S. Porubsky¹ · B. Luckow² · M. Bonrouhi¹ · A. Speak³ · V. Cerundolo⁴ · F. Platt³ · H.-J. Gröne¹

¹ Zelluläre und molekulare Pathologie, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg

² Medizinische Poliklinik, Universitätsklinikum München

³ Department of Pharmacology, University of Oxford, UK

⁴ Weatherall Institute of Molecular Medicine, University of Oxford, UK

Glykosphingolipide Gb3 und iGb3

In-vivo-Rolle im hämolytisch-urämischem Syndrom und bei der Funktion der iNKT-Zellen

Glykosphingolipide (GSL) sind amphipathische Moleküle, die aus einem sie in der Plasmamembran verankernden Ceramidanteil und aus einer unterschiedlich langen Zuckerrestkette bestehen. In Säugetieren leitet sich die Mehrheit der GSL vom Laktosylceramid (LacCer, d. h. GalGlcCer, Abb. 1) ab, von dem durch die Addition eines dritten Zuckerrestes bzw. eines Sulfats die einzelnen Gruppen der GSL entstehen (Abb. 1). Die Gruppe der Isogloboside unterscheidet sich von der Gruppe der Globoside lediglich durch die glykosidische Bindung zwischen dem 2. und dem 3. Zuckerrest (α 1-3 bei Isoglobosiden und α 1-4 bei Globosiden), der allerdings in beiden Fällen die Galaktose ist (Abb. 1). Die *in vivo* physiologische Rolle dieser 2 Gruppen der GSL bleibt weitgehend unbekannt.

Aufgrund von *In-vitro*-Versuchen wurde das Globotrihexosylceramid (Gb₃, CD77) als der Rezeptor für Verotoxin 1 und 2 impliziert [4, 9]. Verotoxine sind Produkte enterohämorrhagischer *Escherichia coli* (EHEC) und weisen eine hohe Homologie mit dem durch *Shigella dysenteriae* produzierten Toxin auf. Sowohl Verotoxine als auch Shiga-Toxine gehören wegen ihrer Struktur und ihrem Wirkmechanismus in die Gruppe der toxischen Lektine

wie z. B. auch Ricin. Verotoxine werden als das kausative Agens bei der Entstehung des hämolytisch-urämischem Syndroms und der thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura angesehen. Sie bestehen aus einer enzymatisch aktiven A-Einheit und 5 B-Einheiten, die für die Bindung an den membranständigen Zellrezeptor (Gb₃) verantwortlich sind. Nach der B-Einheit-vermittelten Bindung des Verotoxins an Gb₃ erfolgt die Internalisation des Holotoxins mittels Endozytose, gefolgt von einem retrograden Transport ins endoplasmatische Retikulum [6, 15]. Die A-Einheit bewirkt dann dank ihrer N-Glykosidase-Aktivität die Spaltung der 28S-rRNA der 60S-ribosomalen-Einheit und hemmt somit irreversibel die Proteinsynthese.

Unser Ziel war, *in vivo* zu testen, ob allein Gb₃ (bzw. die Gruppe der durch die Gb₃-Synthase synthetisierten GSL) für die Vermittlung der Verotoxintoxizität verantwortlich ist. Zu diesem Zwecke und zur Untersuchung weiterer *In-vivo*-Rollen der Globoside haben wir eine Gb₃-Synthasedefiziente Maus generiert und die Toxizitätserscheinungen nach der Verabreichung von Verotoxin untersucht.

Isoglobotrihexosylceramid (iGb₃) hingegen, das sich nur durch eine glykosidische Bindung vom Gb₃ unterscheidet, wurde als der endogene Ligand postuliert, der für die Entwicklung von invari-

anten „natural-killer“-T-Zellen (iNKT) verantwortlich ist. Natural-killer-T-Zellen (NKT) stellen eine diskrete Population von T-Zellen dar, welche neben dem T-Zell-Rezeptor (TCR) auch Marker der NK-Zellen (z. B. NK1.1) exprimieren [8]. Ein Unterteil der Population von NKT-Zellen, der als invariante NKT-Zellen (iNKT) bezeichnet wird, besitzt darüber hinaus einen TCR, welcher aus einer invarianten TCR- α -Kette (V α 14-J α 18 bei der Maus bzw. V α 24-J α 18 beim Menschen) besteht. Diese TCR- α -Kette tritt nur in Kombination mit einem begrenzten Repertoire von β -Ketten auf (V β 2, V β 7, V β 8.2 bei der Maus bzw. V β 11 beim Menschen).

Im Gegensatz zu konventionellen T-Zellen, welche Peptidantigene auf MHC-I- oder -II-Molekülen erkennen, erkennt die iNKT-Zelle Lipidantigene, die auf CD1-Molekülen präsentiert werden. CD1-Moleküle, die mit MHC-Molekülen evolutionär verwandt sind, sind nichtpolymorphe transmembrane Proteine, die mit β_2 -Microglobulin assoziieren und unterschiedliche Lipide an die T-Zellen präsentieren [1, 5]. Während es beim Menschen 5 Isoformen der CD1-Moleküle gibt (CD1 a–e), besitzt die Maus nur die – auch in allen Spezies am weitesten konservierte – Isoform CD1d [13].

Obwohl iNKT-Zellen weniger als 1% aller T-Zellen ausmachen, spielen sie of-

Abb. 1 Vereinfachtes Syntheschema der Glykosphingolipide (GSL), deren Mehrzahl sich vom Laktosylceramid (*LacCer*) herleitet. Durch die Addition eines dritten Zuckerrestes bzw. eines Sulfats entstehen die unterschiedlichen Gruppen der GSL. Sowohl das Globotrihexosylceramid (*Gb3*) als auch das Isoglobotrihexosylceramid (*iGb3*) haben an der 3. Stelle eine Galaktose, unterscheiden sich jedoch in der glykosidischen Bindung, die im Falle vom *Gb3* α1-4 bzw. im Falle vom *iGb3* α1-3 ist. Der Abbau dieser Substanzen erfolgt in umgekehrter Richtung und bedarf an der markierten Stelle (*) der β-Einheit der β-Hexosaminidasen, welche bei der Sandhoff-Speicherkrankheit defekt ist. (Cer Ceramid, Gal Galaktose, GalNAc N-Acetylgalaktosamin, Glc Glukose, GlcNAc N-Acetylglukosamin, NANA N-Acetylneuraminsäure, S Sulfat)

Abb. 2 Gb3S-Defizienz schützt vor der Verotoxintoxizität. Adulten Gb3S-defizienten Mäusen (Gb3S^{-/-}) und heterozygoten Kontrollen (Gb3S^{+/-}) wurde intraperitoneal Verotoxin injiziert. **a** Der spontane Verlauf der Erkrankung wurde abgewartet. Dieser zeigte, dass im Gegensatz zu den Kontrolltieren, die zwischen dem 2. und 4. Tag starben, Gb3S-defiziente Mäuse vor Verotoxintoxizität vollständig geschützt sind ($p < 0,0001$ im Mantel-Cox-Test; $n = 11$ pro Gruppe). **b** 36 Stunden nach der Injektion wurden Plasmakonzentrationen von Harnstoff und Kreatinin bestimmt. Während beide Werte bei Gb3S-defizienten Mäusen im Normbereich lagen, kam es bei den Kontrolltieren zu einem signifikanten (*, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$) Anstieg (Durchschnitt $\pm$ SEM, $n = 8$ pro Gruppe)

fensichtlich eine wichtige Rolle in der Abwehr gegen Bakterien (z. B. Mykoplasmen und Spirochetten), Pilze (z. B. Kryptokokken) und Tumoren sowie bei der peripheren Toleranz [3, 17].

In Analogie zu konventionellen T-Zellen, die im Thymus durch Peptidantigene auf MHC-I- oder -II-Molekülen positiv selektioniert werden, unterliegen die iNKT-Zellen einer positiven Selektion durch endogene Lipidantigene auf CD1d-Mole-

külen [18]. Die Identität dieses (bzw. dieser) endogenen Liganden bleibt jedoch weiterhin unbekannt. Es könnte sich allerdings um ein GSL handeln, da gezeigt wurde, dass Glukosylceramid-defiziente Zelllinien iNKT-Zell-Hybridome nicht

Pathologe 2008 · [Suppl 2] 29:297–302 DOI 10.1007/s00292-008-1040-0
© Springer Medizin Verlag 2008

S. Porubsky · B. Luckow · M. Bonrouhi · A. Speak · V. Cerundolo · F. Platt · H.-J. Gröne **Glykosphingolipide Gb3 und iGb3. In-vivo-Rolle im hämolytisch-urämischen Syndrom und bei der Funktion der iNKT-Zellen**

Zusammenfassung

Die Glykosphingolipide Globotrihexosylceramid (Gb3, CD77) und Isoglobotrihexosylceramid (iGb3) sind Isomere, welche sich nur in einer glykosidischen Bindung unterscheiden. Beide wurden in unterschiedlichen Prozessen der angeborenen und erworbenen Immunität beschrieben.

Ziele. 1. Da Gb3 als der zelluläre Rezeptor für das durch Shigellen und manche *E. coli*-Stämme produzierte Verotoxin (VT) postuliert wurde, wollten wir in Gb3-defizienten Mäusen *in vivo* testen, ob Gb3 alleine für die Entstehung des durch VT hervorgerufenen hämolytisch-urämischen Syndroms verantwortlich ist. 2. Da iGb3 als der endogene Ligand für die positive Selektion von invarianten „natural-killer“-T-Zellen (iNKT) im Thymus vorgeschlagen wurde, wollten wir diese Hypothese in iGb3-defizienten Mäusen *in vivo* überprüfen.

Methoden. Konstruktion Gb3- und iGb3-defizienter Mäuse. VT-Injektion in Gb3-defi-

ziente Mäuse. Analyse der Entwicklung und Funktion der iNKT-Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Verabreichung von α -Galactosylceramid in iGb3-defiziente Mäuse.

Ergebnisse. 1. Gb3-defiziente Mäuse zeigten sich als unempfindlich gegenüber sonst letalen Dosen von VT. 2. iGb3-defiziente Mäuse zeigten normale iNKT-Zellzahlen. Die Funktion von iNKT-Zellen war in iGb3-defizienten Mäusen ebenfalls unbeeinträchtigt.

Schlussfolgerungen. Gb3 ist der zelluläre Rezeptor, der für die Vermittlung der VT-Toxizität und somit für die Entstehung des hämolytisch-urämischen Syndroms verantwortlich ist. Im Gegensatz zu vorherigen Hinweisen, kann iGb3 kein endogener Ligand sein, der für die positive Selektion von iNKT-Zellen verantwortlich wäre.

Schlüsselwörter

iNKT · iGb3 · Gb3 · HUS-TTP

Glycosphingolipids Gb3 and iGb3. In vivo roles in hemolytic-uremic syndrome and iNKT cell function

Abstract

The glycosphingolipids globotrihexosylceramide (Gb3, CD77) and isoglobotrihexosylceramide (iGb3) are isomers differing only in one glycosidic bond and have been implicated in several processes of the innate and adaptive immune system.

Aims. 1) To verify the function of Gb3 in the pathogenesis of hemolytic-uremic syndrome as the cellular receptor responsible for cytotoxicity caused by verotoxin (VT) elaborated by Shigella and certain strains of *E. coli*. 2) To investigate *in vivo* the previously implicated function of iGb3 as the endogenous lipid ligand responsible for positive selection of invariant natural killer T-cells (iNKT), which have an essential regulatory function in infection, tumor rejection and tolerance.

Methods. Generation of mice deficient in Gb3 and iGb3 synthesizing enzymes and VT injection into Gb3-deficient mice. Analysis of

iNKT cell development and function by flow cytometry and by administration of the exogenous agonist α -galactosylceramide in iGb3-deficient mice.

Results. For 1) Gb3-deficient mice were insensitive to otherwise lethal doses of VT, and 2) iGb3-deficient mice showed normal numbers of iNKT cells. Furthermore the function of iNKT cells evolving in iGb3-deficient mice was unaffected.

Conclusions. 1) Gb3 is the cellular receptor mediating verotoxin cytotoxicity in haemolytic-uremic syndrome. 2) In contrast to previous indirect implications, iGb3 cannot be regarded as an endogenous ligand responsible for the positive selection of iNKT cells.

Keywords

iNKT · iGb3 · Gb3 · HUS-TTP

stimulieren können [16]. Ferner wurde gezeigt, dass Mäuse mit mutierter β -Einheit der β -Hexosaminidasen (*Hexb*^{-/-}, ein Mausmodell der Sandhoff-Speicherkrankheit, **Abb. 1**) eine deutlich reduzierte Anzahl der iNKT-Zellen aufweisen [20]. Daraus wurde geschlossen, dass die bei der Sandhoff-Speicherkrankheit defizienten lysosomalen Degradationsenzyme für die Generierung des gesuchten Lipidliganden verantwortlich sind. Unter den bekannten Degradationsprodukten dieser Enzyme zeigte nur iGb3 eine *in vitro* stimulierende Kapazität gegenüber den iNKT-Zellen [20, 19]. Aufgrund dieses indirekten Beweises wurde iGb3 als der endogene Ligand, der für die positive Selektion von iNKT-Zellen verantwortlich ist, postuliert.

Wir haben einen direkten genetischen Ansatz gewählt, um zu testen, ob iGb3 ein physiologisch relevanter Ligand für die positive Selektion der iNKT-Zellen ist. Deshalb wurde eine iGb3-Synthase-defiziente Maus (*iGb3S*^{-/-}) generiert und die Entwicklung und Funktion der iNKT-Zellen in diesen Mäusen analysiert.

Methoden

Herstellung Gb3-Synthase-defizienter Mäuse

Eine Gb3-Synthase-defiziente Maus wurde mit Hilfe homologer Rekombination in Mausstammzellen konstruiert, indem das letzte Exon des Gb3-Synthase-Gens, das auch für die katalytische Domäne des Enzyms kodiert, durch eine Neomycin-Kassette ersetzt wurde. Adulte *Gb3S*^{+/-}- und *Gb3S*^{-/-}-Mäuse beider Geschlechter wurden mit 0,1 μ g Verotoxin 2 (Sigma, Schnellendorf, Deutschland) intraperitoneal gespritzt. In einer Gruppe wurden alle Mäuse nach 36 Stunden getötet, um Blut- und Organproben zu gewinnen. In einer anderen Gruppe wurde der spontane Verlauf der Erkrankung abgewartet, um eine Überlebensanalyse durchzuführen.

Herstellung und Analyse iGb3-Synthase-defizienter Mäuse

Eine iGb3-Synthase-defiziente Maus wurde mit Hilfe homologer Rekombination in Mausstammzellen konstruiert, indem das

Abb. 3 ▲ iGb3S-defiziente Mäuse zeigen unbeeinträchtigte iNKT-Zell-Zahlen. iNKT-Zellen wurden in Organhomogenaten des Thymus, der Milz und der Leber mit Hilfe von Anti-CD44-Antikörper- und α GalCer-beladener CD1d-Tetramere in der Durchflusszytometrie dargestellt. Die Balken geben die Frequenz von iNKT-Zellen im jeweiligen Organ im Lymphozytenfenster an (Durchschnitt $\pm$ SEM, $n=5$ pro Gruppe). Es ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den iGb3S-defizienten Mäusen (-/-) und den heterozygoten Kontrollen (+/-)

5. Exon des iGb3-Synthase-Gens, das auch für die katalytische Domäne des Enzyms kodiert, durch eine Neomycin-Kassette ersetzt wurde [14].

Analysen der GSL-Zusammensetzung wurden mittels „high performance liquid chromatography“ (HPLC) durchgeführt [14]. Einzelzellsuspensionen von Thymi und Milzen wurden durch enzymatischen Gewebsverdau mittels Collagenase IA und DNaseI vorbereitet. Die Präparation von Leukozyten aus der Leber erfolgte mit Hilfe eines Percoll-Gradienten [7]. PE-markierte CD1d-Tetramere (Proimmune, Oxford, UK) wurden mit α GalCer (Axxora, Lörrach, Deutschland) beladen [10]. Etwa 10^6 Zellen wurden dann mit 1 pmol entweder α GalCer-beladenen CD1d-Tetramers oder unbeladenen CD1d-Tetramers gefärbt. Färbungen mit anderen Antikörpern wurden durchgeführt, wie beschrieben in [14].

Für die Analyse der Zytokinprofile wurden adulte weibliche iGb3S^{+/-}- sowie iGb3S^{-/-}-Mäuse intravenös mit 1 μ g α GalCer (gelöst in 100 μ l 0,5% Tween 20 in PBS) gespritzt. Blutproben wurden nach 3 Stunden gesammelt, und die Konzentrationen von IL-6, IL-10, IL-12p70, IFN- γ , TNF- α , Ccl2/MCP-1 und IL-4 wurden mit Hilfe der „cytometric bead array“- (CBA-)Technologie und FACSCalibur™ (BD, Heidelberg, Deutschland) gemessen und mit Hilfe der FCAP-Software (Soft Flow, Pécs, Ungarn) analysiert.

Ergebnisse

Gb3-defiziente Mäuse sind unempfindlich gegenüber letalen Dosen vom Verotoxin 2

Um die Rolle von Gb3 als Rezeptor für Verotoxin 2 zu überprüfen, konstruierten wir Gb3S-defiziente Mäuse (Gb3S^{-/-}). Chemisch zeigte sich kein Unterschied zwischen Wildtyp-Mäusen (Gb3S^{+/+}) und Heterozygoten (Gb3S^{+/-}), weswegen die Letzteren weiter als Kontrolltiere für die Gb3S^{-/-}-Mäuse verwendet wurden. Bei nativen Gb3S^{-/-}-Mäusen waren keine histomorphologischen Abweichungen bei der Untersuchung vom Gehirn, Auge, Thymus, Herz, Lunge, Leber, Milz, Pankreas, Gastrointestinaltrakt, Niere, Nebenniere, Haut, Knochenmark und Geschlechtsorganen feststellbar. Das Fehlen von Gb3 war ebenfalls weder mit Auffälligkeiten im Verhalten noch gestörter Reproduktion verbunden.

Nach der Verabreichung von Verotoxin 2 verstarben alle Gb3S^{+/-}-Mäuse zwischen Tag 2 und 4 (Abb. 2 a). Die männlichen Gb3S^{+/-}-Mäuse zeigten dabei ein etwas verzögertes Versterben, das jedoch im Vergleich zum Verlauf bei den Weibchen nicht statistisch signifikant unterschiedlich war. Im Gegensatz dazu überlebten die Gb3-defizienten Mäuse beider Geschlechter diese Zeitspanne und zeigten auch weiterhin keine Auffälligkeiten während der ganzen Beob-

achtungszeit von 14 Tagen (Abb. 2 a). Während die Gb3S^{+/-}-Mäuse 36 Stunden nach der Verotoxingabe laborchemische Korrelate der Urämie in Form von ansteigenden Retentionswerten (Harnstoff und Kreatinin) aufwiesen, blieben beide Parameter bei den Gb3S^{-/-}-Mäusen im Normbereich (Abb. 2 b).

iGb3-defiziente Mäuse zeigen eine normale Zahl und Funktion von iNKT-Zellen

Die homologe Rekombination am iGb3S-Lokus wurde durch „Southern blot“ überprüft und die Absenz des iGb3 sowie der ganzen Isogloboserie der GSL mit Hilfe der HPLC belegt [14]. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen Wildtyp-Mäusen (iGb3S^{+/+}) und heterozygoten (iGb3S^{+/-}), weswegen die Letzteren weiter als Kontrolltiere verwendet wurden. Um die Rolle von iGb3 als endogener Ligand, der für die positive Selektion von iNKT-Zellen impliziert wurde, zu überprüfen, untersuchten wir mit Hilfe α GalCer-beladener CD1d-Tetramere die Frequenz der iNKT-Zellen im Thymus, in der Milz und Leber der Gb3S^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den iGb3S^{+/-}-Mäusen. iNKT-Zellen kamen in diesen Organen bei den iGb3S^{-/-}-Mäusen mit einer nicht verminderten Frequenz vor (Abb. 3). Ein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zu den iGb3S^{+/-}-Kontrollen konnte nicht festgestellt werden.

Nach der Stimulation mit α GalCer sezernieren die iNKT-Zellen eine Reihe von Zytokinen und üben einen aktivierenden Effekt auf dendritische Zellen aus. Um die *In-vivo*-Funktion der iNKT-Zellen der iGb3S^{+/-}- und iGb3S^{-/-}-Mäuse zu vergleichen, wurde den Mäusen α GalCer verabreicht. Auch hier zeigte sich kein Unterschied zwischen den iNKT-Zellen der iGb3-defizienten Mäuse und der Kontrollen (Abb. 4 a). Hiermit übereinstimmend ergab sich in diesem Versuch kein Unterschied in der Hochregulation des oberflächlichen CD69-Moleküls bzw. der Zytokine IFN- γ und IL-4, welche mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt wurden (Abb. 4 b). Ferner konnte in dieser Versuchsanordnung auch eine unterschiedliche Reifung der dendritischen

Abb. 4 ▲ iNKT-Zellen iGb3S-defizienter Mäuse zeigen eine normale *In-vivo*-Funktion. iGb3-defizienten Mäusen ($-/-$) und heterozygoten Kontrollen ($+/-$) wurde α GalCer intravenös injiziert. **a** 3 Stunden nach der Injektion wurde die Konzentration der angegebenen Zytokine im Serum gemessen. iGb3S $-/-$ -Mäuse unterschieden sich nicht von den Kontrollen (Durchschnitt $\pm$ SEM, $n=5$ pro Gruppe). **b** 2 Stunden nach der Injektion wurden hepatische iNKT-Zellen mittels Durchflusszytometrie auf ihre Expression von CD69, IL-4 und IFN- γ untersucht. Weiterhin wurde 12 Stunden nach der Injektion die Expression von CD86 auf dendritischen Zellen (DC) der Milz bestimmt. Gezeigt werden repräsentative Proben für beide Genotypen und die jeweilige Isotypkontrolle. In keinem der Fälle fand sich ein Unterschied zwischen iGb3S $-/-$ und iGb3S $+/-$ -Mäusen

Zellen bei den iGb3S $-/-$ -Mäusen ausgeschlossen werden (■ **Abb. 4 b**).

Diskussion

Die Glykosphingolipide Gb3 und iGb3, welche identische Zuckerreste, jedoch eine unterschiedliche glykosidische Bindung zwischen den letzten 2 Galaktosen aufweisen, wurden in unterschiedlichen (patho-)physiologischen Prozessen involviert.

Mehrere *In-vitro*-Versuche erbrachten Hinweise, dass Gb3 (CD77) als ein Rezeptor dient, welcher für die intrazelluläre Aufnahme von Verotoxin verantwortlich ist [4, 9]. Sollte Gb3 (bzw. die von der Gb3S abhängigen GSL) das essenzielle Molekül an der Zelloberfläche sein, das die Bindung und die darauf folgende Endozytose von Verotoxin vermittelt, würde man in den Gb3S $-/-$ -Mäusen keine Toxizitätserscheinungen erwarten. Dies konnte hier in einem *In-vivo*-Versuch bestätigt werden. Die Anwesenheit von Gb3 bzw. anderer GSL der Globoserie ist somit eine *Conditio sine qua non* für

die Entstehung des urämischen Syndroms nach Verotoxinexposition. Ohne Gb3 führen selbst letale Dosen von Verotoxin 2 zu keinerlei Organschäden.

Ähnliche Ergebnisse wurden von einer anderen, von uns unabhängig konstruierten, Gb3S-defizienten Maus veröffentlicht [12]. Es bleibt jedoch weiterhin fraglich, welche Zellen bzw. Struktur(en) in der Entstehung des hämolytisch-urämischen Syndroms eine führende Rolle haben und welche weiteren Organschäden erst die Folge hiervon sind. Die Verotoxintoxizität kommt erst nach der Depletion vorbestehender Proteine durch endogene Umsatzmechanismen zum Vorschein. Deshalb lässt sich vermuten, dass die Zelle, welche neben ausreichender Gb3-Expression auch einen hohen Proteinumsatz aufweist, diejenige Struktur im Körper sein könnte, die in der Pathogenese des hämolytisch-urämischen Syndroms führend ist. Dies ist der Gegenstand unserer weiteren Untersuchungen.

Aufgrund früherer Untersuchungen in Hexb $-/-$ Mäusen, die in Lysosomen – u. a. – iGb4 zu iGb3 nicht spalten können

(■ **Abb. 1**) und die keine iNKT-Zellen aufweisen, wurde iGb3 als der endogene Ligand vorgeschlagen, der für die positive Selektion dieser Zellen im Thymus verantwortlich ist [20]. Obwohl iGb3 *in vitro* eine stimulatorische Kapazität gegenüber iNKT-Zellen besitzt [20, 19], gibt es keinen direkten Beweis dafür, dass iGb3 *in vivo* die Rolle des endogenen Liganden erfüllt. Diese Hypothese wollten wir direkt überprüfen und konstruierten deshalb iGb3S-defiziente Mäuse. iGb3S $-/-$ -Mäuse hatten keine nachweisbaren GSL der Isogloboserie (iGb3, iGb4, iGb5; [14]). α 1,3-Galaktosyltransferase, die ähnlich wie iGb3S für die Synthese von Gal α 1-3Gal-Epitopen verantwortlich ist, konnte die Aktivität der ausgeschalteten iGb3S nicht ersetzen. Dies entspricht den früheren Beobachtungen über die Substratspezifität dieser 2 Enzyme: α 1,3-Galaktosyltransferase ist spezifisch für das auf Proteinen befindliche N-Acetylactosamin, während iGb3S spezifisch für GSL ist [11].

Wir fanden, dass sich die Anzahl und Funktion der iNKT-Zellen in iGb3S $-/-$ -Mäusen nicht von den iGb3S $+/-$ -Kontroll-

len unterscheidet. Dieser Befund spricht stark gegen die frühere Annahme, dass iGb3 die thymische Selektion der iNKT-Zellen vermittelt. Ferner zeigte sich inzwischen, dass der Verlust der iNKT-Zellen nicht spezifisch für Defekte im Metabolismus des Isoglogoserie ist (z. B. Hexb^{-/-}), sondern dass man eine Reduktion der iNKT-Zellzahl auch in anderen Speichermodellen beobachten kann, welche mit dem Metabolismus der Isogloboside nicht direkt interferieren [2]. Aus diesem Grund ist die Absenz der iNKT-Zellen in diesen Speichermodellen vielmehr die Konsequenz der Lipidspeicherung als der Abwesenheit von iGb3. In Zusammenschau aller Ergebnisse zeigt sich somit, dass iGb3 für die positive Selektion und periphere Funktion der iNKT-Zellen nicht verantwortlich ist und dass ein anderer Ligand bzw. andere Liganden gesucht werden müssen.

Korrespondenzadresse

Dr. S. Porubsky

Zelluläre und molekulare Pathologie
Deutsches Krebsforschungszentrum
Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg
s.porubsky@dkfz.de

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

- Brigl M, Brenner MB (2004) CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol* 22: 817–890
- Gadola SD, Silk JD, Jeans A et al. (2006) Impaired selection of invariant natural killer T cells in diverse mouse models of glycosphingolipid lysosomal storage diseases. *J Exp Med* 203: 2293–2303
- Hansen DS, Schofield L (2004) Regulation of immunity and pathogenesis in infectious diseases by CD1d-restricted NKT cells. *Int J Parasitol* 34: 15–25
- Jacewicz M, Clausen H, Nudelman E et al. (1986) Pathogenesis of shigella diarrhea. XI. Isolation of a shigella toxin-binding glycolipid from rabbit jejunum and hela cells and its identification as globotriaosylceramide. *J Exp Med* 163: 1391–1404
- Kasahara M, Nakaya J, Satta Y, Takahata N (1997) Chromosomal duplication and the emergence of the adaptive immune system. *Trends Genet* 13: 90–92
- Khine AA, Lingwood CA (1994) Capping and receptor-mediated endocytosis of cell-bound verotoxin (Shiga-like toxin). 1: Chemical identification of an amino acid in the B subunit necessary for efficient receptor glycolipid binding and cellular internalization. *J Cell Physiol* 161: 319–332
- Korten S, Anderson RJ, Hannan CM et al. (2005) Invariant Valpha14 chain NKT cells promote plasmodium berghei circumsporozoite protein-specific gamma interferon- and tumor necrosis factor alpha-producing CD8+ T cells in the liver after poxvirus vaccination of mice. *Infect Immun* 73: 849–858
- Kronenberg M, Gapin L (2002) The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* 2: 557–568
- Lingwood CA, Law H, Richardson S et al. (1987) Glycolipid binding of purified and recombinant escherichia coli produced verotoxin in vitro. *J Biol Chem* 262: 8834–8839
- Matsuda JL, Naidenko OV, Gapin L et al. (2000) Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J Exp Med* 192: 741–754
- Milland J, Christiansen D, Lazarus BD et al. (2006) The molecular basis for galalpha(1,3) gal expression in animals with a deletion of the alpha1,3galactosyltransferase gene. *J Immunol* 176: 2448–2454
- Okuda T, Tokuda N, Numata S et al. (2006) Targeted disruption of Gb3/CD77 synthase gene resulted in the complete deletion of globo-series glycosphingolipids and loss of sensitivity to verotoxins. *J Biol Chem* 281: 10230–10235
- Porcelli SA, Modlin RL (1999) The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu Rev Immunol* 17: 297–329
- Porubsky S, Speak AO, Luckow B et al. (2007) Normal development and function of invariant natural killer T cells in mice with isoglobotrihexosylceramide (iGb3) deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 5977–5982
- Sandvig K, Garred O, Prydz K et al. (1992) Retrograde transport of endocytosed shiga toxin to the endoplasmic reticulum. *Nature* 358: 510–512
- Stanic AK, De Silva AD, Park JJ et al. (2003) Defective presentation of the CD1d1-restricted natural Va14Ja18 NKT lymphocyte antigen caused by beta-D-glucosylceramide synthase deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 1849–1854
- Taniguchi M, Harada M, Kojo S et al. (2003) The regulatory role of Valpha14 NKT cells in innate and acquired immune response. *Annu Rev Immunol* 21: 483–513
- Wei DG, Curran SA, Savage PB et al. (2006) Mechanisms imposing the Vbeta bias of Valpha14 natural killer T cells and consequences for microbial glycolipid recognition. *J Exp Med* 203: 1197–1207
- Xia C, Yao Q, Schumann J et al. (2006) Synthesis and biological evaluation of alpha-galactosylceramide (KRN7000) and isoglobotrihexosylceramide (iGb3). *Bioorg Med Chem Lett* 16: 2195–2199
- Zhou D, Mattner J, Cantu C 3rd et al. (2004) Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science* 306: 1786–1789