH, Sarkar TR, Ramirez-Pena E, Werden SJ, Shariati M, Gao R, Sobieski M, Stephan CC, Sphyris N, Miura N, Davies P, Chang JT, Soundararajan R, Rosen JM, Mani SA: GSK3 $\beta$  regulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res* 21, 37 (2019)
100. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D: Durchflusscytometrie. In: Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D (Hrsg.): *Der Experimentator: Immunologie*. 4. Aufl., 73-100, Springer Spektrum, Heidelberg, 2014
101. Decker T, Lohmann-Matthes M-L: A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of Immunological Methods* 115, 61–69 (1988)
102. de Jong SE, Selman MHJ, Adegnika AA, Amoah AS, van Riet E, Kruize YCM, Raynes JG, Rodriguez A, Boakye D, von Mutius E, Knulst AC, Genuneit J, Cooper PJ, Hokke CH,

- Wuhrer M, Yazdanbakhsh M: IgG1 Fc N-glycan galactosylation as a biomarker for immune activation. *Sci Rep* 6, 28207 (2016)
103. Bayer A, Hornuß C: Hypnotika in der Anästhesiologie: Barbiturate, Propofol, Etomidat. In: Rossaint R, Werner C, Zwißler B (Hrsg.): *Die Anästhesiologie*. 4. Aufl., 241-254, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 2019
  104. Forman SA: Clinical and molecular pharmacology of etomidate. *Anesthesiology* 114, 695–707 (2011)
  105. Wagner RL, White PF: Etomidate Inhibits Adrenocortical Function in Surgical Patients. *Anesthesiology* 61, 647–651 (1984)
  106. Morgan M, Lumley J, Whitwam JG: Respiratory effects of etomidate. *Br J Anaesth* 49, 233–236 (1977)
  107. Pejo E, Feng Y, Chao W, Cotten JF, Le Ge R, Raines DE: Differential effects of etomidate and its pyrrole analogue carboetomidate on the adrenocortical and cytokine responses to endotoxemia. *Crit Care Med* 40, 187–192 (2012)
  108. Félix NM, Goy-Thollot I, Walton RS, Gil SA, Mateus LM, Matos AS, Niza MMRE: Effects of etomidate in the adrenal and cytokine responses to hemorrhagic shock in rats. *European Journal of Inflammation* 14, 147–161 (2016)
  109. Zhang Y, Li R, Zhu J, Wang Z, Lv S, Xiong J-Y: Etomidate increases mortality in septic rats through inhibition of nuclear factor kappa-B rather than by causing adrenal insufficiency. *Journal of Surgical Research* 193, 399–406 (2015)
  110. Ling J, Kumar R: Crosstalk between NFκB and glucocorticoid signaling: A potential target of breast cancer therapy. *Cancer Letters* 322, 119–126 (2012)
  111. Zhang Y, Li RM, Wang C, Liu N, Lv S, Xiong JY: Etomidate inhibits nuclear factor-κB through decreased expression of glucocorticoid receptor in septic rats. *Molecular Medicine Reports* 14, 5760–5766 (2016)
  112. Kaileh M, Sen R: NF-κB function in B lymphocytes: NF-κB function in B lymphocytes. *Immunological Reviews* 246, 254–271 (2014)
  113. Balasubramanian S, Ramos J, Luo W, Sirisawad M, Verner E, Buggy JJ: A novel histone deacetylase 8 (HDAC8)-specific inhibitor PCI-34051 induces apoptosis in T-cell lymphomas. *Leukemia* 22, 1026–1034 (2008)
  114. Ren Y, Su X, Kong L, Li M, Zhao X, Yu N, Kang J: Therapeutic effects of histone deacetylase inhibitors in a murine asthma model. *Inflamm Res* 65, 995–1008 (2016)
  115. Buczko W, Hermanowicz JM: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of aliskiren, an oral direct renin inhibitor. *Pharmacol Rep* 60, 623–631 (2008)
  116. Gradman AH, Schmieder RE, Lins RL, Nussberger J, Chiang Y, Bedigian MP: Aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor, provides dose-dependent antihypertensive

- efficacy and placebo-like tolerability in hypertensive patients. *Circulation* 111, 1012–1018 (2008)
117. Makówka A, Olejniczak-Fortak M, Nowicki M: A comparison of the antihypertensive and anti-inflammatory effects of aliskiren and ramipril add-on therapy in peritoneal dialysis patients--a pilot open label study. *Kidney Blood Press Res* 36, 18–25 (2012)
  118. Ino J, Kojima C, Osaka M, Nitta K, Yoshida M: Dynamic Observation of Mechanically-Injured Mouse Femoral Artery Reveals an Antiinflammatory Effect of Renin Inhibitor. *ATVB* 29, 1858–1863 (2009)
  119. Al-Aubaidy HA, Sahib HA, Mohammad BI, Hadi NR, Abas SM: Antiatherosclerotic potential of aliskiren: its antioxidant and anti-inflammatory effects in rabbits: a randomized controlled trial. *J Pharm Technol Drug Res* 2, 11 (2013)
  120. Del Fiorentino A, Cianchetti S, Celi A, Pedrinelli R: Aliskiren, a renin inhibitor, downregulates TNF- $\alpha$ -induced tissue factor expression in HUVECS. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 11, 243–247 (2010)
  121. Choi DE, Jeong JY, Lim BJ, Chang Y-K, Na K-R, Shin Y-T, Lee KW: Aliskiren Ameliorates Renal Inflammation and Fibrosis Induced by Unilateral Ureteral Obstruction in Mice. *Journal of Urology* 186, 694–701 (2011)
  122. Békássy ZD, Kristoffersson A-C, Rebetz J, Tati R, Olin AI, Karpman D: Aliskiren inhibits renin-mediated complement activation. *Kidney International* 94, 689–700 (2018)
  123. Choi H-J, Chung T-W, Choi H-J, Han JH, Choi J-H, Kim C-H, Ha KT: Increased  $\alpha$ 2-6 sialylation of endometrial cells contributes to the development of endometriosis. *Exp Mol Med* 50, 164 (2018)
  124. Kaminski DA, Letterio JJ, Burrows PD: Differential regulation of mouse B cell development by transforming growth factor beta1. *Dev Immunol* 9, 85–95 (2002)
  125. Aihara A, Tanaka S, Yasen M, Matsumura S, Mitsunori Y, Murakata A, Noguchi N, Kudo A, Nakamura N, Ito K, Arii S: The selective Aurora B kinase inhibitor AZD1152 as a novel treatment for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 52, 63–71 (2010)
  126. Hole S, Pedersen AM, Lykkesfeldt AE, Yde CW: Aurora kinase A and B as new treatment targets in aromatase inhibitor-resistant breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment* 149, 715–726 (2015)
  127. Collins GP, Eyre TA, Linton KM, Radford J, Vallance GD, Soilleux E, Hatton C: A phase II trial of AZD1152 in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 170, 886–890 (2015)
  128. Giet R, Glover DM: *Drosophila* aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. *J Cell Biol* 152, 669–682 (2001)
  129. Wilkinson RW, Odedra R, Heaton SP, Wedge SR, Keen NJ, Crafter C, Foster JR, Brady MC, Bigley A, Brown E, Byth KF, Barrass NC, Mundt KE, Foote KM, Heron NM, Jung

- FH, Mortlock AA, Boyle FT, Green S: AZD1152, a selective inhibitor of Aurora B kinase, inhibits human tumor xenograft growth by inducing apoptosis. *Clin Cancer Res* 13, 3682–3688 (2007)
130. Uckun FM, Stewart CF, Reaman G, Chelstrom LM, Jin J, Chandan-Langlie M, Waddick KG, White J, Evans WE: In vitro and in vivo activity of topotecan against human B-lineage acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* 85, 2817–2828 (1995)
  131. Nakashio A, Fujita N, Rokudai S, Sato S, Tsuruo T: Prevention of phosphatidylinositol 3'-kinase-Akt survival signaling pathway during topotecan-induced apoptosis. *Cancer Res* 60, 5303–5309 (2000)
  132. Rialdi A, Campisi L, Zhao N, Lagda AC, Pietzsch C, Ho JSY, Martinez-Gil L, Fenouil R, Chen X, Edwards M, Metreveli G, Jordan S, Peralta Z, Munoz-Fontela C, Bouvier N, Merad M, Jin J, Weirauch M, Heinz S, Benner C, van Bakel H, Basler C, García-Sastre A, Bukreyev A, Marazzi I: Topoisomerase 1 inhibition suppresses inflammatory genes and protects from death by inflammation. *Science* 352,7993 (2016)
  133. Jin J, Xu W, Wan B, Wang X, Zhou Z, Miao Y, Lv T, Song Y: Topotecan Alleviates Lipopolysaccharide-Mediated Acute Lung Injury Via the NF- $\kappa$ B Signaling Pathway. *J Surg Res* 235, 83–92 (2019)
  134. Feldman RI, Wu JM, Polokoff MA, Kochanny MJ, Dinter H, Zhu D, Biroc SL, Alicke B, Bryant J, Yuan S, Buckman BO, Lentz D, Ferrer M, Whitlow M, Adler M, Finster S, Chang Z, Arnaiz DO: Novel Small Molecule Inhibitors of 3-Phosphoinositide-dependent Kinase-1. *J Biol Chem* 280, 19867–19874 (2005)
  135. Baracho GV, Cato MH, Zhu Z, Jaren OR, Hobeika E, Reth M, Rickert RC: PDK1 regulates B cell differentiation and homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, 9573–9578 (2014)
  136. Baracho GV, Miletic AV, Omori SA, Cato MH, Rickert RC: Emergence of the PI3-kinase pathway as a central modulator of normal and aberrant B cell differentiation. *Curr Opin Immunol* 23, 178–183 (2011)
  137. Clark K, Plater L, Peggie M, Cohen P: Use of the pharmacological inhibitor BX795 to study the regulation and physiological roles of TBK1 and I $\kappa$ B kinase epsilon: a distinct upstream kinase mediates Ser-172 phosphorylation and activation. *J Biol Chem* 284, 14136–14146 (2009)
  138. Pargellis C, Tong L, Churchill L, Cirillo PF, Gilmore T, Graham AG, Grob PM, Hickey ER, Moss N, Pav S, Regan J: Inhibition of p38 MAP kinase by utilizing a novel allosteric binding site. *Nat Struct Biol* 9, 268–272 (2002)
  139. Zhang W, Liu HAT: MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 12, 9–18 (2002)
  140. Guo X, Gerl RE, Schrader JW: Defining the involvement of p38 $\alpha$  MAPK in the production of anti- and proinflammatory cytokines using an SB 203580-resistant form of the kinase. *J Biol Chem* 278, 22237–22242 (2003)

141. Ryoo S, Choi J, Kim J, Bae S, Hong J, Jo S, Kim S, Lee Y: BIRB 796 has Distinctive Anti-inflammatory Effects on Different Cell Types. *Immune Netw* 13, 283 (2013)
142. Paunovic V, Harnett MM: Mitogen-Activated Protein Kinases as Therapeutic Targets for Rheumatoid Arthritis. *Drugs* 73, 101–115 (2013)
143. Schreiber S, Feagan B, D'Haens G, Colombel J-F, Geboes K, Yurcov M, Isakov V, Golovenko O, Bernstein CN, Ludwig D, Winter T, Meier U, Yong C, Steffgen J: Oral p38 mitogen-activated protein kinase inhibition with BIRB 796 for active Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4, 325–334 (2006)
144. Mihara K, Elliott GR, Boots AM, Nelissen RL: Inhibition of p38 kinase suppresses the development of psoriasis-like lesions in a human skin transplant model of psoriasis. *Br J Dermatol* 167, 455–457 (2012)
145. Patterson H, Nibbs R, McInnes I, Siebert S: Protein kinase inhibitors in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases: Protein kinase inhibitors for inflammation. *Clin Exp Immunol* 176, 1–10 (2014)
146. Hughes DP, Marron MB, Brindle NPJ: The Antiinflammatory Endothelial Tyrosine Kinase Tie2 Interacts With a Novel Nuclear Factor- $\kappa$ B Inhibitor ABIN-2. *Circulation Research* 92, 630–636 (2003)
147. Su A, Qiu M, Li Y, Xu W, Song S, Wang X, Song HY, Zheng N, Wu ZW: BX-795 inhibits HSV-1 and HSV-2 replication by blocking the JNK/p38 pathways without interfering with PDK1 activity in host cells. *Acta Pharmacol Sin* 38, 402–414 (2017)

## Anhang

**Tab. 7.1.: Expression von B4Galt1 in CD19<sup>+</sup> Zellen**

Name	FACS 0,01 µM		FACS 0,1 µM		FACS 1 µM		FACS 10 µM	
	Mittelwert ± SD	p-Wert	Mittelwert ± SD	p-Wert	Mittelwert ± SD	p-Wert	Mittelwert ± SD	p-Wert
PHA-665752	118,80 ± 26,48	0,9472	113,34 ± 10,31	0,9874	166,24 ± 79,80	0,1143	170,48 ± 123,66	0,0712
YM115	51,23 ± 21,01	<0,0001	43,46 ± 9,86	<0,0001	45,70 ± 19,80	<0,0001	46,21 ± 26,63	<0,0001
Barasertib	86,46 ± 22,15	0,4683	90,26 ± 16,88	0,7487	90,41 ± 24,85	0,759	64,22 ± 22,49	0,002
Doxorubicin	106,42 ± 39,06	0,9412	62,85 ± 39,46	0,0446	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA
Topotecan HCl	80,92 ± 6,70	0,0687	83,69 ± 24,89	0,1041	55,60 ± 8,32	<0,0001	38,29 ± 14,81	<0,0001
Celecoxib	109,28 ± 25,48	0,7663	106,33 ± 11,64	0,9345	109,48 ± 13,71	0,7519	109,82 ± 23,46	0,7268
BX-795	106,95 ± 29,69	0,9317	102,75 ± 25,63	0,9985	74,58 ± 22,47	0,0573	71,10 ± 8,79	0,0315
Doxazosin mesylate	104,21 ± 25,24	0,9808	109,88 ± 23,12	0,6368	104,23 ± 11,42	0,9804	92,18 ± 17,21	0,8069
Etomidat	111,05 ± 22,79	0,3241	100,90 ± 9,53	0,9998	101,49 ± 12,24	0,9996	99,03 ± 12,95	>0,9999
SB 525334	109,56 ± 17,13	0,7	122,97 ± 27,45	0,0428	109,12 ± 22,05	0,7353	109,18 ± 15,31	0,7308
Tadalafil	105,64 ± 9,85	0,9754	108,10 ± 21,94	0,888	98,09 ± 36,52	0,9997	105,80 ± 25,87	0,9685
CP 673451	112,65 ± 35,67	0,5356	103,53 ± 21,32	0,9957	22,49 ± 9,81	<0,0001	21,83 ± 7,49	<0,0001
BIRB 796	101,96 ± 16,49	0,9981	88,67 ± 4,56	0,3146	84,49 ± 19,73	0,0789	75,07 ± 12,90	0,0017
Tie2 kinase Inhibitor	105,45 ± 14,29	0,981	102,58 ± 10,29	0,9988	102,10 ± 10,23	0,9997	83,20 ± 47,68	0,3921
H 89 2HCl	99,79 ± 16,19	>0,9999	93,35 ± 17,89	0,8106	98,83 ± 16,81	0,9997	71,84 ± 7,85	0,0014
Allopurinol	98,21 ± 10,63	0,9983	102,79 ± 9,07	0,9881	100,65 ± 12,27	0,9999	96,46 ± 14,32	0,967
Enalaprilat	114,15 ± 31,83	0,7609	105,98 ± 13,98	0,9908	108,03 ± 18,56	0,9669	129,41 ± 41,41	0,1533
Clemastinfumarat	107,24 ± 11,97	0,6037	106,75 ± 12,93	0,6631	99,15 ± 13,27	0,9998	33,36 ± 11,21	<0,0001
PCI-34051	117,87 ± 30,46	0,2996	107,72 ± 23,82	0,9121	113,90 ± 20,73	0,5327	97,96 ± 20,87	0,9997
SB 743921	90,15 ± 31,42	0,772	76,60 ± 19,43	0,0833	46,49 ± 22,02	<0,0001	38,66 ± 25,05	<0,0001
Aliskiren hemifumarat	107,75 ± 21,20	0,7636	103,72 ± 16,33	0,9816	111,26 ± 12,48	0,4479	101,34 ± 17,04	0,9997
Xylazin HCl	104,03 ± 21,98	0,9894	105,51 ± 19,48	0,9595	111,84 ± 20,72	0,5581	108,83 ± 23,79	0,7885
CHIR-124	112,69 ± 24,44	0,3772	95,88 ± 20,31	0,98	36,67 ± 23,58	<0,0001	25,86 ± 15,01	<0,0001
JTC-801	91,50 ± 12,07	0,7056	81,12 ± 25,21	0,0744	24,40 ± 9,54	<0,0001	32,92 ± 17,55	<0,0001
Stattic	99,51 ± 25,35	>0,9999	55,93 ± 19,65	0,0003	46,69 ± 25,43	<0,0001	43,25 ± 26,17	0,0002
PRT062607 HCl	96,43 ± 19,13	0,9996	67,01 ± 21,30	0,0827	61,77 ± 17,37	0,0498	80,98 ± 90,41	0,6901
ABT-199	96,25 ± 23,69	0,9776	89,31 ± 11,17	0,4475	50,46 ± 13,40	<0,0001	54,25 ± 21,30	<0,0001

**Tab. 7.1.: Expression von B4Galt1 in CD19<sup>+</sup> Zellen**

Darstellung der normalisierten Daten (n=6-10) zur Analyse der Dosisabhängigkeit in Bezug auf die Expression von B4Galt1 in CD19<sup>+</sup> Zellen. Die Daten wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) mit multiplem Vergleichstest nach Dunnett analysiert. Signifikante p-Werte wurden farblich in blau markiert. NA=nicht auswertbar.



**Tab. 7.2.: Expression von St6Gal1 in CD19<sup>+</sup> Zellen**

Name	FACS 0,01 µM		FACS 0,1 µM		FACS 1 µM		FACS 10 µM	
	Mittelwert ± SD	p-Wert	Mittelwert ± SD	p-Wert	Mittelwert ± SD	p-Wert	Mittelwert ± SD	p-Wert
PHA-665752	107,68 ± 16,95	0,9997	119,80 ± 19,35	0,9697	142,99 ± 70,41	0,6169	156,26 ± 127,54	0,3712
YM115	64,47 ± 31,63	0,2728	72,94 ± 52,21	0,5142	61,22 ± 17,90	0,206	61,85 ± 36,24	0,1769
Barasertib	83,21 ± 21,82	0,436	94,27 ± 13,24	0,9794	82,36 ± 32,11	0,3913	59,65 ± 9,65	0,0059
Doxorubicin	139,99 ± 52,69	0,2737	82,38 ± 41,97	0,8073	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA
Topotecan HCl	96,72 ± 20,57	0,9997	101,43 ± 22,27	0,9999	76,10 ± 40,48	0,3982	38,85 ± 8,76	0,0033
Celecoxib	106,63 ± 58,17	0,9982	126,90 ± 22,72	0,6631	111,81 ± 23,31	0,9776	111,19 ± 11,39	0,9821
BX-795	91,15 ± 29,78	0,9639	97,56 ± 17,11	0,9997	81,84 ± 38,73	0,6323	73,09 ± 24,15	0,2815
Doxazosin mesylate	115,24 ± 22,47	0,9035	130,70 ± 12,42	0,4253	123,46 ± 22,42	0,6598	129,29 ± 59,40	0,4675
Etomidat	118,52 ± 9,43	0,0163	113,72 ± 8,41	0,0926	106,47 ± 9,42	0,6731	107,71 ± 5,41	0,5251
SB 525334	107,24 ± 23,60	0,9935	141,16 ± 39,80	0,1334	125,86 ± 38,95	0,4999	116,25 ± 15,94	0,8406
Tadalafil	116,18 ± 15,21	0,9888	164,02 ± 103,71	0,3352	133,82 ± 29,55	0,8245	117,67 ± 20,15	0,9836
CP 673451	135,01 ± 5,84	0,9493	140,31 ± 49,57	0,9158	181,67 ± 202,74	0,5754	32,60 ± 10,13	0,722
BIRB 796	159,04 ± 131,98	0,8436	146,02 ± 121,22	0,9331	132,15 ± 135,83	0,984	62,52 ± 3,11	0,978
Tie2 kinase Inhibitor	127,90 ± 36,08	0,1118	108,66 ± 1,22	0,9179	106,03 ± 2,70	0,9801	92,53 ± 16,99	0,9526
H 89 2HCl	99,70 ± 1,08	>0,9999	114,60 ± 55,98	0,932	109,18 ± 18,39	0,9898	104,99 ± 38,85	0,9996
Allopurinol	127,41 ± 23,07	0,5408	133,51 ± 41,62	0,3672	113,95 ± 31,33	0,9292	98,78 ± 16,75	>0,9999
Enalaprilat	126,48 ± 25,12	0,1346	116,90 ± 26,34	0,4977	120,21 ± 15,53	0,3349	122,82 ± 21,81	0,2344
Clemastinfumarat	137,61 ± 52,60	0,4091	130,65 ± 50,69	0,5909	131,34 ± 29,75	0,5719	45,54 ± 17,81	0,1767
PCI-34051	172,30 ± 80,21	0,0597	128,50 ± 17,84	0,755	139,89 ± 40,84	0,4773	134,37 ± 54,36	0,6108
SB 743921	106,68 ± 41,88	0,9971	117,88 ± 58,19	0,8516	74,71 ± 40,25	0,6167	42,26 ± 18,60	0,0698
Aliskiren hemifumarat	119,17 ± 20,90	0,7617	133,60 ± 66,38	0,2442	107,23 ± 6,25	0,9957	111,14 ± 12,52	0,9634
Xylazin HCl	131,09 ± 85,34	0,8499	147,46 ± 68,80	0,543	147,18 ± 82,89	0,5482	145,62 ± 86,58	0,5787
CHIR-124	98,22 ± 18,70	0,9997	78,55 ± 15,02	0,0612	47,28 ± 35,73	<0,0001	33,83 ± 9,19	<0,0001
JTC-801	96,68 ± 14,86	0,9983	84,47 ± 10,50	0,5321	72,59 ± 49,81	0,1505	56,05 ± 12,63	0,0048
Stattic	120,44 ± 23,57	0,6555	79,81 ± 30,13	0,6651	84,78 ± 58,20	0,8701	52,70 ± 29,75	0,1289
PRT062607 HCl	109,39 ± 68,88	0,8067	68,88 ± 20,39	0,0102	73,57 ± 18,25	0,0437	47,33 ± 29,66	0,0002
ABT-199	118,32 ± 56,04	0,6231	86,86 ± 19,92	0,8681	62,25 ± 21,36	0,0657	68,71 ± 23,84	0,1611

**Tab. 7.2.: Expression von St6Gal1 in CD19<sup>+</sup> Zellen**

Darstellung der normalisierten Daten (n=3-9) zur Analyse der Dosisabhängigkeit in Bezug auf die Expression von St6Gal1 in CD19<sup>+</sup> Zellen. Die Daten wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) mit multiplem Vergleichstest nach Dunnett analysiert. Signifikante p-Werte wurden farblich in blau markiert. NA=nicht auswertbar.

**Tab. 7.3.: Expression von B4Galt1 in CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> Zellen**

Name	FACS 0,01 µM		FACS 0,1 µM		FACS 1 µM		FACS 10 µM	
	Mittelwert ± SD	p-Wert	Mittelwert ± SD	p-Wert	Mittelwert ± SD	p-Wert	Mittelwert ± SD	p-Wert
PHA-665752	100,69 ± 4,46	>0,9999	111,12 ± 11,48	0,9982	149,00 ± 63,17	0,5539	187,92 ± 177,8	0,0872
YM115	42,40 ± 20,26	<0,0001	43,21 ± 21,79	<0,0001	39,45 ± 14,19	<0,0001	51,32 ± 27,89	<0,0001
Barasertib	78,26 ± 19,70	0,1156	83,66 ± 17,80	0,3268	88,83 ± 29,28	0,6722	62,20 ± 24,24	0,0016
Doxorubicin	99,27 ± 16,87	>0,9999	84,34 ± 49,90	0,5311	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA
Topotecan HCl	93,07 ± 29,47	0,9708	86,62 ± 27,01	0,7141	69,18 ± 27,54	0,0637	58,08 ± 33,59	0,0064
Celecoxib	110,42 ± 21,57	0,6548	110,26 ± 18,80	0,6673	110,70 ± 15,54	0,6328	108,29 ± 20,94	0,8151
BX-795	110,08 ± 31,31	0,9795	109,08 ± 29,62	0,9869	108,00 ± 78,13	0,9929	96,07 ± 31,83	0,9997
Doxazosin mesylate	105,51 ± 23,27	0,9565	111,71 ± 22,23	0,5489	107,24 ± 17,96	0,8807	87,55 ± 22,72	0,4917
Etomidat	109,92 ± 24,11	0,5259	102,68 ± 12,01	0,9956	104,16 ± 13,87	0,97	102,42 ± 16,91	0,9969
SB 525334	102,69 ± 16,03	0,9962	110,59 ± 17,13	0,5122	98,27 ± 21,83	0,9997	98,89 ± 18,18	0,9998
Tadalafil	109,71 ± 18,82	0,8301	106,53 ± 31,44	0,9595	102,46 ± 29,40	0,9996	112,63 ± 24,91	0,6478
CP 673451	118,61 ± 36,22	0,7664	139,00 ± 73,83	0,1466	42,02 ± 30,00	0,0129	32,71 ± 15,25	0,0032
BIRB 796	96,04 ± 20,56	0,98	86,07 ± 16,50	0,2618	79,62 ± 19,59	0,0457	68,51 ± 11,94	0,0009
Tie2 kinase Inhibitor	99,01 ± 18,64	0,9998	96,99 ± 12,38	0,9943	92,34 ± 7,66	0,7779	64,61 ± 27,59	0,0004
H 89 2HCl	98,68 ± 16,18	0,9997	90,93 ± 17,12	0,6183	99,78 ± 17,97	>0,9999	77,76 ± 14,83	0,0205
Allopurinol	100,56 ± 14,36	0,9999	106,95 ± 2,20	0,6976	97,13 ± 13,04	0,9844	94,89 ± 14,18	0,8581
Enalaprilat	118,87 ± 41,32	0,3791	109,34 ± 17,91	0,8926	108,02 ± 15,06	0,9382	119,35 ± 14,92	0,356
Clemastinfumarat	104,26 ± 15,14	0,986	104,91 ± 15,00	0,9742	107,42 ± 32,10	0,8763	40,31 ± 12,26	<0,0001
PCI-34051	108,94 ± 21,37	0,7397	104,47 ± 24,36	0,9781	102,99 ± 16,61	0,9961	97,07 ± 14,97	0,9964
SB 743921	75,76 ± 19,95	0,1534	69,16 ± 19,60	0,0355	50,56 ± 28,33	0,0003	54,12 ± 40,32	0,0008
Aliskiren hemifumarat	98,73 ± 6,85	0,9997	102,34 ± 17,43	0,996	109,94 ± 12,61	0,422	95,45 ± 17,76	0,9333
Xylazin HCl	111,55 ± 35,09	0,7177	103,04 ± 19,00	0,9984	108,71 ± 18,42	0,8802	106,65 ± 25,02	0,9558
CHIR-124	101,34 ± 10,58	0,9997	98,43 ± 28,67	0,9997	36,79 ± 17,63	<0,0001	36,20 ± 18,71	<0,0001
JTC-801	88,38 ± 12,65	0,2559	72,81 ± 10,26	0,0009	42,71 ± 18,05	<0,0001	46,34 ± 18,90	<0,0001
Stattic	99,80 ± 30,02	>0,9999	52,15 ± 14,95	0,0001	58,52 ± 22,88	0,0009	60,33 ± 27,54	0,0015
PRT062607 HCl	92,28 ± 23,27	0,9511	70,40 ± 27,85	0,0681	62,77 ± 37,69	0,0171	49,59 ± 40,40	0,0005
ABT-199	100,59 ± 17,04	0,99	121,05 ± 16,70	0,0408	74,47 ± 20,27	0,007	82,73 ± 25,99	0,1078

**Tab. 7.3.: Expression von B4Galt1 in CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> Zellen**

Darstellung der normalisierten Daten (n=6-10) zur Analyse der Dosisabhängigkeit in Bezug auf die Expression von B4Galt1 in CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> Zellen. Die Daten wurden mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) mit multiplem Vergleichstest nach Dunnett analysiert. Signifikante p-Werte wurden farblich in blau markiert. NA=nicht auswertbar.

**Tab. 7.4.: Expression von St6Gal1 in CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> Zellen**

Name	FACS 0,01 µM		FACS 0,1 µM		FACS 1 µM		FACS 10 µM	
	Mittelwert ± SD	p-Wert	Mittelwert ± SD	p-Wert	Mittelwert ± SD	p-Wert	Mittelwert ± SD	p-Wert
PHA-665752	107,18 ± 17,15	0,9996	122,40 ± 14,75	0,9154	134,80 ± 69,89	0,6748	139,81 ± 105,17	0,5598
YM115	58,81 ± 23,40	0,346	73,32 ± 73,43	0,7229	57,34 ± 28,29	0,3152	62,93 ± 48,33	0,4417
Barasertib	76,78 ± 22,51	0,2149	89,53 ± 16,01	0,8453	76,83 ± 34,46	0,2164	49,84 ± 7,95	0,0014
Doxorubicin	139,01 ± 45,95	0,2057	103,47 ± 47,11	0,9969	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA
Topotecan HCl	116,86 ± 61,56	0,9678	115,77 ± 59,01	0,9755	101,05 ± 69,45	>0,9999	39,38 ± 9,35	0,2208
Celecoxib	103,47 ± 39,84	0,9997	123,96 ± 22,62	0,6011	124,36 ± 51,60	0,587	115,04 ± 20,37	0,8929
BX-795	101,35 ± 32,59	0,9999	95,89 ± 24,86	0,9984	83,92 ± 38,03	0,7069	80,86 ± 24,14	0,5615
Doxazosin mesylate	109,03 ± 23,50	0,9725	117,38 ± 29,87	0,7314	114,95 ± 25,26	0,8259	124,41 ± 50,61	0,4392
Etomidat	113,36 ± 18,73	0,4602	107,42 ± 22,98	0,8824	103,10 ± 13,41	0,9966	104,04 ± 17,19	0,9896
SB 525334	95,88 ± 13,52	0,9983	118,89 ± 39,69	0,5403	103,43 ± 38,56	0,9989	96,61 ± 13,31	0,9996
Tadalafil	116,90 ± 16,27	0,4408	101,18 ± 2,29	0,9999	114,05 ± 21,87	0,6069	118,39 ± 30,87	0,3637
CP 673451	126,94 ± 54,65	0,7674	135,17 ± 67,84	0,5613	48,56 ± 25,91	0,2331	35,89 ± 10,02	0,0999
BIRB 796	155,80 ± 145,65	0,8096	138,74 ± 126,80	0,9444	56,60 ± 4,96	0,9363	55,45 ± 1,48	0,9299
Tie2 kinase Inhibitor	123,08 ± 46,14	0,4254	104,82 ± 10,89	0,9971	103,83 ± 10,99	0,9987	84,16 ± 15,22	0,7398
H 89 2HCl	113,41 ± 26,06	0,979	110,39 ± 48,60	0,9933	110,68 ± 21,14	0,9924	110,83 ± 67,79	0,9919
Allopurinol	125,16 ± 19,60	0,3252	130,91 ± 32,20	0,1767	102,72 ± 12,12	0,9997	97,80 ± 15,73	0,9998
Enalaprilat	122,75 ± 23,71	0,1251	115,45 ± 20,59	0,4251	120,94 ± 11,54	0,1752	124,12 ± 17,75	0,0958
Clemastinfumarat	132,70 ± 45,20	0,5261	129,92 ± 45,73	0,6036	125,57 ± 25,46	0,7263	66,33 ± 43,76	0,4996
PCI-34051	163,40 ± 65,31	0,0429	129,33 ± 18,40	0,5849	134,90 ± 35,15	0,4265	127,21 ± 43,99	0,6485
SB 743921	91,86 ± 25,32	0,9929	90,16 ± 34,50	0,983	75,77 ± 35,59	0,627	66,85 ± 62,89	0,3416
Aliskiren hemifumarat	121,14 ± 20,44	0,7138	130,16 ± 58,87	0,3589	135,27 ± 40,66	0,2271	112,46 ± 17,97	0,9394
Xylazin HCl	128,24 ± 72,07	0,8162	145,14 ± 57,64	0,4397	139,78 ± 71,51	0,5574	137,88 ± 73,33	0,6014
CHIR-124	117,05 ± 49,31	0,8339	91,33 ± 30,46	0,9878	75,09 ± 50,55	0,584	64,33 ± 51,14	0,2283
JTC-801	92,31 ± 14,12	0,9854	83,29 ± 12,54	0,7495	77,86 ± 67,81	0,5159	71,45 ± 3,37	0,3639
Stattic	121,14 ± 27,93	0,3847	67,80 ± 16,59	0,0843	71,16 ± 32,63	0,1406	54,46 ± 29,43	0,008
PRT062607 HCl	101,66 ± 29,02	0,9998	64,21 ± 18,48	0,0094	71,15 ± 31,83	0,0481	60,78 ± 30,24	0,0039
ABT-199	106,76 ± 16,65	0,9883	120,67 ± 27,29	0,4692	86,94 ± 29,56	0,8277	108,31 ± 46,61	0,9667

**Tab. 7.4.: Expression von St6Gal1 in CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> Zellen**

Darstellung der normalisierten Daten (n=4-9) zur Analyse der Dosisabhängigkeit in Bezug auf die Expression von St6Gal1 in CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> Zellen. Die Daten wurden mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) mit multiplem Vergleichstest nach Dunnett analysiert. Signifikante p-Werte wurden farblich in blau markiert. NA=nicht auswertbar.

**Tab. 7.5.: Expression von B4Galt1 in CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> Zellen**

Name	FACS 0,01 µM		FACS 0,1 µM		FACS 1 µM		FACS 10 µM	
	Mittelwert ± SD	p-Wert	Mittelwert ± SD	p-Wert	Mittelwert ± SD	p-Wert	Mittelwert ± SD	p-Wert
PHA-665752	86,55 ± 13,41	0,9511	107,42 ± 21,43	0,9961	92,42 ± 38,05	0,995	108,15 ± 83,38	0,9943
YM115	32,80 ± 12,54	<0,0001	36,89 ± 21,78	<0,0001	33,42 ± 8,87	<0,0001	40,41 ± 28,19	<0,0001
Barasertib	92,14 ± 66,73	0,9948	84,20 ± 30,09	0,9067	94,88 ± 44,98	0,9988	35,36 ± 18,56	0,0174
Doxorubicin	98,60 ± 23,30	0,999	70,30 ± 34,92	0,0666	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA
Topotecan HCl	84,61 ± 16,20	0,8361	77,87 ± 26,13	0,5747	69,33 ± 64,58	0,2784	27,33 ± 9,59	0,0009
Celecoxib	104,18 ± 39,01	0,9997	110,77 ± 36,40	0,9663	108,94 ± 21,48	0,9845	112,77 ± 43,09	0,9346
BX-795	109,65 ± 63,56	0,9972	115,48 ± 90,42	0,9791	51,74 ± 21,36	0,3782	55,18 ± 16,30	0,4996
Doxazosin mesylate	110,12 ± 57,68	0,9764	113,78 ± 43,83	0,9204	103,21 ± 18,50	0,9997	58,40 ± 28,36	0,1333
Etomidat	113,63 ± 31,13	0,5669	102,96 ± 16,26	0,9984	93,03 ± 21,89	0,9424	109,88 ± 13,21	0,8088
SB 525334	94,59 ± 11,30	0,9868	111,11 ± 33,19	0,8024	87,68 ± 18,35	0,7352	92,04 ± 28,00	0,9361
Tadalafil	106,25 ± 20,49	0,9787	96,25 ± 24,55	0,9978	97,49 ± 23,97	0,9997	116,11 ± 36,52	0,5359
CP 673451	94,17 ± 11,26	0,9643	78,89 ± 13,89	0,1447	37,84 ± 29,73	<0,0001	35,68 ± 23,50	<0,0001
BIRB 796	86,21 ± 7,92	0,1729	72,74 ± 19,10	0,0008	59,68 ± 16,54	<0,0001	50,26 ± 9,44	<0,0001
Tie2 kinase Inhibitor	98,54 ± 15,94	0,9999	107,37 ± 20,87	0,9679	97,36 ± 22,42	0,9997	74,63 ± 49,28	0,2258
H 89 2HCl	97,90 ± 13,27	0,9997	92,79 ± 21,52	0,93	101,31 ± 20,44	0,9998	53,15 ± 26,53	0,0004
Allopurinol	99,05 ± 17,49	0,9999	103,75 ± 19,35	0,9932	99,93 ± 19,67	>0,9999	99,91 ± 19,27	>0,9999
Enalaprilat	109,21 ± 24,52	0,9666	98,90 ± 8,64	>0,9999	115,41 ± 42,38	0,7949	119,56 ± 34,81	0,6205
Clemastinfumarat	97,22 ± 11,39	0,9997	116,91 ± 39,88	0,5884	101,51 ± 24,40	0,9999	50,93 ± 35,09	0,0035
PCI-34051	106,32 ± 15,41	0,9078	99,59 ± 12,59	>0,9999	93,71 ± 16,14	0,9091	86,49 ± 26,35	0,3628
SB 743921	76,46 ± 30,78	0,0275	68,21 ± 12,61	0,0018	40,13 ± 15,36	<0,0001	27,44 ± 10,59	<0,0001
Aliskiren hemifumarat	117,06 ± 39,77	0,5176	91,88 ± 8,72	0,9546	105,72 ± 28,19	0,9875	94,46 ± 21,91	0,9893
Xylazin HCl	99,39 ± 20,31	>0,9999	107,29 ± 32,41	0,9572	115,72 ± 31,16	0,5437	103,61 ± 17,99	0,9981
CHIR-124	81,96 ± 21,53	0,0729	49,18 ± 13,96	<0,0001	28,18 ± 22,19	<0,0001	14,64 ± 11,42	<0,0001
JTC-801	95,06 ± 51,29	0,9997	63,74 ± 37,29	0,3926	62,38 ± 81,25	0,3955	48,84 ± 35,32	0,1246
Stattic	95,89 ± 9,28	0,9986	50,16 ± 17,14	0,0107	54,23 ± 31,25	0,0392	53,85 ± 57,41	0,0197
PRT062607 HCl	95,74 ± 17,37	0,9961	92,42 ± 37,15	0,9596	50,22 ± 40,49	0,0016	38,86 ± 27,79	<0,0001
ABT-199	97,26 ± 9,39	0,9998	92,84 ± 18,64	0,9966	68,95 ± 27,04	0,4548	105,92 ± 90,81	0,9983

**Tab. 7.5.: Expression von B4Galt1 in CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> Zellen**

Darstellung der normalisierten Daten (n=5-9) zur Analyse der Dosisabhängigkeit in Bezug auf die Expression von B4Galt1 in CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> Zellen. Die Daten wurden mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) mit multiplem Vergleichstest nach Dunnett analysiert. Signifikante p-Werte wurden farblich in blau markiert. NA=nicht auswertbar.

**Tab. 7.6.: Expression von St6Gal1 in CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> Zellen**

Name	FACS 0,01 µM		FACS 0,1 µM		FACS 1 µM		FACS 10 µM	
	Mittelwert ± SD	p-Wert	Mittelwert ± SD	p-Wert	Mittelwert ± SD	p-Wert	Mittelwert ± SD	p-Wert
PHA-665752	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA
YM115	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA
Barasertib	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA
Doxorubicin	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA
Topotecan HCl	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA
Celecoxib	91,97 ± NA	NA	102,85 ± NA	NA	88,08 ± NA	NA	87,82 ± NA	NA
BX-795	80,31 ± NA	NA	70,73 ± NA	NA	27,98 ± NA	NA	66,32 ± NA	NA
Doxazosin mesylate	84,52 ± 16,17	0,467	94,18 ± 17,32	0,972	89,26 ± 13,10	0,7634	74,08 ± 22,83	0,0909
Etomidat	106,40 ± 13,64	0,9262	102,67 ± 19,53	0,9982	89,27 ± 10,38	0,6515	102,90 ± 15,00	0,9971
SB 525334	96,14 ± 5,19	0,9887	93,70 ± 12,34	0,919	78,39 ± 17,26	0,0853	80,80 ± 18,59	0,1433
Tadalafil	108,68 ± 13,16	0,9879	95,78 ± 11,87	0,9997	123,76 ± 60,57	0,6189	101,51 ± 19,51	0,9999
CP 673451	83,07 ± 31,02	0,9513	84,82 ± 56,34	0,9681	32,68 ± 13,92	0,1008	53,57 ± 46,22	0,3409
BIRB 796	80,17 ± 19,80	0,7251	54,87 ± 5,86	0,1524	65,09 ± 31,44	0,3039	36,21 ± 21,78	0,0439
Tie2 kinase Inhibitor	114,27 ± 24,35	0,9657	114,69 ± 8,81	0,9617	96,35 ± 5,56	0,9998	84,68 ± 55,84	0,9551
H 89 2HCl	110,55 ± 14,76	0,9805	90,35 ± 50,35	0,9865	106,75 ± 1,18	0,9969	45,90 ± 1,42	0,152
Allopurinol	116,47 ± 36,15	0,9648	149,63 ± 76,76	0,3321	104,85 ± 7,24	0,9997	96,59 ± 2,87	0,9998
Enalaprilat	111,38 ± 5,06	0,9933	124,74 ± 55,80	0,8694	124,44 ± 29,10	0,8741	120,60 ± 36,69	0,9275
Clemastinfumarat	133,73 ± 63,61	0,8811	130,84 ± 60,93	0,9119	111,62 ± 36,07	0,9984	75,25 ± 81,02	0,9608
PCI-34051	163,85 ± 83,17	0,4425	115,04 ± 34,20	0,9953	136,37 ± 53,10	0,8493	137,65 ± 68,90	0,8327
SB 743921	113,55 ± 46,85	0,9984	118,31 ± 102,77	0,9943	78,90 ± 80,98	0,9892	87,60 ± 99,86	0,9989
Aliskiren hemifumarat	165,89 ± 116,86	0,9331	143,29 ± 73,16	0,9875	251,79 ± 230,24	0,416	158,15 ± 107,24	0,958
Xylazin HCl	153,63 ± 115,79	0,7557	159,94 ± 66,07	0,6756	147,21 ± 79,70	0,8309	140,90 ± 91,42	0,8936
CHIR-124	119,59 ± 85,23	0,9987	70,72 ± 53,72	0,9946	125,75 ± 182,16	0,9966	82,90 ± 109,66	0,9997
JTC-801	76,16 ± 0,35	0,8251	52,41 ± 34,18	0,341	20,76 ± 2,24	0,0772	82,23 ± 53,27	0,93
Stattic	103,87 ± NA	NA	62,42 ± NA	NA	80,67 ± NA	NA	28,14 ± NA	NA
PRT062607 HCl	71,84 ± 41,43	0,7124	60,53 ± 37,40	0,4608	23,26 ± 26,43	0,0777	12,10 ± 6,53	0,0459
ABT-199	115,46 ± NA	NA	80,50 ± NA	NA	73,85 ± NA	NA	232,63 ± NA	NA

**Tab. 7.6.: Expression von St6Gal1 in CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> Zellen**

Darstellung der normalisierten Daten (n=1-4) zur Analyse der Dosisabhängigkeit in Bezug auf die Expression von St6Gal1 in CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> Zellen. Die Daten wurden mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) mit multiplem Vergleichstest nach Dunnett analysiert. Signifikante p-Werte wurden farblich in blau markiert. NA=nicht auswertbar.

**Tab. 7.7.: Expression von B4Galt1 in CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> Zellen**

Name	FACS 0,01 µM		FACS 0,1 µM		FACS 1 µM		FACS 10 µM	
	Mittelwert ± SD	p-Wert	Mittelwert ± SD	p-Wert	Mittelwert ± SD	p-Wert	Mittelwert ± SD	p-Wert
PHA-665752	112,77 ± 26,23	0,995	114,78 ± 16,65	0,9906	157,11 ± 43,09	0,3262	231,42 ± 157,46	0,0017
YM115	52,55 ± 23,17	0,1473	56,72 ± 24,45	0,2403	105,14 ± 100,83	0,9997	73,96 ± 39,43	0,7269
Barasertib	97,99 ± 19,32	0,9997	104,07 ± 14,76	0,989	105,30 ± 22,48	0,9657	88,55 ± 24,00	0,5924
Doxorubicin	105,21 ± 18,38	0,9104	83,52 ± 30,66	0,2419	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA
Topotecan HCl	107,42 ± 28,42	0,8991	102,53 ± 23,89	0,9986	81,48 ± 14,85	0,2121	64,11 ± 15,08	0,007
Celecoxib	106,82 ± 20,04	0,8902	113,97 ± 14,56	0,3599	113,98 ± 13,57	0,3589	110,60 ± 20,81	0,6123
BX-795	108,90 ± 35,86	0,9263	102,90 ± 28,39	0,9996	89,08 ± 22,20	0,8498	91,47 ± 23,81	0,937
Doxazosin mesylate	106,43 ± 20,43	0,8617	112,52 ± 19,16	0,3377	106,58 ± 12,46	0,8514	100,62 ± 15,24	0,9999
Etomidat	111,40 ± 22,96	0,3565	107,54 ± 10,67	0,7237	108,63 ± 12,71	0,6142	108,71 ± 13,58	0,6062
SB 525334	108,33 ± 14,37	0,6694	117,22 ± 14,72	0,0842	111,91 ± 20,25	0,3441	109,97 ± 15,07	0,5101
Tadalafil	119,28 ± 23,63	0,1922	114,37 ± 23,77	0,4478	105,80 ± 30,95	0,964	108,97 ± 16,99	0,8248
CP 673451	119,06 ± 30,74	0,6404	159,18 ± 57,80	0,0029	41,81 ± 32,71	0,0049	42,90 ± 22,54	0,0058
BIRB 796	113,12 ± 17,42	0,1802	111,75 ± 14,00	0,2653	104,33 ± 16,01	0,9433	85,72 ± 12,36	0,1263
Tie2 kinase Inhibitor	111,99 ± 14,75	0,3946	108,10 ± 9,24	0,7124	111,55 ± 8,74	0,3969	83,88 ± 30,54	0,1535
H 89 2HCl	104,96 ± 17,97	0,9314	101,64 ± 15,46	0,9996	107,57 ± 14,31	0,7291	97,33 ± 12,84	0,9949
Allopurinol	107,37 ± 10,79	0,478	107,87 ± 7,76	0,4165	104,18 ± 9,57	0,8814	101,86 ± 8,98	0,9957
Enalaprilat	103,46 ± 9,22	0,9766	107,74 ± 11,89	0,6488	105,40 ± 8,81	0,8732	110,63 ± 15,42	0,3645
Clemastinfumarat	113,44 ± 8,86	0,3831	113,32 ± 11,60	0,3916	117,93 ± 21,52	0,1514	54,89 ± 27,02	<0,0001
PCI-34051	113,45 ± 11,23	0,1331	105,33 ± 14,24	0,8555	103,42 ± 11,69	0,9767	99,03 ± 15,14	0,9997
SB 743921	112,82 ± 21,39	0,8185	102,14 ± 14,36	0,9998	74,86 ± 27,69	0,2865	78,60 ± 55,05	0,4009
Aliskiren hemifumarat	113,62 ± 18,24	0,1905	109,37 ± 12,38	0,5171	122,05 ± 14,34	0,0115	108,87 ± 14,21	0,5676
Xylazin HCl	112,25 ± 22,67	0,4589	108,68 ± 11,12	0,7512	114,19 ± 24,64	0,3228	110,75 ± 13,94	0,5792
CHIR-124	120,88 ± 27,16	0,1885	122,81 ± 29,05	0,1311	53,62 ± 33,74	0,0008	28,79 ± 13,59	<0,0001
JTC-801	104,29 ± 18,47	0,9963	111,13 ± 29,49	0,8332	61,58 ± 42,75	0,0214	39,52 ± 14,71	0,0002
Stattic	104,42 ± 28,60	0,9987	84,65 ± 16,70	0,8436	74,82 ± 17,40	0,5499	123,11 ± 79,85	0,6256
PRT062607 HCl	97,53 ± 11,15	0,9996	88,26 ± 29,23	0,6898	91,32 ± 26,84	0,8858	49,94 ± 35,62	0,0001
ABT-199	100,49 ± 15,29	>0,9999	102,41 ± 34,79	0,9996	85,04 ± 25,02	0,449	103,48 ± 26,02	0,9965

**Tab. 7.7.: Expression von B4Galt1 in CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> Zellen**

Darstellung der normalisierten Daten (n=5-9) zur Analyse der Dosisabhängigkeit in Bezug auf die Expression von B4Galt1 in CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> Zellen. Die Daten wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) mit multiplem Vergleichstest nach Dunnett analysiert. Signifikante p-Werte wurden farblich in blau markiert. NA=nicht auswertbar.

**Tab. 7.8.: Expression von St6Gal1 in CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> Zellen**

Name	FACS 0,01 µM		FACS 0,1 µM		FACS 1 µM		FACS 10 µM	
	Mittelwert ± SD	p-Wert	Mittelwert ± SD	p-Wert	Mittelwert ± SD	p-Wert	Mittelwert ± SD	p-Wert
PHA-665752	107,09 ± 27,75	0,9997	142,71 ± 8,24	0,6386	106,48 ± 29,99	0,9997	75,03 ± 73,86	0,9142
YM115	87,96 ± 38,26	0,9807	38,39 ± 15,60	0,1541	76,46 ± 9,80	0,808	68,58 ± 44,02	0,6242
Barasertib	85,15 ± 41,26	0,9839	104,75 ± 26,92	0,9998	89,14 ± 60,50	0,9958	81,30 ± 11,70	0,9602
Doxorubicin	185,60 ± 90,66	0,3706	81,95 ± 57,77	0,9723	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA
Topotecan HCl	111,82 ± 54,23	0,9869	126,76 ± 3,62	0,7796	110,61 ± 31,59	0,9919	107,71 ± 19,97	0,9979
Celecoxib	91,87 ± 81,06	0,9997	145,66 ± 40,16	0,7384	120,44 ± 48,49	0,9816	119,41 ± 22,30	0,9851
BX-795	87,17 ± 65,14	0,9969	104,63 ± 27,99	0,9999	89,07 ± 44,94	0,9985	86,48 ± 57,36	0,9963
Doxazosin mesylate	107,91 ± 44,09	0,9988	98,40 ± 52,94	>0,9999	105,58 ± 31,72	0,9997	113,11 ± 27,99	0,9927
Etomidat	121,73 ± 8,42	0,6727	134,40 ± 5,81	0,324	106,38 ± 38,89	0,9954	122,02 ± 6,18	0,6635
SB 525334	112,44 ± 39,53	0,9958	149,60 ± 60,69	0,572	110,08 ± 45,64	0,9984	114,47 ± 20,08	0,992
Tadalafil	136,36 ± NA	NA	105,88 ± NA	NA	153,74 ± NA	NA	70,05 ± NA	NA
CP 673451	40,11 ± NA	NA	61,50 ± NA	NA	18,72 ± NA	NA	60,70 ± NA	NA
BIRB 796	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA
Tie2 kinase Inhibitor	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA
H 89 2HCl	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA
Allopurinol	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA
Enalaprilat	187,95 ± NA	NA	123,45 ± NA	NA	164,82 ± NA	NA	155,05 ± NA	NA
Clemastinfumarat	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA	NA ± NA	NA
PCI-34051	179,15 ± NA	NA	144,63 ± NA	NA	155,05 ± NA	NA	125,08 ± NA	NA
SB 743921	90,55 ± 21,65	0,9988	116,21 ± 54,46	0,9897	281,53 ± 75,42	0,0126	58,98 ± 2,73	0,7473
Aliskiren hemifumarat	119,87 ± NA	NA	122,15 ± NA	NA	122,15 ± NA	NA	132,57 ± NA	NA
Xylazin HCl	109,12 ± NA	NA	113,36 ± NA	NA	116,29 ± NA	NA	108,47 ± NA	NA
CHIR-124	123,13 ± NA	NA	149,51 ± NA	NA	35,50 ± NA	NA	77,20 ± NA	NA
JTC-801	119,54 ± 13,82	0,8183	133,22 ± 35,02	0,4652	167,49 ± NA	0,148	115,72 ± 28,68	0,904
Stattic	107,42 ± 24,51	0,9985	80,11 ± 32,27	0,9218	82,72 ± 56,18	0,9524	33,82 ± 5,15	0,1819
PRT062607 HCl	103,94 ± 15,26	0,9998	109,51 ± 81,04	0,9958	78,39 ± 21,22	0,8843	54,60 ± 37,25	0,3409
ABT-199	110,30 ± 29,20	0,9937	108,45 ± 29,05	0,9971	101,07 ± 7,97	>0,9999	182,69 ± 53,04	0,0803

**Tab. 7.8.: Expression von St6Gal1 in CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> Zellen**

Darstellung der normalisierten Daten (n=1-4) zur Analyse der Dosisabhängigkeit in Bezug auf die Expression von St6Gal1 in CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> Zellen. Die Daten wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) mit multiplem Vergleichstest nach Dunnett analysiert. Signifikante p-Werte wurden farblich in blau markiert. NA=nicht auswertbar.

**Tab. 7.9.: LDH-Zytotoxizitätsassay**

Name	FACS 0,01 µM		FACS 0,1 µM		FACS 1 µM		FACS 10 µM	
	Mittelwert ± SD	p-Wert	Mittelwert ± SD	p-Wert	Mittelwert ± SD	p-Wert	Mittelwert ± SD	p-Wert
PHA-665752	123,52 ± 72,26	0,9849	146,52 ± 62,17	0,8577	230,92 ± 124,26	0,1434	341,80 ± 111,76	0,0043
YM115	103,19 ± 38,53	0,9999	156,30 ± 8,73	0,2574	178,76 ± 30,64	0,0743	223,01 ± 85,39	0,0047
Barasertib	118,21 ± 33,22	0,854	112,14 ± 36,33	0,9587	122,78 ± 21,06	0,7386	128,24 ± 51,97	0,586
Doxorubicin	103,85 ± 27,47	0,9998	119,69 ± 42,79	0,8949	170,71 ± 51,99	0,0804	234,28 ± 53,65	0,001
Topotecan HCl	103,85 ± 17,61	0,0979	67,12 ± 18,83	0,037	82,57 ± 19,10	0,4029	72,80 ± 26,44	0,0982
Celecoxib	69,52 ± 14,98	0,01	80,03 ± 15,47	0,1165	65,76 ± 11,87	0,00039	64,60 ± 20,08	0,00029
BX-795	87,94 ± 15,63	0,7908	86,30 ± 24,56	0,7139	79,46 ± 24,38	0,3922	74,15 ± 29,97	0,2126
Doxazosin mesylate	98,71 ± 35,50	>0,9999	102,95 ± 43,26	0,9999	104,41 ± 39,16	0,9997	144,18 ± 63,54	0,4018
Etomidat	108,98 ± 42,38	0,9924	116,16 ± 47,99	0,9394	117,78 ± 35,81	0,9179	113,91 ± 49,47	0,9633
SB 525334	108,79 ± 44,71	0,992	100,20 ± 40,27	>0,9999	96,02 ± 38,95	0,9997	90,70 ± 46,39	0,9901
Tadalafil	86,37 ± 16,30	0,8375	92,46 ± 29,53	0,9752	80,12 ± 35,38	0,6039	93,36 ± 22,37	0,9843
CP 673451	112,53 ± 55,38	0,9955	124,49 ± 63,16	0,9489	279,38 ± 81,98	0,0039	306,48 ± 78,40	0,0012
BIRB 796	95,86 ± 31,40	0,9997	123,10 ± 55,51	0,8133	121,78 ± 41,13	0,8408	122,68 ± 41,53	0,8222
Tie2 kinase Inhibitor	115,49 ± 33,86	0,8797	91,67 ± 11,24	0,9847	100,91 ± 30,99	>0,9999	104,26 ± 48,78	0,9988
H 89 2HCl	108,01 ± 42,60	0,9913	97,49 ± 33,45	0,9999	86,39 ± 18,92	0,9434	254,09 ± 49,90	<0,0001
Allopurinol	115,88 ± 46,68	0,9073	110,72 ± 26,23	0,9748	104,51 ± 32,66	0,999	101,23 ± 42,91	>0,9999
Enalaprilat	100,38 ± 45,56	>0,9999	120,72 ± 37,51	0,8322	115,42 ± 31,90	0,9301	122,04 ± 44,96	0,8022
Clemastinfumarat	102,45 ± 26,30	>0,9999	104,20 ± 17,04	0,9998	112,51 ± 40,52	0,99	353,18 ± 102,36	<0,0001
PCI-34051	80,70 ± 8,95	0,7835	98,34 ± 53,86	0,9999	92,98 ± 22,33	0,992	104,98 ± 34,34	0,9977
SB 743921	133,68 ± 89,69	0,9824	92,72 ± 39,58	0,9999	371,32 ± 173,56	0,0182	360,26 ± 173,45	0,0236
Aliskiren hemifumarat	141,35 ± 122,82	0,8495	115,51 ± 77,94	0,9947	113,01 ± 50,03	0,9972	112,38 ± 66,71	0,9976
Xylazin HCl	73,12 ± 9,09	0,3711	98,85 ± 31,96	>0,9999	85,90 ± 26,59	0,8301	108,82 ± 34,36	0,96
CHIR-124	79,18 ± 30,00	0,9615	134,81 ± 44,84	0,8144	253,71 ± 76,27	0,0071	310,29 ± 91,34	0,0005
JTC-801	111,87 ± 11,37	0,999	369,45 ± 98,01	0,0023	402,80 ± 149,80	0,0008	367,50 ± 86,16	0,0025
Stattic	104,50 ± 10,48	0,9991	118,99 ± 8,29	0,8755	181,37 ± 31,86	0,023	187,33 ± 74,68	0,0146
PRT062607 HCl	106,63 ± 17,60	0,999	138,52 ± 31,48	0,6653	155,36 ± 70,14	0,3742	363,74 ± 80,99	<0,0001
ABT-199	159,39 ± 71,66	0,7528	179,61 ± 52,36	0,542	220,88 ± 88,03	0,2121	284,31 ± 154,95	0,034

**Tab. 7.9.: LDH-Zytotoxizitätsassay**

Darstellung der normalisierten Daten (n=3-4) zur Analyse der Zytotoxizität. Die Daten wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) mit multiplem Vergleichstest nach Dunnett analysiert. Signifikante p-Werte wurden farblich in blau markiert.



## Ethikvotum der Ethikkommission



*Im Fokus das Leben*  
Universität zu Lübeck

Medizinische Fakultät

### Ethik-Kommission

Vorsitzender:

Herr Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe

Universität zu Lübeck

Stellv. Vorsitzende:

Frau Prof. Dr. med. M. Schrader

Ratzeburger Allee 160

23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Dr. Angelika Hüppe

Tel.: +49 451 500 5854

Fax: +49 451 500 5872

angelika.hueppe@uk-sh.de

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Hr. Prof. Dr. Ludwig  
Klinik für Dermatologie und Venerologie

im Haus

Aktenzeichen: **09-140**

Datum 13.11.2009

**Sitzung der Ethik-Kommission am 06. Oktober 2009, Nachreichung vom 06.11.2009**

**Antragsteller: Hr. Prof. Dr. Ludwig**

**Titel: Pathogenese und Therapie Autoantikörper-induzierter Gewebsschädigung**

Sehr geehrter Herr Ludwig,

der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft. Die Kommission hat keine Bedenken mehr.

*Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden. Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muss die Kommission umgehend benachrichtigt werden. Nach Abschluss des Projektes bitte ich um Übersendung eines knappen Schlussberichtes (unter Angabe unseres Aktenzeichens), aus dem der Erfolg/Misserfolg der Studie sowie Angaben darüber, ob die Studie abgebrochen oder geändert bzw. ob Regressansprüche geltend gemacht wurden, ersichtlich sind. Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Studie und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.*

Mit freundlichem Gruß

Prof. Dr. Dr. H. Raspe  
Vorsitzender

#### anwesende Kommissionsmitglieder:

Prof. Dr. Dr. H.-H. Raspe  
(Sozialmedizin, Vorsitzender der EK)  
 Prof. Dr. Schweiger (Psychiatrie)  
 Prof. Dr. Dendorfer (Pharmakologie)  
 Frau Prof. E. Stubbe (Theologin)  
Prof. Dr. Borck (Medizin- und  
Wissenschaftsgeschichte)

Frau H. Müller  
(Pflege)  
Dr. Kaiser  
(Kinderchirurgie)  
 Herr Dr. Fieber  
(Richter am Amtsgericht Ahrensburg)  
 Prof. Schwinger (Humangenetik)

Herr Prof. Dr. Mönig  
(Medizinische Klinik I)  
 Frau Prof. Dr. M. Schrader  
(Plastische Chirurgie, Stellv. Vors.)  
 Herr D. Stojan  
(Präsident des Amtsgerichtes Lübeck)

## Danksagung

Ohne die Unterstützung und Mithilfe vieler Personen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ich möchte mich daher an dieser Stelle bei Allen bedanken, die zur Ermöglichung beigetragen haben und mich tatkräftig bei dieser Aufgabe unterstützt haben.

Mein besonderer Dank richtet sich an das Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie (LIED) und das Graduiertenkolleg RTG1727 *Modulation of Autoimmunity*. Zudem danke ich der DFG für die finanzielle Förderung meines Projektes. Als Stipendiatin hatte ich die Möglichkeit, Mitglied einer spannenden Forschungsgruppe zu sein, alle nötigen Materialien und Geräte wurden bereitgestellt und ein intensiver Austausch zwischen den einzelnen Arbeitsgruppen bereicherte stets mein eigenes Projekt. Dafür möchte ich allen Verantwortlichen und insbesondere dem Klinikdirektor Prof. Dr. D. Zillikens danken.

Insbesondere möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. R. Ludwig bedanken, der mir das Vertrauen für das gesamte Projekt entgegengebracht hat und stets ein Ansprechpartner war. Meiner Mentorin PD Dr. K. Bieber gilt jedoch wohl der größte Dank. Durch ihre Hilfe und ein großes Maß an Engagement stand sie mir stets als Mentorin zur Seite. Sie hat mich mit viel Spaß an der Arbeit und vielen wertvollen wissenschaftlichen Ratschlägen durch das Projekt geleitet. Darüber hinaus möchte ich Prof. Dr. M. Ehlers in seiner Funktion als zweiter Mentor für seine Zusammenarbeit danken.

Mein Dank richtet sich außerdem an das gesamte Team der AG Ludwig, wobei ich vor allem Astrid Fischer und Claudia Kauderer für ihre Unterstützung danken möchte. Sirka Marie Sinnecker danke ich für ihre Unterstützung im Labor sowie die Bereitstellung ihrer Daten. Auch Natalie Gross und Diana Wortmann danke ich für ihre Hilfe und die schöne, gemeinsame Zeit im Labor.

An dieser Stelle möchte ich mich auch nochmal bei allen Blutspendern bedanken, ohne deren Mitwirkung die Realisierung des Projektes nicht möglich gewesen wäre.

Einen besonderen Dank möchte ich an meine Familie und Freunde richten, die mich in dem gesamten Prozess und während meines Studiums unterstützt haben.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

*Name:* Friederike Breternitz

*Geburtsdatum:* 20.06.1995



### Hochschulstudium

*Studium:* Humanmedizin an der Universität zu Lübeck  
seit 2015

### Promotion

*Institut:* Lübecker Institut für experimentelle Dermatologie (LIED)

*Graduiertenkolleg:* Graduiertenkolleg 1727, Modulation of Autoimmunity

*Betreuer:* Prof. Dr. R. Ludwig, PD Dr. K. Bieber, Prof. Dr. M. Ehlers

*Zeitraum der Dissertation:* 1.10.2018-31.3.2019