

**Kooperation funktioneller Domänen des  
Adapterproteins SLP-65  
für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort in B-Lymphocyten**

Dissertation  
zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie  
der Universität Bielefeld

vorgelegt von  
**Nadine Herrmann**

November 2009



## Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jürgen Wienands für die Betreuung dieser Arbeit und die Unterstützung in den vergangenen Jahren. Dies gilt im Besonderen für das entgegengebrachte Vertrauen, die unzähligen fachlichen Ratschläge und die konstruktive Kritik, die entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Frey danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Allen meinen Kollegen und ehemaligen Kollegen danke ich für ein freundliches Arbeitsklima und die Unterstützung im Laboralltag.

Im Besonderen danke ich Michael und Ingo für ihre fachliche, sowohl praktische als auch theoretische Unterstützung und die gute Zusammenarbeit. Michael danke ich außerdem für die Durchführung der konfokalen Mikroskopie.

Ein besonderer Dank gilt meiner Diplomandin Insa für ihre tatkräftige Unterstützung im Labor, ihre Begeisterungsfähigkeit und die vielen rosa Momente im manchmal grauen Laboralltag.

Ich danke Maren und Gabi, deren praktische Unterstützung im Labor ich beanspruchen durfte, sowie Ines, Verena und allen anderen Kollegen, denen ich unzählige Gefallen schulde.

Kai und Alex danke ich vor allem dafür, dass sie mich während der ganzen Zeit unermüdlich motiviert und meine schlechten Tage mit dem breitesten Lächeln ertragen haben. Aber auch allen anderen Kollegen, die mir Mut gemacht und mich unterstützt haben, möchte ich danken.

Annika danke ich für ihre fachliche Unterstützung, Motivation und Beratung auch über die Zeit der Zusammenarbeit hinaus.

Allen meinen Freunden möchte ich für Ihren permanenten Zuspruch und Ihr Verständnis, vor allem in der letzten Zeit, danken.

Ich danke besonders meinen Mädels Nicole und Britta, die immer da sind, wenn die Welt gegen einen ist. Meine beiden Konstanten, die mir die Orientierung erleichtern.

Mein größter Dank gilt meiner Familie. Ich danke meinen Eltern für ihre emotionale Begleitung und ihren festen Glauben an mich. Ich danke meiner Schwester Yvonne für ihr immer offenes Ohr und ihre kompetente Beratung in allen Computer-Angelegenheiten. Sonja und Georg danke ich besonders für das Auffangen in schweren Zeiten. Opa und Oma danke ich für ihr Verständnis.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jürgen Wienands unter dessen wissenschaftlicher Anleitung an der Universität Bielefeld und der Georg-August-Universität Göttingen angefertigt. Die Arbeit wurde im Rahmen des EU-Projekts „HYBLIB“ gefördert.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

Abudula, A., Grabbe, A., Brechmann, M., Polaschegg, C., Herrmann, N., Goldbeck, I., Dittmann, K. and Wienands, J. (2007). SLP-65 Signal Transduction Requires Src Homology 2 domain-mediated Membrane Anchoring and a Kinase-independent Adaptor Function of Syk. *J Biol Chem* **282**, 29059-29066.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Summary .....	2
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>3</b>
2.1	Aufbau des BCR.....	4
2.2	Initiation der BCR-Signalleitung .....	5
2.3	Initiation der TCR-Signalleitung.....	8
2.4	Direkte und indirekte Membranlokalisation von Proteinen .....	9
2.5	Das Adapterprotein SLP-65 .....	10
2.6	Koordination des Ca <sup>2+</sup> -Initiationskomplexes durch SLP-65.....	12
<b>3</b>	<b>Ziele der Arbeit</b> .....	<b>15</b>
<b>4</b>	<b>Materialien</b> .....	<b>16</b>
4.1	Chemikalien und Reagenzien .....	16
4.2	Sonstige Materialien.....	16
4.3	Geräte .....	16
4.4	Aufreinigungs- und Reaktionssysteme.....	17
4.5	Puffer und Lösungen.....	18
4.6	Medien.....	19
4.6.1	Medien und Nährböden für Bakterien .....	19
4.6.2	Zellkulturmedien.....	19
4.7	Enzyme .....	20
4.8	Antikörper .....	20
4.8.1	Primärantikörper.....	20
4.8.2	Sekundärantikörper.....	21
4.9	Zelllinien .....	22
4.9.1	Suspensionszelllinien.....	22
4.9.2	Adhärente Zelllinien .....	22
4.9.3	Bakterienstämme .....	22

---

4.10	Vektoren .....	23
4.11	cDNA .....	23
4.12	Oligonukleotide .....	24
4.13	Konstrukte.....	26
<b>5</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>29</b>
5.1	Molekularbiologische Methoden.....	29
5.1.1	Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen.....	29
5.1.2	Transformation von kompetenten Bakterienzellen.....	29
5.1.3	Kultivierung und Lagerung von Bakterien .....	29
5.1.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen.....	30
5.1.5	RNA-Isolierung.....	30
5.1.6	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	30
5.1.7	Reverse Transkription.....	30
5.1.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	31
5.1.9	T/A-Klonierung .....	33
5.1.10	Restriktionsspaltung.....	33
5.1.11	Dephosphorylierung.....	34
5.1.12	Ligation.....	34
5.1.13	Agarosegelelektrophorese .....	34
5.1.14	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	34
5.1.15	DNA-Sequenzierung .....	34
5.2	Methoden der Zellkultur.....	35
5.2.1	Allgemeines.....	35
5.2.2	Kultivierung von Suspensionszellen.....	35
5.2.3	Kultivierung von adhärennten Zellen.....	35
5.2.4	Einfrieren von eukaryotischen Zellen .....	35
5.2.5	Auftauen von eukaryotischen Zellen .....	35
5.2.6	Zellzählung.....	36
5.2.7	Transfektion von DT40 Zellen mittels Elektroporation .....	36
5.2.8	Infektion von DT40 Zellen mit rekombinanten Retroviren (Stork <i>et al.</i> 2004) .....	36
5.2.9	Expressionsanalyse von Fluorophor-markierten Proteinen und Oberflächen IgM mittels Durchflusscytometrie .....	37
5.2.10	Ca <sup>2+</sup> -Messungen am Durchflusscytometer .....	38
5.2.11	Konfokale <i>laser-scanning</i> Mikroskopie.....	38

---

5.3	Biochemische Methoden .....	39
5.3.1	Expression von GST-Fusionsproteinen .....	39
5.3.2	Expression von His <sub>6</sub> -Fusionsproteinen .....	40
5.3.3	Stimulation und Lyse von eukaryotischen B-Zellen .....	40
5.3.4	Immunpräzipitation.....	41
5.3.5	Affinitätspräzipitationen mit GST-Fusionsproteinen oder Calmodulin-Agarose .....	41
5.3.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	41
5.3.7	Anfärben von Polyacrylamidgelen mittels <i>Coomassie Brilliant Blue</i> (CBB) ..	42
5.3.8	Westernblotting .....	42
5.3.9	PIP-strip™-assay .....	43
<b>6</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>44</b>
6.1	Analysen zum N-Terminus von SLP-65 .....	44
6.1.1	Aminosäureaustausche im postulierten Leucin-Zipper-Motiv stellen dessen Funktion für die Initiation der B-Zell-Signalleitung in Frage. ....	44
6.1.2	Die BED vermittelt eine direkte Bindung von SLP-65 mit Calmodulin in Anwesenheit von Calciumionen. ....	46
6.1.3	Die kritische Ca <sup>2+</sup> -Konzentration für die Interaktion von SLP-65-BED und Calmodulin liegt im Bereich der cytosolischen Ca <sup>2+</sup> -Konzentration von stimulierten Zellen. ....	51
6.1.4	Die Interaktion von SLP-65 und Calmodulin ist unabhängig von bekannten oder möglichen stimulationsabhängigen Modifikationen dieser Proteine. ..	52
6.1.5	Ein Aminosäureaustausch I25K im zweiten Calmodulin-bindemotiv unterbindet die Interaktion der isolierten BED mit Calmodulin. ....	55
6.1.6	Vollständiges, in B-Zellen-exprimiertes SLP-65 kann trotz Aminosäureaustausch I25K mit Calmodulin interagieren.....	58
6.1.7	SLP-65 Δ20 bindet kein Calmodulin und zeigt moderate Ca <sup>2+</sup> -Mobilisierung. ....	59
6.1.8	Die BED von SLP-65 vermittelt dessen Bindung mit Phosphoinositolphosphaten <i>in vitro</i> .....	61
6.1.9	Die Substitution der BED von SLP-65 durch das PIP-Bindemotiv von TIRAP resultiert in einem signalkompetenten Protein. ....	65
6.2	Kooperation der N-terminalen BED und der C-terminalen SH2-Domäne von SLP-65 .....	69
6.2.1	Für die Signalkompetenz von SLP-65 ist eine funktionelle SH2-Domäne essentiell. ....	69



---

6.2.2	Die essentiellen Domänen für die Membranrekrutierung von SLP-65, BED und SH2-Domäne, kooperieren <i>in cis</i> .	72
6.2.3	Die SH2-Domäne von SLP-65 vermittelt die Lokalisation in Signalmikrodomänen nahe des BCR.	76
<b>7</b>	<b>Diskussion</b>	<b>83</b>
7.1	Die N-terminale, basische Effektor-domäne von SLP-65	84
7.1.1	Eine Leucin-Zipper-Funktion innerhalb der BED von SLP-65 ist für die Membranrekrutierung nicht entscheidend.	84
7.1.2	Die BED interagiert $Ca^{2+}$ -abhängig mit Calmodulin.	86
7.1.3	Die BED als PIP-Bindedomäne.	90
7.1.4	BED – eine PIP- $Ca^{2+}$ /Calmodulin-Regulationseinheit?	94
7.2	Die Rolle der SH2-Domäne von SLP-65 bei der Rekrutierung des $Ca^{2+}$ -Initiationskomplexes.	96
7.2.1	BED und SH2-Domäne von SLP-65 kooperieren <i>in cis</i> .	96
7.2.2	Die SH2-Domäne vermittelt die Lokalisation von SLP-65 in BCR-nahe Signalmikrodomänen.	97
7.3	Modell zum Mechanismus der Membranrekrutierung von SLP-65 in B-Zellen.	100
<b>8</b>	<b>Literatur</b>	<b>103</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>117</b>
9.1	Abbildungsverzeichnis.	117
9.2	Tabellenverzeichnis.	118

## I. Abkürzungen

ALL	Akute Lymphoblastoide Leukämie
ALV	<i>avian leucosis virus</i>
ANTH	<i>AP 180 N-terminus homology</i>
AP	Affinitätspräzipitation
APC	<i>antigen presenting cell</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BASH	<i>B cell adaptor containing an SH2 domain</i>
BCR	<i>B cell antigen receptor</i>
BED	basische Effektordomäne
Blk	<i>B cell lymphoma kinase</i>
BLNK	<i>B cell linker</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
Btk	<i>Bruton's tyrosine kinase</i>
C1	<i>conserved domain 1</i>
C2	<i>conserved domain 2</i>
CaM	Calmodulin
CARMA1	<i>caspase recruitment domain-containing membrans-associated guanylate kinase protein 1</i>
CCL	<i>cleared cellular lysate</i>
cDNA	<i>complementary DNA/copy DNA</i>
CIP	<i>calf intestine phosphatase</i>
Cit	Citrin
CLNK	<i>cytokine-dependent hemopoietic linker</i>
CS	<i>chicken serum</i>
Csk	<i>C-terminal Src kinase</i>

---

Δ	Deletion
DAG	Diacylglycerol
DIG	<i>detergent-insoluble glycolipid-rich membranes</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DRM	<i>detergent-resistant membranes</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemical luminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N',N',-tetraessigsäure
ENTH	<i>Epsin N-terminus homology</i>
<i>env</i>	<i>envelope</i> , Gen codierend für Glycoprotein 160
ER	endoplasmatisches Retikulum
Erk	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorter</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FERM	Domäne benannt nach vier Proteinen: <u>4.1 protein</u> , <u>Epsin</u> , <u>Radoxin</u> , <u>Moesin</u>
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
Fyn	<i>frg/yes-related novel PTK</i>
FYVE	Domäne benannt nach vier Proteinen: Fab1p, YOTB, Vac1p, EEA1
Gads	<i>Grb2-related adaptor downstream of Shc</i>
<i>gag</i>	Gen codierend für p55 ( <i>core protein</i> )
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GEM	<i>glycophospholipid-enriched microdomains</i>
Grb2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>

---

GRP	<i>guanine nucleotide releasing protein</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Hämagglutinin
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1piperazinyl]-ethansulfonsäure
HPK1	<i>hematopoetic progenitor kinase 1</i>
HRPO	<i>horseradish peroxidase</i>
Ig	Immunglobulin
I $\kappa$ B	<i>inhibitor of <math>\kappa</math> B</i>
IKK	<i>I<math>\kappa</math>B kinase</i>
IP	Immunpräzipitation
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP3R	IP <sub>3</sub> -Rezeptor
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
Itk	<i>IL-2-inducible T cell kinase</i>
LAT	<i>linker for activation of T cells</i>
LTR	<i>long terminal repeats</i>
Lyn	<i>lck/yes-related novel kinase</i>
LPA	<i>lysophosphatic acid</i>
LPC	Lysophosphocholin
MALT	<i>mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1</i>
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MHCII	major histocompatibility complex II
mIg	membranständige Ig
MIST	<i>mast cell immunoreceptor signal transducer</i>
MMLV	moloney leukemia virus
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure

---

Nck	<i>non-catalytic region of tyrosine kinase</i>
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NF $\kappa$ B	<i>nuclear factor for <math>\kappa</math> gene in B lymphocytes</i>
NP-40	Nonidet P40
NTAL	<i>non-T cell activation linker</i>
OD	optische Dichte
PA	<i>phosphatic acid</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PC	Phosphatidylcholin
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phosphatidylethanolamin
PH	<i>pleckstrin homology</i>
pI	isoelektrischer Punkt
PI	Phosphatidylinositol
PI3K	<i>phosphatidylinositol 3'-kinase</i>
PI(3)P	Phosphatidylinositol-3-phosphat
PI(4)P	Phosphatidylinositol-4-phosphat
PI(5)P	Phosphatidylinositol-5-phosphat
PI(3,4)P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat
PI(3,5)P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphat
PI(4,5)P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PI(3,4,5)P <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PIP	Phosphatidylinositolphosphat
PKC	<i>protein kinase C</i>
PKC- $\beta$	<i>protein kinase C<math>\beta</math></i>
PLC- $\delta$ 1	<i>phospholipase C<math>\delta</math>1</i>
PLC- $\gamma$ 1	<i>phospholipase C<math>\gamma</math>1</i>

---

PLC- $\gamma$ 2	<i>phospholipase C<math>\gamma</math>1</i>
<i>pol</i>	Gen codierend für retrovirale Protease, reverse Transkriptase und Integrase
PS	Phosphatidylserin
PTK	protein tyrosine kinase
pTyr	Phosphotyrosin
pY	Phosphotyrosin
PX	<i>phox homology</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	reverse Transkription; Raumtemperatur
S1P	Sphingosin-1-phosphat
SDS	Sodiumdodecylphosphat
SH	<i>Src homology</i>
SLP-65	<i>SH2 domain-containing leukocyte adaptor protein of 65 kDa</i>
SLP-76	<i>SH2 domain-containing leukocyte adaptor protein of 76 kDa</i>
SOC	<i>store-operated Ca<sup>2+</sup> channel</i>
<i>src</i>	<i>rous sarcoma virus</i>
STIM1	<i>stromal interaction molecule 1</i>
Syk	<i>spleen tyrosine kinase</i>
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
Tec	<i>Tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TIRAP	<i>TIR domain-containing adaptor protein</i>
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolet

Vav	<i>vav oncogene</i>
VSV-G	<i>vesicular stomatitis virus glycoprotein</i>
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
wt	Wildtyp bzw. wildtypisch
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
Xid	<i>X-linked immunodeficiency</i>
XLA	<i>X-linked agammaglobulinemia</i>
ZAP-70	<i>zeta-associated protein of 70 kD</i>

## II. Präfixe, Einheiten und Größen

<b>k</b>	kilo	<b>min</b>	Minute	<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>c</b>	centi	<b>s</b>	Sekunde	<b>A</b>	Ampere
<b>m</b>	milli	<b>m</b>	Meter	<b>V</b>	Volt
<b><math>\mu</math></b>	micro	<b>L</b>	Liter	<b>F</b>	Farad
<b>n</b>	nano	<b>M</b>	molar	<b>rpm</b>	<i>revolutions per minute</i>
<b>p</b>	pico	<b>g</b>	Gramm	<b>xg</b>	$\times 9,80665 \text{ m/s}^2$
		<b>Da</b>	Dalton		(Erdbeschleunigung)
		<b>U</b>	<i>Unit</i> (Enzymeinheit)		

## III. Nukleotide

Abkürzung	Nukleotid
A	Desoxyadenylat
C	Desoxycytidylat
G	Desoxyguanylat
T	Desoxythymidylat

## IV. Aminosäuren

Aminosäure	Abkürzung	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V



# 1 Zusammenfassung

Die spezifische Antigenerkennung durch B-Zellen erfolgt über deren Antigenrezeptor (BCR) und resultiert in einer Reihe intrazellulärer Signale. Ein Schlüsselement der BCR-Signalleitung ist die Rekrutierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes, bestehend aus SLP-65, PLC- $\gamma$ 2 und Btk, an die Plasmamembran. Der genaue Mechanismus dieser SLP-65-vermittelten Lokalisation ist bislang unklar. Als wichtige Komponente wurde im Jahr 2005 die N-terminale Region von SLP-65 beschrieben und eine Leucin-Zipper-Funktion postuliert. Durch gezielte Inaktivierung des zugehörigen Motivs konnte ich jedoch zeigen, dass ein Leucin-Zipper nicht für die korrekte subzelluläre Organisation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes verantwortlich ist. Stattdessen habe ich die Funktion auf die basischen Eigenschaften dieser Region zurückgeführt und sie als basische Effektdomäne (BED) bezeichnet. Desweiteren konnte ich Calmodulin als neuen Bindungspartner der BED identifizieren.  $\text{Ca}^{2+}$ -konzentrationsabhängige Interaktionsstudien zusammen mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierungskinetiken in Zellen, welche unterschiedliche, nicht mehr mit Calmodulin-interagierende SLP-65-Varianten exprimieren, lassen eine der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung nachgeschaltete Funktion vermuten. Die Bedeutung der BED für den Mechanismus der Membranlokalisation konnte ich einem anderen Aspekt zuordnen. So habe ich eine direkte, BED-vermittelte Interaktion von SLP-65 mit Lipidbestandteilen von Zellmembranen, nämlich Phosphatidylinositolphosphaten (PIP), *in vitro* nachgewiesen. Die funktionelle Relevanz konnte ich *in vivo* bestätigen, denn das bekannte PIP-Bindemotiv des Adapterproteins TIRAP konnte die BED funktionell ersetzen. Dies legt nahe, dass die BED durch direkte Interaktion mit PIP zur Membranlokalisation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes beiträgt. Ferner konnte ich zum funktionellen Verständnis der SH2-Domäne von SLP-65 als zweite, essentielle Komponente für die Membranrekrutierung beitragen. Durch Koexpression von SLP-65-Varianten, denen BED oder SH2-Domäne fehlen, konnte ich eine *in cis* Kooperation beider Domänen zeigen. Um diese näher zu charakterisieren, wurden SLP-65-Chimären, bei denen BED durch verschiedene Membranrekrutierungsdomänen substituiert war, generiert. Kombiniert mit der Inaktivierung der SH2-Domäne innerhalb dieser Proteine, war die Analyse einer individuellen Funktion der SH2-Domäne möglich. Die Ergebnisse zeigten, dass eine einfache Membranlokalisation nicht ausreicht, um beide Membrananker zu ersetzen, sondern das Protein darüber hinaus in BCR-nahe Signalzentren in Membranmikrodomänen lokalisiert werden muss. Hierfür ist die SH2-Domäne verantwortlich.

Die Studien zeigen, dass die Membranrekrutierung von SLP-65 einem komplexen Mechanismus unterliegt, der die konzertierte Funktion mindestens zweier Domänen benötigt. Mein Modell schlägt vor, dass BED durch eine direkte PIP-Bindung zur Membranrekrutierung von SLP-65 beiträgt und zusammen mit der SH2-Domäne in einer zweiarmigen Verankerung das Protein an der Plasmamembran stabilisiert. Die SH2-Domäne bestimmt darüber hinaus die konkrete Lokalisation des Proteins, und damit des  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes, in definierten Signalplattformen, den *lipid rafts*.

## 1.1 Summary

Specific antigen recognition by B cells is mediated via their antigen receptor (BCR), resulting in several intracellular signaling events. The recruitment of the  $\text{Ca}^{2+}$  initiation complex, consisting of SLP-65, PLC- $\gamma$ 2 and Btk, to the plasma membrane is a key element of BCR signal transduction. The exact mechanism of this SLP-65-mediated localization remains obscure. In 2005 the N-terminus of SLP-65 was described as an important component and a leucine-zipper-function was postulated. However, I could show by targeted inactivation of this motif, that a leucine-zipper is not responsible for the correct subcellular organisation of the  $\text{Ca}^{2+}$  initiation complex. The function depended rather on the basic characteristics of this region, which I name basic effector domain (BED). Furthermore, I could identify Calmodulin as a new BED-dependent binding partner of SLP-65.  $\text{Ca}^{2+}$  concentration-dependent interaction studies, as well as  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization kinetics of cells expressing SLP-65 variants that do not bind Calmodulin, suggest a function downstream of the  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization. However, the importance of BED for the membrane localization of SLP-65 could be attributed to a different aspect. I showed a BED-mediated interaction of SLP-65 directly with lipid components of cell membranes *in vitro*, namely phosphatidylinositol-phosphates (PIP). I confirmed the functional relevance *in vivo* showing that the defined PIP binding motif of the adaptor protein TIRAP can fully substitute BED. This suggests that a direct interaction of BED with PIP is involved in membrane localization of SLP-65 and thus of the  $\text{Ca}^{2+}$  initiation complex. I also contributed to the functional understanding of the SH2 domain as the second essential component for membran recruitment of SLP-65. By co-expression of SLP-65 variants lacking BED or SH2 domain, I could show an *in cis* cooperation of these domains. To characterize this in more detail chimeric SLP-65 variants were generated, in which BED was replaced by various membrane recruitment domains. Additional inactivation of the SH2 domain within these proteins allowed analysis of an individual function of the SH2 domain. The results demonstrated that simple membrane localization is not sufficient to substitute for both membrane anchors of SLP-65. Instead, the protein must localize specifically to BCR-proximal signalling compartments within membrane microdomains. This is mediated by the SH2 domain.

The results show that membrane recruitment of SLP-65 underlies a complex mechanism requiring the concerted function of at least two domains. The model I propose is, that BED contributes to SLP-65 membrane recruitment by direct PIP-binding and together with the SH2 domain stabilizes SLP-65 at the plasma membrane by a two-armed anchoring. The SH2 domain additionally mediates a specific localization of the protein, and therefore the  $\text{Ca}^{2+}$  initiation complex, in defined signalling platforms, the lipid rafts.

## 2 Einleitung

Das Immunsystem der Vertebraten umfasst eine Vielzahl von Mechanismen zum Schutz des Organismus vor Pathogenen. Dabei wird zwischen der sogenannten angeborenen und der erworbenen Immunität unterschieden. Erstere ist von Geburt an vorhanden und basiert, neben den natürlichen Schutzbarrieren der Haut, auf der Erkennung von Mustern pathogenassoziierter Oberflächenstrukturen. Die dafür verantwortlichen Rezeptoren sind genetisch festgelegt und verändern sich im Laufe des Lebens nicht. Anders ist es bei der adaptiven oder erworbenen Immunität. Hier entwickelt sich ein riesiges Repertoire an hochspezifischen Rezeptoren. Durch Kontakt mit Pathogenen werden diese spezialisiert und in ihrer Erkennung optimiert. Bei einer wiederholten Infektion mit dem gleichen Pathogen kann dann eine schnelle und effiziente Immunantwort ausgelöst und der Erreger bekämpft werden. Das Immunsystem hat gelernt.

Die Zellen, welche diese antigenspezifischen Rezeptoren auf der Oberfläche exprimieren, sind die B- und T-Lymphocyten. Beide entstehen aus pluripotenten hämatopoietischen Stammzellen über lymphoide Vorläuferzellen. Während die B-Zellen im Knochenmark reifen, findet die Reifung der T-Zellen im Thymus statt. Schon durch somatische Rekombination von in der Keimbahn festgelegten zahlreichen Gensegmenten, welche für variable Regionen der Antigenrezeptoren codieren, kommt es zu einer einzigartigen Diversität (Schatz *et al.* 1992; Wagner und Neuberger 1996). Bei B-Zellen wird diese während der Affinitätsreifung durch sogenannte somatische Hypermutation noch gesteigert und die Antigenerkennung weiter optimiert.

B-Zellen sind für die Produktion spezifischer Antikörper, auch als Immunglobuline (Ig) bezeichnet, verantwortlich. Diese binden Antigene und leiten deren Eliminierung durch Fresszellen oder das Komplementsystem ein. Darüber hinaus können B-Zellen als Antigen-präsentierende-Zellen (*antigen presenting cell*, APC) zur Aktivierung von T-Zellen beitragen.

Der Mechanismus der Rezeptorentstehung erfordert ein strenges Kontrollsystem, um zum einen funktionelle Rezeptoren zu bilden, zum anderen den Organismus vor der Selbsterkennung durch das eigene Immunsystem zu schützen. Wichtige Kontrollpunkte sind während der B-Zell-Entwicklung zu passieren und finden abgeschirmt von Fremdantigenen statt. Im Stadium der Prä-B-Zellen wird über die Expression eines Prä-B-Zell-Antigenrezeptor (*pre B cell antigen receptor*, pre-BCR) die korrekte Genumlagerung der schweren Ketten kontrolliert. Unreife B-Zellen werden körpereigenen Antigenen ausgesetzt und aktivierte Zellen eliminiert oder inaktiviert, so dass nur nicht-autoreaktive B-Lymphocyten das nächste Entwicklungsstadium erreichen (Cornall *et al.* 1995; Rolink *et al.* 1999; Reichlin *et al.* 2001).

Reife, naive B-Zellen benötigen einen zusätzlichen Mechanismus der Kontrolle durch kostimulatorische Signale, um eine Aktivierung zu erfahren und zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen oder Gedächtnis-B-Zellen zu differenzieren.

## 2.1 Aufbau des BCR

Die Antigenerkennung der B-Zellen erfolgt über den B-Zell-Antigenrezeptor (*B cell antigen receptor*, BCR). Der BCR ist ein Multiproteinkomplex, bestehend aus einer Antigen-erkennenden Untereinheit, dem membranständigen Immunglobulin (mIg), und den signalleitenden Untereinheiten Ig- $\alpha$  (CD79a) und Ig- $\beta$  (CD79b) (Reth *et al.* 1991; Reth 1992; Sanchez *et al.* 1993; Reth und Wienands 1997). Das mIg besteht aus zwei schweren (*heavy*) H-Ketten von ca. 50 kDa und zwei leichten (*light*) L-Ketten von ca. 25 kDa, welche durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind (Campbell und Cambier 1990; Hombach *et al.* 1990; Wienands *et al.* 1990). Die Antigenerkennung erfolgt über die variable V-Region, welche von den amino-(N-)terminalen Domänen der schweren und leichten Ketten gebildet wird. Die konstanten carboxy-(C-)terminalen Regionen unterscheiden sich je nach Isotyp in Anzahl der Ig-Domänen und Glykosylierungsgrad. Es gibt fünf Klassen von Immunglobulinen, die sich über die Struktur der schweren Kette definieren, IgM, IgD, IgG, IgE und IgA (Reth 1992; Neuberger *et al.* 1993). Der während der B-Zell-Entwicklung auf Prä-B-Zellen exprimierte pre-BCR besitzt an Stelle der variablen leichten Ketten invariante Ersatzketten (*surrogate light chain*). Die signalleitende Komponente des BCR wird durch ein Heterodimer aus den beiden Typ I-Transmembranproteinen Ig- $\alpha$  und Ig- $\beta$  gebildet (Hombach *et al.* 1988; Hombach *et al.* 1990; Sanchez *et al.* 1993; Reth und Wienands 1997). Beide Proteine zeichnet eine extrazelluläre Immunglobulindomäne, eine  $\alpha$ -helikale Transmembranregion und eine cytoplasmatische Region von 61 bzw. 48 Aminosäureresten aus. Antigen-erkennende und signalleitende Untereinheiten des BCR können nicht isoliert auf der Zelloberfläche exprimiert werden, sondern nur als Komplex, welcher über nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten stabilisiert wird. Die durch die Gene *mb-1* und *B29* codierten, signalleitenden Untereinheiten des BCR, Ig- $\alpha$  und Ig- $\beta$ , weisen jeweils ein *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM) in der C-terminalen, cytoplasmatischen Region auf (Sanchez *et al.* 1993; Flaswinkel und Reth 1994; Taddie *et al.* 1994; Taddie *et al.* 1994). Hierbei handelt es sich um ein definiertes Motiv D/Ex<sub>7</sub>D/ExxYxxL/I-x<sub>(6-8)</sub>-YxxL/I (Einbuchstabencode für Aminosäuren; x ist ein beliebiger Rest), welches auch in den signalleitenden Untereinheiten des T-Zell-Rezeptors (TCR), CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ , CD3 $\gamma$  (je einmal) und der  $\zeta$ -Kette (dreimal), sowie in verschiedenen Fc-

Rezeptor-Untereinheiten vorkommt. Über diese ITAM erfolgt die Kopplung der Rezeptoren, welche keine eigene enzymatische Aktivität besitzen, an Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK), welche die weitere Signalleitung vermitteln.

Im Gegensatz zu Ig- $\beta$  weist Ig- $\alpha$  einen zusätzlichen Tyrosinrest in Position 204 (für die Spezies Maus) auf, der zwischen den Spezies konserviert ist und ebenfalls nach Stimulation phosphoryliert wird (Engels *et al.* 2001). Das hier auftretende Motiv YxDV (Einbuchstabencode für Aminosäuren; x ist ein beliebiger Rest) ist ein Bindemotiv für die SH2-Domäne des Adapterproteins SLP-65/BASH/BLNK (Fu *et al.* 1998; Goitsuka *et al.* 1998; Wienands *et al.* 1998).

## 2.2 Initiation der BCR-Signalleitung

Die Plasmamembran eukaryotischer Zellen ist eine heterogene Lipiddoppelschicht. Verschiedene Lipide und Membranproteine sind Bestandteile und bedingen durch ihre unterschiedlichen Eigenschaften die Heterogenität der Membranen (van Meer *et al.* 2008). Sogenannte *lipid rafts*, auch *membrane rafts*, *detergent-resistant membranes* (DRM), *glycophospholipid-enriched microdomains* (GEM) oder *detergent-insoluble glycolipid-rich membranes* (DIG) sind nach heutiger Definition charakterisiert durch Sterol- und Sphingolipid-reiche, dynamische Strukturen in der Plasmamembran von ca. 10-200 nm<sup>2</sup> Größe (Pike 2006). Sie bilden Signalplattformen und können bestimmte Proteine bevorzugt aufnehmen oder ausschließen. In unstimulierten B-Zellen ist der BCR außerhalb von *lipid rafts* lokalisiert (Cheng *et al.* 1999; Aman und Ravichandran 2000; Dillon *et al.* 2000; Petrie *et al.* 2000; Gupta und DeFranco 2003). Nach Antigenbindung erfolgt eine Translokation in die *lipid rafts*. Weiterhin kommt es nach Ligandenbindung zur Aktivierung von durch Acylketten in der Membran verankerten Src-Kinasen (*lck/yes-related novel kinase*, Lyn, *frg/yes-related novel PTK*, Fyn und *B cell lymphoma kinase* Blk) (Burkhardt *et al.* 1991; Sefton und Campbell 1991). Diese, vornehmlich Lyn, phosphorylieren Tyrosinreste innerhalb der ITAM von Ig- $\alpha$  und Ig- $\beta$  und stellen damit die Bindestellen für die N-terminale Tandem-SH2-Domäne der PTK *spleen tyrosine kinase* (Syk) zur Verfügung (Wienands *et al.* 1995; Futterer *et al.* 1998). SH2 (*src homology*)-Domänen sind Protein-Protein-Interaktionsdomänen von etwa 100 Aminosäuren, die an Tyrosin-phosphorylierte Peptidmotive binden können (Songyang *et al.* 1993). Sie können so die Formation von Signalkomplexen unterstützen, die Lokalisation eines Proteins bestimmen, aber auch eine regulatorische Funktion ausüben. Durch die Bindung an phosphorylierte Tyrosine der ITAM wird Syk zur Plasmamembran lokalisiert und gleichzeitig ihre Kinase-Aktivität verstärkt (Johnson *et al.* 1995). Es erfolgt die vollständige

Aktivierung von Syk zum einen durch autokatalytische Phosphorylierung durch Syk selbst, zum anderen durch Src-Kinasen vermittelte *in trans* Phosphorylierung (Kurosaki *et al.* 1994; Kurosaki *et al.* 1995; Kimura *et al.* 1996). Der genaue Mechanismus der initialen Signalereignisse sind bis heute Gegenstand intensiver Forschung, wobei die Rolle der *lipid rafts* in den letzten Jahren immer mehr in den Vordergrund gerückt ist. Durch die Fusion von Fluorophoren mit dem Myristoylierungs- und Palmitoylierungsmotiv von Lyn oder durch Anfärben von Glangliosid GM1 ist die Visualisierung von *lipid rafts in vivo* möglich (Gupta und DeFranco 2003). Nach BCR-Stimulation kommt es zur Aggregation der *rafts* und zur Kolokalisation mit dem BCR. Erhöhte Protein-Tyrosin-Phosphorylierungen konnten in diesen Mikrodomänen *in vivo* gezeigt werden. Im Gegensatz zum BCR ist der pre-BCR konstitutiv mit *lipid rafts* assoziiert (Guo *et al.* 2000). Während der B-Zell-Entwicklung ist die Expression des pre-BCR auf Prä-B-Zellen und die durch ihn vermittelte Signalgebung nötig, um den nächsten Entwicklungsschritt der B-Zelle einzuleiten. Obwohl pre-BCR-Liganden auf Stromazellen identifiziert wurden, kann eine Differenzierung auch *in vitro* ohne eine zusätzliche zelluläre Umgebung erfolgen (Rolink *et al.* 2000; Bradl und Jack 2001; Gauthier *et al.* 2002). Wie es zu dieser Signalgebung kommt und ob ein Ligand nötig ist, ist bisher nicht eindeutig geklärt.

Ist die PTK Syk aktiviert, kann sie eine Reihe von Signalproteinen phosphorylieren. Ein Substrat von Syk ist *SH2 domain-containing leukocyte protein of 65 kDa* (SLP-65, auch *B cell linker* BLNK oder *B cell adaptor containing SH2 domain* BASH) (Fu *et al.* 1998; Goitsuka *et al.* 1998; Wienands *et al.* 1998). Die Phosphorylierung von SLP-65 generiert Bindestellen für die SH2-Domänen von Phospholipase C- $\gamma$ 2 (PLC- $\gamma$ 2) und *Bruton's tyrosine kinase* (Btk), die zusammen mit SLP-65 den  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplex bilden (Hashimoto *et al.* 1999; Ishiai *et al.* 1999; Chiu *et al.* 2002). Btk ist eine Kinase der Tec-Familie und wird durch Lyn und Syk phosphoryliert und aktiviert (Rawlings *et al.* 1996; Kurosaki und Kurosaki 1997), was in der Phosphorylierung und somit Aktivierung von PLC- $\gamma$ 2 resultiert. Aktivierte PLC- $\gamma$ 2 spaltet dann Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI(4,5)P<sub>2</sub>) in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) und stellt somit diese *second messenger* bereit (Kurosaki *et al.* 2000).

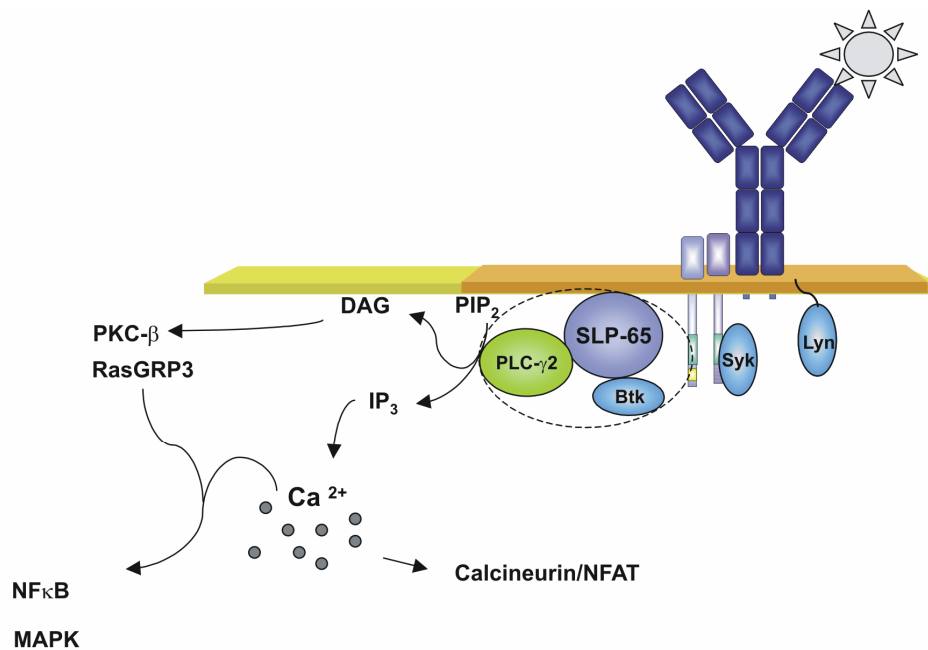
IP<sub>3</sub> bindet IP<sub>3</sub>-Rezeptoren (IP<sub>3</sub>R) in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) und löst so die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus diesen intrazellulären Speichern aus (Kurosaki *et al.* 2000; Patterson *et al.* 2004; Engelke *et al.* 2007). Dies wiederum führt zur Öffnung von *store operated Ca<sup>2+</sup> channels* (SOC), wodurch ein zusätzlicher Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem extrazellulären Raum über die Plasmamembran in die Zelle erfolgt. Die funktionelle Verknüpfung von Speicherentleerung und Aktivierung der SOC ist bislang

nicht vollständig geklärt, erfolgt aber wahrscheinlich über das Typ II Transmembranprotein *stromal interaction molecule* (STIM), welches in der Membran des ER lokalisiert ist (Williams *et al.* 2001). Dieses Protein beinhaltet eine N-terminale, als EF-Hand bezeichnete,  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Domäne, welche in das Lumen des ER ragt. Bei abnehmender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im ER kommt es zur Aggregation von STIM und Lokalisation zur Plasmamembran, wo die Regulation von *calcium-release activated calcium* (CRAC) -Kanälen erfolgt (Zhang *et al.* 2005; Baba *et al.* 2006).

Der Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt zur Aktivierung einer Reihe von  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierten Enzymen, wie der Phosphatase Calcineurin. Diese wird durch Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin aktiviert und dephosphoryliert Serin- und Threoninreste des Transkriptionsfaktors NFAT (*nuclear factor of activated T cells*), was dessen Translokation in der Nukleus der Zelle ermöglicht (Choi *et al.* 1994; Venkataraman *et al.* 1994; Timmerman *et al.* 1997).

DAG als zweites Spaltprodukt von PLC- $\gamma$ 2 ist ein Membran-assoziiertes *second messenger*, der die Rekrutierung und Aktivierung von Proteinkinase C (PKC)- $\beta$  vermittelt. Diese Kinase benötigt für ihre Aktivierung ebenfalls  $\text{Ca}^{2+}$ , welches in der regulatorischen C2-Domäne bindet. PKC- $\beta$  vermittelt die NF $\kappa$ B- Aktivierung in B-Zellen wahrscheinlich über eine CARMA1/MALT/TAK-induzierte IKK-Aktivierung und somit die I $\kappa$ B-Phosphorylierung und Degradierung (Saijo *et al.* 2002; Shinohara *et al.* 2005).

DAG rekrutiert ebenfalls *ras guanine nucleotide-releasing protein 1* und 3 (RasGRP1 und RasGRP3), deren Aktivierung wiederum PKC-abhängig ist (Tognon *et al.* 1998; Oh-Hora *et al.* 2003; Aiba *et al.* 2004). RasGRP3 scheint der Hauptfaktor in der Einleitung der Ras-Signalkaskade in B-Zellen zu sein, resultierend in einer Reihe von Ereignissen, wie der Aktivierung der MAP-Kinase *extracellular signal regulated kinase* (Erk), welche den Transkriptionsfaktor Elk-1 aktiviert (Oh-Hora *et al.* 2003).



**Abb. 2.1: Initiierung der BCR-Signalleitung modifiziert nach (Engelke et al. 2007).** Nach Antigenbindung transloziert der BCR in *lipid rafts* (braun), wo Lyn lokalisiert ist. Es erfolgt die Phosphorylierung der ITAM durch Lyn und die Rekrutierung von Syk über deren Tandem-SH2-Domäne. Der Ca<sup>2+</sup>-Initiationskomplex bestehend aus SLP-65, PLC-γ2 und Btk wird ebenfalls an die Membran rekrutiert, wobei der genaue Mechanismus nicht bekannt ist. PLC-γ2 kann nun vollständig aktiviert werden und PI(4,5)P<sub>2</sub> zu DAG und IP<sub>3</sub> spalten. IP<sub>3</sub> bindet Rezeptoren des ER, was zur Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus diesen Speichern und folgend auch über die Plasmamembran führt. Der Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration aktiviert eine Reihe von Enzymen, wie die Phosphatase Calcineurin, was zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT führt. DAG ist für die Rekrutierung von RasGRP3 und PKC-β und, zusammen mit Ca<sup>2+</sup>, für deren Aktivierung verantwortlich, was z. B. in NFκB- oder MAP-Kinase Aktivierungen resultiert.

### 2.3 Initiierung der TCR-Signalleitung

Die molekularen Mechanismen der Initiierung der Signalleitung sind in T-Zellen ähnlich wie in B-Zellen (Leo et al. 2002). Auch hier erfolgt nach Stimulation die Phosphorylierung von ITAM-Tyrosinresten in den signalleitenden Untereinheiten (CD3δ, CD3ε, CD3γ und ζ-Kette) des T-Zell Rezeptors (*T cell receptor*, TCR). ZAP-70 (*zeta associated protein of 70 kD*), das Syk-Analog in T-Zellen, wird zur Plasmamembran rekrutiert. Durch Src-Kinasen aktiviertes ZAP-70 phosphoryliert ebenfalls Komponenten eines Ca<sup>2+</sup>-Initiationskomplexes. Dieser umfasst neben PLC-γ1, Itk und SLP-76, welche die Paraloge zu PLC-γ2, Btk und SLP-65 bilden, auch noch die Adapterproteine *grb2-related adaptor downstream of Shc* (Gads) und *linker for activation of T cells* (LAT). LAT ist ein Transmembranprotein, welches aufgrund zweier palmitoylierter Cysteinreste mit *lipid rafts* assoziiert ist (Brdicka et al. 1998; Zhang et al. 1998). Nach TCR-Stimulation wird LAT



phosphoryliert und stellt somit Bindestellen u.a. für PLC- $\gamma$ 1 und Gads zur Verfügung (Liu *et al.* 1999; Zhang *et al.* 2000; Liu *et al.* 2003). Gads ist konstitutiv mit SLP-76 über dessen Prolin-reiche Region assoziiert (Liu *et al.* 1999; Liu *et al.* 2003). Somit wird SLP-76 rekrutiert, welches selber phosphoryliert wird und so Itk über dessen SH2-Domäne rekrutiert (Bubeck Wardenburg *et al.* 1996; Bunnell *et al.* 2000). Itk phosphoryliert und aktiviert LAT-assoziierte PLC- $\gamma$ 1. PLC- $\gamma$ 1 kann PI(4,5)P<sub>2</sub> zu IP<sub>3</sub> und DAG spalten und somit diese *second messenger* bereitstellen.

## 2.4 Direkte und indirekte Membranlokalisation von Proteinen

Der BCR transloziert nach Stimulation in *lipid rafts* innerhalb der Plasmamembran. Indirekt wird auch Syk in diese Signalplattformen über die Interaktion der ITAM mit der Tandem-SH2-Domäne lokalisiert, wohingegen Lyn aufgrund der Palmitoylierung schon in *lipid rafts* der Plasmamembran lokalisiert ist. Durch Protein-Protein-Interaktion mit einem Transmembranprotein oder durch eine über Acylanker vermittelte, direkte Integration in die Lipiddoppelschicht können also Proteine transient oder konstitutiv an der Plasmamembran lokalisiert werden. Eine dritte Möglichkeit stellt die direkte Interaktion von Proteindomänen mit Lipidbestandteilen der Zellmembranen dar (McLaughlin *et al.* 2002; Lemmon 2003; Balla 2005; Hurley 2006). Auch hierfür sind schon Beispiele in der BCR-Signalleitung beschrieben worden; so besitzen RasGRP und PKC-Isoformen C1-Domänen, die mit DAG interagieren und so eine Membranlokalisation stabilisieren können (Newton 1995; Tognon *et al.* 1998; Beaulieu *et al.* 2007; Johnson *et al.* 2007). Die meisten bekannten Membran-Interaktionsdomänen binden Phosphatidylinositolphosphate (PIP), welche am Inositol ihrer polaren Kopfgruppe unterschiedlich phosphoryliert sein können. *Pleckstrin homology* (PH)-Domänen umfassen etwa 120 Aminosäuren. Die am besten charakterisierte PH-Domäne ist die von PLC- $\delta$ 1, welche spezifisch und mit hoher Affinität PI(4,5)P<sub>2</sub> bindet (Garcia *et al.* 1995). Dabei bilden die Phosphate in Position 4 und 5 des Inositols Wasserstoffbrücken mit zwei Lysinen innerhalb der PH-Domäne aus (Ferguson *et al.* 1995). PH-Domänen unterscheiden sich erheblich in Spezifität und Affinität. FYVE-Domänen (benannt nach den ersten vier Proteinen, bei denen sie identifiziert wurden: Fab1p, YOTB, Vac1p und EEA1) sind 70-80 Aminosäuren umfassende Domänen, die über eine basische Tasche mit dem konservierten Motiv (R/K)(R/K)HHCR spezifisch PI(3)P binden. Hydrophobe Aminosäuren innerhalb der Domäne erlauben zusätzlich ein Eindringen in die Lipiddoppelschicht (Kutateladze *et al.* 1999; Misra und Hurley 1999; Stenmark *et al.* 2002). Die ebenfalls vornehmlich PI(3)P-bindenden *phox homology* PX-Domänen unterscheiden sich strukturell stark von FYVE-

Domänen, weisen aber auch eine tiefe Tasche in einem basischen Umfeld und nahe gelegenen hydrophoben Aminosäuren auf (Stahelin *et al.* 2003; Hurley 2006). *Epsin N-terminus homology* (ENTH)-Domänen, welche erst mit der Bindung von PIP eine stabile, strukturierte Konformation einnehmen, haben eine aus basischen Aminosäuren aufgebaute Tasche für die PIP-Bindung und dringen ebenfalls über hydrophobe Aminosäuren in Lipidschichten ein (Ford *et al.* 2002; Stahelin *et al.* 2003). Weitere Beispiele sind Tubby-, FERM-, ANTH-, aber auch unstrukturierte Membraninteraktionsdomänen. Allen gemeinsam scheint jedoch die über basische Aminosäuren vermittelte Bindung zu den sauren Phosphatresten der PIP. Darüber hinaus scheinen hydrophobe Bereiche wichtig, welche direkt in die Lipiddoppelschicht eindringen können.

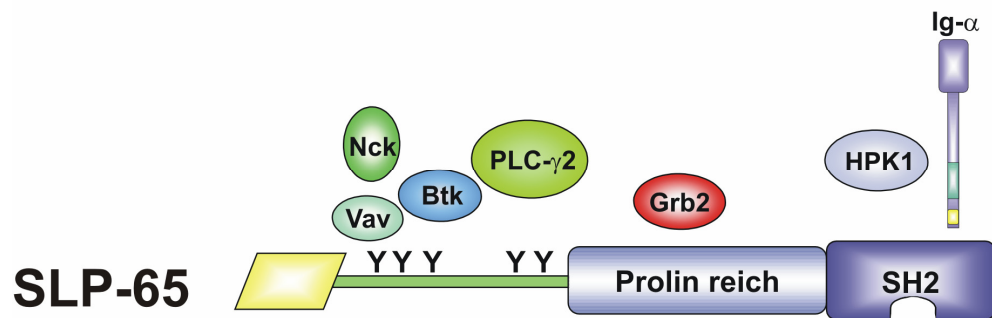
## **2.5 Das Adapterprotein SLP-65**

Die Antigenerkennung durch spezifische Rezeptoren löst eine Vielzahl von Signalereignissen aus, die je nach Intensität und Dauer unterschiedliche Resultate liefern. Damit es zu einer intakten Signalleitung kommt, erfordert es die Koordination einer Vielzahl von Signalelementen, deren Lokalisation und Aktivierung. Adapterproteine vermitteln die subzelluläre Organisation von Proteinen und regulieren so die Signalkaskaden. Sie besitzen selber keine enzymatische Aktivität und sind durch mehrere Protein-Protein-Interaktionsdomänen gekennzeichnet. Sie können cytosolisch vorkommen oder als Transmembranprotein in Zellmembranen verankert sein. Über ihre Interaktionsdomänen werden Enzyme in räumliche Nähe Ihrer Substrate gebracht oder Regulatoren rekrutiert. Ganze Signalkaskaden können beim Verlust dieser Organisatoren zum Erliegen kommen.

Das cytosolische Adapterprotein SLP-65 wurde 1998 als Substrat von PTK nach BCR-Stimulation entdeckt und wird in B-Zellen und Makrophagen exprimiert (Fu *et al.* 1998; Goitsuka *et al.* 1998; Wienands *et al.* 1998; Bonilla *et al.* 2000). Das relative Molekulargewicht liegt zwischen 65 kDa (Maus) und 80 kDa (Huhn). Humanes SLP-65 kommt in zwei Isoformen von 68 kDa und 70 kDa vor (Fu und Chan 1997; Grabbe und Wienands 2006). SLP-65 gehört zur Familie der SLP-Adapter, zu denen auch das T-Zell-Paralog SLP-76 gehört, welches an der Organisation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes in T-Zellen beteiligt ist (Jackman *et al.* 1995; Leo *et al.* 2002; Wu und Koretzky 2004; Koretzky *et al.* 2006). Obwohl beide Proteine nur eine 33%ige Aminosäure-Sequenzhomologie aufweisen, ist die Homologie der Domänenstruktur ausgeprägt. Ein weiterer Vertreter der Familie ist der Adapter CLNK (*cytokine-dependent hemopoietic*

*linker*) oder MIST (*mast cell immunoreceptor signal transducer*), der in aktivierten T- und NK-Zellen, sowie Mastzellen exprimiert wird (Cao *et al.* 1999; Goitsuka *et al.* 2000).

Die Domänenstruktur von SLP-65 umfasst einen N-terminalen, basischen Bereich von 50 Aminosäuren gefolgt von einer sauren Region mit hochkonservierten Tyrosin-Phosphorylierungsmotiven, einer zentralen Prolin-reichen Region und einer C-terminalen SH2-Domäne.



**Abb. 2.2: SLP-65 – Domänenstruktur und Bindungspartner.** SLP-65 beinhaltet eine N-terminale basische Region von 50 Aminosäuren (gelb), Tyrosinphosphorylierungsmotive, die im phosphoryliertem Zustand mit SH2-Domänen von Nck, Vav, Btk und PLC- $\gamma$ 2 interagieren können, eine zentrale Prolin-reiche Region, welche die C-terminale SH3-Domäne von Grb2 binden kann und eine C-terminale SH2-Domäne, welche über phosphorylierte Tyrosine mit Ig- $\alpha$  und HPK1 interagieren kann.

Nach BCR-Stimulation wird SLP-65 phosphoryliert und stellt Bindestellen für die SH2-Domänen von PLC- $\gamma$ 2 (pY<sup>103</sup>VVP, pY<sup>194</sup>IVP, pY<sup>205</sup>IEP), Btk (pY<sup>115</sup>EFP), den Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF) Vav (*vav oncogene*; pY<sup>91</sup>ENP) und Nck (*non-catalytic region of tyrosine kinase*; pY<sup>91</sup>ENP) zur Verfügung (Fu *et al.* 1998; Wienands *et al.* 1998; Hashimoto *et al.* 1999; Ishiai *et al.* 1999; Ishiai *et al.* 1999; Su *et al.* 1999; Chiu *et al.* 2002). *Growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2) kann konstitutiv an die Prolin-reiche Region von SLP-65 und stimulationsabhängig über die zentrale SH2-Domäne an pY von SLP-65 binden (Fu *et al.* 1998; Wienands *et al.* 1998; Grabbe und Wienands 2006). Die SLP-65-SH2-Domäne bindet *hematopoietic progenitor kinase 1* (HPK1) und Ig- $\alpha$  (Engels *et al.* 2001; Sauer *et al.* 2001; Tsuji *et al.* 2001; Kabak *et al.* 2002; Abudula *et al.* 2007; Kulathu *et al.* 2008).

Der vollständige Verlust der Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierungskompetenz in SLP-65-defizienten B-Zellen macht die zentrale Rolle dieses Adapters für die B-Zellsignalleitung deutlich (Ishiai *et al.* 1999). SLP-65-defiziente Mäuse zeigen einen partiellen Block in der B-Zell-Entwicklung im Stadium der Prä-B-Zellen (Jumaa *et al.* 1999; Pappu *et al.* 1999; Hayashi *et al.* 2000). In diesem Stadium wird der pre-BCR exprimiert und ein Wechsel in das

nächste Stadium erfordert ein Signal über diesen Rezeptor. Der unvollständige Block in diesem Stadium wird durch eine endogene Expression von LAT und SLP-76 in Prä-B-Zellen erklärt, welche zusammen die Funktion von SLP-65 teilweise ausgleichen könnten (Su und Jumaa 2003). Xid (*X-linked immunodeficiency*)-Mäuse, welche einen oder mehrere Defekte im *btk*-Gen tragen, die eine Inaktivierung von Btk zur Folge haben, zeigen ein ähnliches Krankheitsbild (Khan *et al.* 1995). Die humane Variante dieser Krankheit, XLA (*X-linked agammaglobulinemia*), ist bei der Mehrheit der Patienten ebenfalls auf Btk zurückzuführen, wohingegen ein geringer Teil der Patienten intaktes Btk besitzt (Sideras *et al.* 1994). Bei einigen der Patienten wurden Mutationen im *slp-65*-Gen gefunden (Minegishi *et al.* 1999). Darüber hinaus wurde SLP-65 in Zusammenhang mit der akuten lymphoblastoiden Leukämie (ALL) als Tumorsuppressor identifiziert (Flemming *et al.* 2003; Jumaa *et al.* 2003; Kersseboom *et al.* 2003). Etwa 50 % der Patienten zeigen keine oder eine reduzierte SLP-65-Expression. Der für diese Leukämieart typische Block in der B-Zell-Entwicklung konnte bei diesen Patienten durch Expression von SLP-65 aufgehoben werden.

## **2.6 Koordination des $Ca^{2+}$ -Initiationskomplexes durch SLP-65**

PLC- $\gamma$ 2 katalysiert die Hydrolyse von PI(4,5)P<sub>2</sub> zu IP<sub>3</sub> und DAG. Damit es zu dieser in der BCR-Signalleitung essentiellen enzymatischen Reaktion kommen kann, muss PLC- $\gamma$ 2 an die Plasmamembran rekrutiert werden, wo die Lipase vollständig aktiviert werden kann und Zugang zu ihrem Substrat erhält. Die Aktivierung von PLC- $\gamma$ 2 beinhaltet auch die Phosphorylierung an den Tyrosinresten Y<sup>753</sup> und Y<sup>759</sup> durch Btk (Takata und Kurosaki 1996; Watanabe *et al.* 2001; Kim *et al.* 2004). Btk wiederum wird durch Syk und Lyn phosphoryliert und aktiviert (Rawlings *et al.* 1996; Kurosaki und Kurosaki 1997). SLP-65 bildet mit PLC- $\gamma$ 2 und Btk den ternären  $Ca^{2+}$ -Initiationskomplex und ist für die korrekte Lokalisation dieser Enzyme an die Plasmamembran verantwortlich. So gelangt Btk in die Nähe der PTK Lyn und Syk, PLC- $\gamma$ 2 erhält Zugang zu seinem Substrat PI(4,5)P<sub>2</sub> und Btk und PLC- $\gamma$ 2 sind ebenfalls proximal lokalisiert.

In SLP-65-defizienten B-Zellen erfolgt keine vollständige Aktivierung von Btk und PLC- $\gamma$ 2 und somit auch keine Mobilisierung von  $Ca^{2+}$  (Ishiai *et al.* 1999; Baba *et al.* 2001). Die Interaktion der Btk-SH2-Domäne mit phosphoryliertem SLP-65 ist für eine vollständige Aktivierung von PLC- $\gamma$ 2 nötig (Hashimoto *et al.* 1999). PLC- $\gamma$ 2 besitzt zwei zentrale SH2-Domänen, wovon die N-terminale essentiell für die Interaktion mit phosphoryliertem SLP-65 ist (Ishiai *et al.* 1999). Ist diese Domäne inaktiviert, erfolgt keine Rekrutierung von PLC- $\gamma$ 2 an die Plasmamembran und keine Aktivierung, während bei einer Inaktivierung der C-terminalen PLC- $\gamma$ 2-SH2-Domäne eine Reduktion in Membranrekrutierung und

Lipase-Aktivierung zu erkennen ist (Ishiai *et al.* 1999). PLC- $\gamma$ 2 besitzt weiterhin eine N-terminale und eine zentrale PH-Domäne, jedoch können diese offensichtlich keine korrekte Membranrekrutierung vermitteln.

Auch Btk besitzt eine PH-Domäne, welche spezifische PI(3,4,5)P<sub>3</sub> bindet. Mutationen innerhalb dieser Domäne führen zur Einschränkung der Btk-Aktivität und sind oft für die schon erwähnte XLA verantwortlich. Die bei Xid-Mäusen vorkommende Mutation führt zu einem Aminosäureaustausch innerhalb der Btk-PH-Domäne von Arginin nach Cystein (R28C), so dass eine Interaktion mit PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, nicht mehr stattfinden kann (Fukuda *et al.* 1996). Ob jedoch die fehlende Membranlokalisation durch Interaktion mit PI(3,4,5)P<sub>3</sub> oder eher strukturellen Aspekte die Btk-Funktion einschränken, ist umstritten. Studien in B-Zellen ohne intakte PI3K, welche die Generierung von PI(3,4,5)P<sub>3</sub> aus PI(4,5)P<sub>2</sub> katalysiert, sowie Studien unter Verwendung von PI3K-Inhibitoren lassen vermuten, dass die PH-Domäne alleine nicht die Aktivierung von Btk bestimmt (Suzuki *et al.* 2003). Darüber hinaus konnte Dr. Ingo Goldbeck zeigen, dass für die Rekrutierung von SLP-65 die Interaktionen mit PLC- $\gamma$ 2 und Btk nicht nötig sind, indem er die entsprechenden Bindemotive innerhalb von SLP-65 inaktivierte (Goldbeck 2007). Zusammenfassend ist also anzunehmen, dass SLP-65 für die Lokalisation des Ca<sup>2+</sup>-Initiationskomplexes an die Plasmamembran verantwortlich ist, wo dann eine Stabilisation durch die PH-Domänen der anderen Komponenten möglich wäre.

In T-Zellen erfolgt die Organisation des Ca<sup>2+</sup>-Initiationskomplexes durch Bindung der entsprechenden Komponenten an den Transmembranadapter LAT. Das B-Zell-Homolog *non-T cell activation linker* (NTAL) ist ebenfalls ein *lipid raft*-assoziiertes Transmembranadapter. Interaktionen mit Komponenten des Ca<sup>2+</sup>-Initiationskomplexes konnten jedoch nicht nachgewiesen werden (Brdicka *et al.* 2002; Stork *et al.* 2004; Wang *et al.* 2005). Die Initiation der Ca<sup>2+</sup>-Antwort scheint von NTAL unabhängig, während das Profil jedoch durch NTAL/Grb2 reguliert wird (Stork *et al.* 2007). Die SH2-Domäne von SLP-65 kann mit einem nicht-ITAM-Tyrosinrest in der Ig- $\alpha$  Untereinheit des BCR (Y<sup>204</sup> für die Spezies Maus) interagieren, wenn dieser phosphoryliert ist (Engels *et al.* 2001; Kabak *et al.* 2002). Durch Aminosäureaustausch dieses Tyrosins zu Phenylalanin, kann die Interaktion verhindert werden. Die Auswirkungen auf die Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung nach BCR-Stimulation sind jedoch gering (Kabak *et al.* 2002). Dies spricht gegen einen einfachen Rekrutierungsmechanismus durch die singuläre Interaktion von SLP-65 mit Ig- $\alpha$ .

2005 beschrieben Köhler *et al.* ein Leucin-Zipper-Motiv im basischen, N-terminalen Bereich von SLP-65 (Köhler *et al.* 2005). Leucin-Zipper sind Dimerisierungsmotive, die sich durch in regelmäßigen Abständen auftretenden Leucinen und Isoleucinen auszeichnen (Landschulz *et al.* 1988; Vinson *et al.* 2002). Innerhalb einer  $\alpha$ -helikalen Sekundärstruktur

liegen diese Aminosäuren übereinander und greifen als Dimer wie die Zähne eines Reißverschlusses ineinander. Die Stabilisation erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen der übereinanderliegenden Leucine und Isoleucine. Auch die N-terminale Region von SLP-65 weist eine solche Anordnung auf (vgl. Abb. 2.3). Mittels sogenannten *bleachings* zeigten die Autoren eine konstitutive Membranlokalisierung eines *pools* von SLP-65 sowohl in Schneider (S2)-Zellen, also einer Insektenzelllinie, als auch in Zellen der murinen B-Zelllinie K46. Diese konnte auf die basische, N-terminale Region von SLP-65 zurückgeführt werden und wurde durch Aminosäureaustausche von Leucin in Position 18 und Isoleucin in Position 25 zu Glutamat verhindert (Kohler *et al.* 2005). Die funktionelle Relevanz wurde in primären SLP-65-defizienten Prä-B-Zellen analysiert, welche mit entsprechenden Varianten von SLP-65 ausgestattet wurden. Die Autoren schlagen einen Mechanismus der Membranlokalisierung von SLP-65 durch Interaktion mit einem noch unbekanntem Transmembranprotein durch Heterodimerbildung über besagten Leucin-Zipper vor.

		abc	def	gabc	def	gabc	def	gabc	def	gabc	def	gabc	def	gabc	def	gabc	def	gabc	def
Mensch	1-	MDKLN	KITVP	ASQKL	RQLQK	MVHDI	KNNEG	GIMNK	IKKLLK	VKAPPS	VPRR	-50							
Maus	1-	MDKLN	KITVP	ASQKL	RQLQK	MVHDI	KNNEG	GIMDK	IKKLLK	VKGPPS	VPRR	-50							
Huhn	1-	MDKLN	KLAVP	AGEKF	RKLQK	MVHDI	KNNES	GIINK	FKKLQ	NEQVAL	LICKT	-50							

**Abb. 2.3:** Postuliertes Leucin-Zipper-Motiv von SLP-65 nach (Kohler *et al.* 2005). Aminosäuresequenz der N-terminalen, basischen Region von SLP-65 der Spezies Mensch, Maus und Huhn. Leucin-Zipper-Motiv mit der allgemeinen Angabe der Positionen a-g für Leucin-Zipper. Leucine und Isoleucin in d-Positionen sind rot umrandet.

Die Membranlokalisierung des Ca<sup>2+</sup>-Initiationskomplexes ist ein essentieller Prozess der BCR-Signalleitung. Wie die bisher veröffentlichten Daten zeigen, wird sie durch das Adapterprotein SLP-65 vermittelt. Die genauen molekularen Mechanismen dieses Prozesses sind bislang jedoch unverstanden und bilden die zentrale Fragestellung dieser Arbeit.

### 3 Ziele der Arbeit

Die Koordination von Signalproteinen durch molekulare Adapter bildet die Basis intakter Signalleitungen in Zellen nach Rezeptorstimulation. In B-Zellen ist ein entscheidendes Schlüsselement nach BCR-Stimulation die Rekrutierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes an die Plasmamembran. Der exakte Mechanismus der Membranrekrutierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes durch das Adapterprotein SLP-65 ist noch weitgehend ungeklärt. Ein involviertes Element scheint die N-terminale, basische Region von SLP-65 zu sein. Weiterhin ist die SH2-Domäne als Interaktionsdomäne für das Transmembranprotein Ig- $\alpha$  eine zu berücksichtigende Komponente. Die zentrale Aufgabe war, die molekularen Mechanismen SLP-65-Rekrutierung zu entschlüsseln, wichtige Elemente den genannten Domänen zuzuordnen und weiterhin deren mögliche Interaktionen zu charakterisieren.

## 4 Materialien

### 4.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle Chemikalien und Reagenzien wurden in der Qualität p.A. von den Firmen Amersham Biosciences, AppliChem, Invitrogen, Invivogen, Merck, PAA, Roth, Serva und Sigma-Aldrich bezogen, soweit nicht anders vermerkt.

### 4.2 Sonstige Materialien

Kultur- und Zentrifugenröhrchen, Pipettenspitzen	Greiner, Nunc
Plastikware Zellkultur	Greiner, Nunc
Sterilfilter	Roth
Elektroporationsküvetten	Peqlab Biotechnologie
Protino <sup>®</sup> Ni-IDA Säulen	Macherey-Nagel
Glutathion Sepharose <sup>®</sup> 4Fast Flow	GE Healthcare
Protein A/G-Agarose	Santa Cruz Biotech.
Calmodulin-Agarose	Sigma
Calmodulin	Calbiochem <sup>®</sup>
Westernblotting Filterpapier	Schleicher & Schell
Nitrocellulosemembran (Hybond <sup>™</sup> ECL <sup>™</sup> )	Amersham Biosciences
PIP-strips <sup>™</sup>	Echelon Biosciences
Größenstandards	
GeneRuler <sup>™</sup> 1 kb DNA Ladder	Fermentas
Prestained Protein Marker Broad Range	New England Biolabs
Transfektionsreagenz FuGene <sup>®</sup>	Roche
Protease-Inhibitor-Cocktail (P2714)	Sigma

### 4.3 Geräte

Autoklaven	Integra
BioPhotometer	Eppendorf
Brutschrank HERAccl 150	Heraeus
Blotapparatur semidry-tansfer-unit TE77	Amersham Biosciences
confocal Laserscanning-System TCS SP2 & DM IRB	Leica
Durchflusscytometer FACScalibur	Becton Dickinson



Durchflusscytometer LSRII	Becton Dickinson
Elektrophoresesysteme	
SDS-PAGE	Biorad
Agarose-Gele	PeqLab
Gene Pulser® II Electroporation System	BioRad
Gel Imager	Intas
Imager ChemiLux	Intas
Inkubator Kelvitron®t	Heraeus
Inkubator Unitron plus	INFORS
Mikroskop LeitzDMIL	Leitz
Netzteile Electrophoresis power supply 301 & 1001	Amersham Biosciences
pH-Meter pH Level 1	inoLab®
PCR-Cycler Mastercycler eppgradient & personal	Eppendorf
Rotator	Schütt
Sterilbank HERAsafe KS 18	Heraeus
Thermomixer comfort	Eppendorf
Ultraschallsonde Sonoplus	Bandelin
Waage TE 612	Sartorius
Water Purification System Milli-Q	Millipore
Zentrifuge 5415D	Eppendorf
Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge Galaxy Mini	VWR
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus
Zentrifuge Sorvall® RC3B	Sorvall®
Zentrifuge Sorvall® RC26 plus	Sorvall®
Vortex Genie 2	Scientific Industries

#### **4.4 Aufreinigungs- und Reaktionssysteme**

Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification System	Promega
Invisorb® DNA cleanup	Invitek
NucleoBond® PC 100	Macherey-Nagel
NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel
QIAshredder kit	Qiagen
Rneasy Mini kit	Qiagen
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas
TOPO TA cloning® kit	Invitrogen

## 4.5 Puffer und Lösungen

Bakterienlysepuffer	50 mM Tris/HCl pH 7,4; 200 mM NaCl; Lagerung bei 4°C
Blockpuffer B1	5 % BSA in PBST; Lagerung bei 4 °C
Blockpuffer B2	3 % <i>fatty-acid-free</i> BSA (Sigma) in TBST; Lagerung bei 4 °C
DNA-Ladepuffer (6x)	10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; 0,25 % (w/v) BPB; 15 % (w/v) Ficoll; Lagerung bei 4°C
ECL-Lösung	4 mL Lösung A; 400 µL Lösung B; 1,2 µL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 %)
Lösung A	250 mg/L Luminol; 0,1 M Tris/HCl pH 8,6, Lagerung bei 4°C
Lösung B	11 mg <i>para</i> - Hydroxycoumarinsäure in 10 mL DMSO, Lagerung im Dunkeln
Elutionspuffer E1	50 mM Tris/HCl pH 8,0; 20 mM reduziertes Glutathion; Lagerung bei -20 °C
Elutionspuffer E2	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 300 mM NaCl; 250 mM Imidazol; pH 8,0
Fixierer	45 % Methanol; 10 % Essigsäure; mit H <sub>2</sub> O auf 100 %
Krebs-Ringer-Lösung	10 mM HEPES pH 7,4; 140 mM NaCl; 4 mM KCl; 1 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM D-Glukose; Lagerung bei 4°C
LEW-Puffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 300 mM NaCl; pH 8,0
Lysepuffer für IP	10 mM Tris/HCl pH 7,8; 137 mM NaCl; 0,5 mM EDTA; 1 mM NaF; 1 % NP-40; 10 % Glycerol; 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> ; Lagerung bei 4°C
Lysepuffer ohne Ca <sup>2+</sup>	50 mM Tris/HCl pH 7,8 ; 137 mM NaCl; 1 mM NaF; 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> ; 0,25 % (v/v) Triton X-100
Lysepuffer mit Ca <sup>2+</sup>	50 mM Tris/HCl pH 7,8 ; 137 mM NaCl; 1 mM NaF; 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> ; 0,25 % (v/v) Triton X-100; 1 mM CaCl <sub>2</sub>
Lysepuffer mit EGTA	50 mM Tris/HCl pH 7,8 ; 137 mM NaCl; 1 mM NaF; 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> ; 0,25 % (v/v) Triton X-100; 0,5 mM EGTA
PBS	140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 8,6 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
PBST	140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 8,6 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,1 % (v/v) Tween 20
SDS	
- Laufpuffer	25 mM Tris; 192 mM Glycerin; 3,5 mM SDS
- Probenpuffer (5x)	280 mM Tris/HCl, pH 6,8; 10 % (w/v) SDS; 30 % ( v/v) Glycerin; 500 mM DTT; 0,012 % (w/v) Bromphenolblau
- Probenpuffer (2x)	112 mM Tris/HCl, pH 6,8; 4 % (w/v) SDS; 12 % ( v/v) Glycerin; 200 mM DTT; 0,005 % (w/v) Bromphenolblau
- Sammelgelpuffer	500 mM Tris/HCl; 0,4 % (w/v) SDS; pH 6,8

- Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl; 0,4 % (w/v) SDS; pH 8,8
TAE-Puffer	40 mM Tris/Essigsäure, pH 7,8; 10 mM NaAc ;1 mM EDTA, pH 8,0
TBS	50 mM Tris; 150 mM NaCl
TBST	50 mM Tris; 150 mM NaCl ; 0,1 % (v/v) Tween 20
TFB I-Puffer	50 mM MnCl <sub>2</sub> ; 100 mM KCl; 10 mM CaCl <sub>2</sub> ; 15 % (v/v) Glycerin; 30 mM KOAc; pH 6,0; sterilfiltriert; Lagerung bei 4 °C
TFB II-Puffer	75 mM CaCl <sub>2</sub> ; 10 mM KCl; 10 mM MOPS; 15 % (v/v) Glycerin; pH 7,0; sterilfiltriert; Lagerung bei 4 °C

## 4.6 Medien

### 4.6.1 Medien und Nährböden für Bakterien

LB-Medium	10 g/L Select Peptone; 5 g/L Hefeextrakt; 10 g/L NaCl, autoklaviert; ggf. 100 µg/mL Ampicillin oder 50 µg/mL Kanamycin
2YT-Medium	16 g/L Select Peptone; 10 g/L Hefeextrakt; 5 g/L NaCl; ggf. 100 µg/mL Ampicillin
LB-Agar-Platten	10 g/L Select Peptone; 5 g/L Hefeextrakt; 10 g/L NaCl; 20 g/L Select Agar, autoklaviert und auf 60 °C abkühlen lassen; ggf. Zugabe von 100 µg/mL Ampicillin oder 50 µg/mL Kanamycin

Alle Medien und fertige Platten wurden bei 4°C gelagert.

### 4.6.2 Zellkulturmedien

Einfriermedium	FCS (für 20 min bei 56 °C inaktiviert) mit 10 % DMSO
Kulturmedium DT40	RPMI 1640+Glutamax; 10 % (v/v) FCS (für 20 min bei 56 °C inaktiviert); 1 % CS; 50 U/mL Penicillin; 50 µg/mL Streptomycin
Kulturmedium Ramos	RPMI 1640+Glutamax; 10 % (v/v) FCS (für 20 min bei 56 °C inaktiviert); 50 U/mL Penicillin; 50 µg/mL Streptomycin
Kulturmedium PlatE	DMEM; 10 % (v/v) FCS (für 20 min bei 56 °C inaktiviert); 2 mM L-Glutamin; 10 µg/mL Blastidin S; 2µg/mL Puromycin; 50 U/mL Penicillin; 50 µg/mL Streptomycin

Alle Medien wurden bei 4 °C gelagert.

## 4.7 Enzyme

Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
<i>calf intestine phosphatase</i> (CIP)	New England Biolabs
T4 DNA Ligase	New England Biolabs
Pfu Polymerase	Promega
Taq DNA Polymerase	New England Biolabs
Reverse Transkriptase MMLV	Fermentas

## 4.8 Antikörper

### 4.8.1 Primärantikörper

Antikörper	Immunogen	Spezies	Hersteller	Anwendung
Aktin	humanes Aktin	Kaninchen	Sigma	WB 1:2000
Calmodulin	Rind Calmodulin	Maus	Millipore™	WB 1:2000
F(ab) <sub>2</sub> (AffiniPure F(ab') <sub>2</sub> )	humanes IgM Fc <sub>5μ</sub>	Ziege	Dianova	Stimulation von Ramos
GFP	GFP	Maus	Roche	WB 1:1000; IP 0,3μg/1x10 <sup>7</sup> Zellen
GST	GST	Kaninchen	Molecular Probes	WB 1:3000
GST	GST	Maus	Sigma	PIP-strips™ 1 :2000
HA	HA-Epitop	Ratte	Roche	WB 1:1000
M4	Huhn IgM schwere Kette	Maus	Biozol	Stimulation von DT40
PLC-γ2 (Q20)	humane PLC-γ2	Kaninchen	Santa Cruz Biotech.	IP 0,8 μg/1x10 <sup>7</sup> Zellen
PLC-γ2	humane PLC-γ2	Kaninchen	Cell Signaling Technology	WB 1:1000
Phosphotyrosin (4G10)	Phosphotyramin	Maus	Upstate Biotech.	WB 1:1000

Antikörper	Immunogen	Spezies	Hersteller	Anwendung
SLP-65 (2C9)	humanes SLP-65	Maus	Covance	WB 1:1000 PIP-strips™ 1:800
SLP-65	Huhn SLP-65	Kaninchen	T. Kurosaki (Ishiai <i>et al.</i> 1999)	WB 1:2000
Syk (4D10)	humanes Syk	Maus	Southern Biotechn. Inc.	WB 1:1000
Ziege-anti-Huhn-IgM FITC-konjugiert	Huhn IgM	Ziege	Bethyl Laboratories	FACS-Analyse 1 :200
Ziege F(ab) <sub>2</sub> -anti- human-IgM FITC-konjugiert	humanes IgM	Ziege	Southern Biotechn. Inc.	FACS-Analyse 1 :200

Tab. 4.1: Primärantikörper und ihre Verwendung

#### 4.8.2 Sekundärantikörper

Die verwendeten Sekundärantikörper wurden für Westernblotting in einer Verdünnung von 1:10000 eingesetzt.

Antikörper	Immunogen	Spezies	Hersteller
Maus IgG HRPO-konjugiert	Maus IgG (H+L)	Ziege	Pierce
Maus IgG1 HRPO-konjugiert	Maus IgG1 Paraproteine	Ziege	Southern Biotechn. Inc.
Maus IgG2b HRPO-konjugiert	Maus IgG2b Paraproteine	Ziege	Southern Biotechn. Inc.
Kaninchen IgG HRPO-konjugiert	Kaninchen IgG (H+L)	Ziege	Pierce
Ratte IgG HRPO-konjugiert	Ratte IgG (H+L)	Ziege	Pierce

Tab. 4.2: Sekundärantikörper

## 4.9 Zelllinien

### 4.9.1 Suspensionszelllinien

#### Ramos / RA-1 (ATCC CRL 1596)

Bei der reifen humanen B-Zelllinie Ramos handelt es sich um ein Burkitt Lymphom. Die Zellen exprimieren auf der Oberfläche IgM und sind EBV-negativ (Klein *et al.* 1975).

#### DT40 (ATCC CRL 2111)

Die Hühner B-Zelllinie DT40 entstammt einem bursalen Lymphom. Dieses wurde durch Infektion eines *Hyline SC* Huhnes mit dem *avian leukosis virus* (ALV) etabliert (Baba und Humphries 1984). DT40 B-Zellen exprimieren IgM auf der Oberfläche.

### 4.9.2 Adhärenzte Zelllinien

#### PlatE

Die Verpackungs-Helferzelllinie PlatE basiert auf HEK 293T Zellen und dient der Herstellung von rekombinanten Retroviren. Die Zellen sind mit den viralen Genen *env* und *gag-pol* des *moloney murine leukemia virus* (MMLV) ausgestattet, welche über eine *internal ribosome entry site* (IRES) mit Resistenzgenen (Blasticidin bzw. Puromycin) gekoppelt sind (Morita *et al.* 2000).

### 4.9.3 Bakterienstämme

<b><i>E. coli</i> Stamm</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Hersteller</b>
XL-1blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)</i> ]	Stratagene <sup>®</sup>
DH5α	F <sup>-</sup> Φ80 <i>lacZΔM15 Δ(lacZY A-argF)U169 deoR recA1 endA1</i> <i>hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ<sup>-</sup></i>	Promega
TOP10F'	F' <i>{lacI<sup>q</sup> Tn10(Tet<sup>R</sup>)}</i> <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> Φ80 <i>lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nup G</i>	Invitrogen <sup>®</sup>
BL-21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3)</i>	Stratagene <sup>®</sup>

Tab. 4.3: Bakterienstämme

## 4.10 Vektoren

Vektor	Anwendung	Hersteller
pCR <sup>®</sup> II-TOPO <sup>®</sup>	T/A-Klonierungsvektor	Invitrogen <sup>®</sup>
pET15b	Expressionsvektor für <i>E.coli</i>	Novagen
pGEX-4T-1	Expressionsvektor für <i>E.coli</i>	Amersham Biosciences
pMSCV-puro-Cit	Expressionsvektor für eukaryotische Zellen	Dr. Michael Engelke
pMSCV-bleo	Expressionsvektor für eukaryotische Zellen	Dr. Michael Engelke
pMSCV-puro-GFP	Expressionsvektor für eukaryotische Zellen	Dr. Ingo Goldbeck
pHCMV-VSV-G	Expression von VSV-G	Labor Dr. M Jücker, UKE Hamburg
pApuroll	Expressionsvektor für eukaryotische Zellen	(Takata <i>et al.</i> 1994)
pcDNA 3.0 puro Citrin	Expressionsvektor für eukaryotische Zellen	P. Bastiaens, MPI für mol. Physiologie, Dortmund

Tab. 4.4: Vektoren

## 4.11 cDNA

cDNA für Huhn SLP-65 und humanes Syk lagen bereits in der Arbeitsgruppe vor. cDNA für humanes SLP-65 und humanes TIRAP wurden mittels RT-PCR aus Ramos Zellen amplifiziert.

## 4.12 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Anwendung
EcoRI-hS65-fwd	CAG CGA ATT CAT GGA CAA GCT TAA TAA AAT AAC	Klonierung
hS65-LZ-NotI-rev	CGC GGC CGC TTA CCT TCG AGG AAC ACT TGG	Klonierung
hS65-1-32-Not-rev	CGC GGC CGC TTA TAT TCC ACC TTC ATT G	Klonierung
hS65-AS28-fwd	CCG AAT TCA ATG AAG GTG GAA TAA TG	Klonierung
hSLP65BglIIforCit	TAA TAG ATC TCA TGG ACA AGC TTA ATA AAA TAA CC	Klonierung
hSLP-65StopNotas	TAA TGC GGC CGC TTA TGA AAC TTT AAC TGC ATA CTT C	Klonierung
Blnk-NdeI-fw	TCA TAT GGA CAA GCT TAA TAA AAT	Klonierung
hS65-Dbel- Bgl/Nde-fwd	CAC CAG ATC TCC ATA TGC GAA GGG ACT ACG CTT CAG	Klonierung
hS65I25K-fwd	GGT CCA TGA TAA GAA AAA CAA TGA AGG TGG	Mutagenese
hS65I25K-rev	CAT TGT TTT TCT TAT CAT GGA CCA TCT TTT GAA G	Mutagenese
hS65I25E-fwd	GGT CCA TGA TGA GAA AAA CAA TGA AGG TGG	Mutagenese
hS65I25E-rev	CAT TGT TTT TCT CAT CAT GGA CCA TCT TTT G	Mutagenese
hS65I25A-fwd	GGT CCA TGA TGC TAA AAA CAA TGA AGG TGG	Mutagenese
hS65I25A-rev	CAT TGT TTT TAG CAT CAT GGA CCA TCT TTT G	Mutagenese



Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Anwendung
hS65V41K-fwd	GCT AAA AAA GAA AGC ACC TCC AAG TGT T	Mutagenese
hS65V41K-rev	GTG CTT TCT TTT TTA GCT TTT TGA TTT T	Mutagenese
BglIII-hTIRAP-fwd	CAC CAG ATC TCA TGG CAT CAT CGA CCT CCC	Klonierung
2-hTIRAPK15-16A-fwd	GCT CTC GGC CTG CGG CGC CTC TAG GCA AGA TGG	Mutagenese
2-hTIRAPK15-16A-rev	GCC TAG AGG CGC CGC AGG CCG AGA GCC AGG AGC	Mutagenese
hTIRAPK31-32A-fwd	GAC CCT GCT GGC GGC GCC CAA GAA GAG GCC C	Mutagenese
hTIRAPK31-32A-rev	CTT CTT GGG CGC CGC CAG CAG GGT CTG CCT G	Mutagenese
BglIII-chS65d1-67	ATA TCC CGG GGA TCC GAA ACT TCT TAC AAT ATA TAT TTC	Klonierung
SLP-65 rev BamHI/XmaI	GCG GCC GCT TAT GAA ACT TTA ACT GCA TAC TTC	Klonierung
hTIRAP(chS65)rev	CTT TCC CAG TTT TGC AAA TTT GGG AGT TGG GCC TCT TC	Klonierung
chS65DLZ (hTIRAP)-fw	GAA GAG GCC CAA CTC CCA AAT TTG CAA AAC TGG GAA AGA T	Klonierung
SP6	CA TTT AGG TGA CAC TAT AG	Sequenzierung
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	Sequenzierung
oligo-dT	(T) <sub>12-18</sub>	cDNA- Gewinnung

Tab. 4.5: Oligonukleotide

### 4.13 Konstrukte

Bezeichnung	Eigenschaften	Herstellung/ Herkunft
GST-SLP-65[1-50]	humanes SLP-65 AS 1-50, N-terminaler GST- <i>tag</i>	Klonierung
GST-SLP-65[1-32]	humanes SLP-65 AS 1-32, N-terminaler GST- <i>tag</i>	Klonierung
GST-SLP-65[28-50]	humanes SLP-65 AS 28-50, N-terminaler GST- <i>tag</i>	Klonierung
GST-SLP-65[1-50] I25K	humanes SLP-65 AS 1-50 mit AS-Austausch I <sup>25</sup> K, N-terminaler GST- <i>tag</i>	Mutagenese, Klonierung
GST-SLP-65[1-50] V41K	humanes SLP-65 AS 1-50 mit AS-Austausch V <sup>41</sup> K, N-terminaler GST- <i>tag</i>	Mutagenese, Klonierung
His <sub>6</sub> -SLP-65 wt	humanes SLP-65 AS 1-456, N-terminaler His <sub>6</sub> - <i>tag</i>	cDNA –Gewinnung, Klonierung
His <sub>6</sub> -SLP-65 ΔBED	humanes SLP-65 AS 49-456, N-terminaler His <sub>6</sub> - <i>tag</i>	Klonierung
hSLP-65 wt	humanes SLP-65 AS 1-456, N-terminaler Citrin- <i>tag</i>	cDNA –Gewinnung, Klonierung
hSLP-65 ΔBED	humanes SLP-65 AS 49-456, N-terminaler Citrin- <i>tag</i>	Klonierung
hSLP-65 I25K	humanes SLP-65 AS 1-456 mit AS-Austausch I <sup>25</sup> K, N-terminaler Citrin- <i>tag</i>	Mutagenese
hSLP-65 I25A	humanes SLP-65 AS 1-456 mit AS-Austausch I <sup>25</sup> A, N-terminaler Citrin- <i>tag</i>	Mutagenese
hSLP-65 I25E	humanes SLP-65 AS 1-456 mit AS-Austausch I <sup>25</sup> E, N-terminaler Citrin- <i>tag</i>	Mutagenese
hSLP-65 I25K V41K	humanes SLP-65 AS 1-456 mit AS-Austausche I <sup>25</sup> K und V <sup>41</sup> K, N-terminaler Citrin- <i>tag</i>	Mutagenese
hTIRAP-SLP-65	AS 1-40 von humanem TIRAP an AS 49-456 von humanem SLP-65, N-terminaler Citrin- <i>tag</i>	cDNA –Gewinnung, Klonierung
hTIRAP*-SLP-65	AS 1-40 von humanem TIRAP mit AS-Austausche K <sup>15, 16, 31, 32</sup> A an AS 49-456 von humanem SLP-65, N-terminaler Citrin- <i>tag</i>	Mutagenese

Bezeichnung	Eigenschaften	Herstellung/ Herkunft
SLP-65 wt	Huhn SLP-65 AS 1-552, angepasst an experimentellen Aufbau mit folgenden <i>tags</i> : N-terminaler HA- <i>tag</i> (Kapitel 6.2.1), C-terminaler GFP- <i>tag</i> (Kapitel 6.1.4, 6.2.2 und 6.2.3), C-terminaler Citrin- <i>tag</i> (Kapitel 6.1.7),	Dr. A. Grabbe, Dr. I. Goldbeck, Dr. K. Dittmann, Klonierung
SLP-65 S30A T54A	Huhn SLP-65 AS 1-552 mit AS-Austausche S <sup>30</sup> A und T <sup>54</sup> A, C-terminaler GFP- <i>tag</i>	Hanibal Bohnenberger
SLP-65 R468L	Huhn SLP-65 AS 1-552 mit AS-Austausch R <sup>468</sup> L, angepasst an experimentellen Aufbau mit folgenden <i>tags</i> : N-terminaler HA- <i>tag</i> (Kapitel 6.2.1), C-terminaler GFP- <i>tag</i> (Kapitel 6.2.3)	Dr. Kai Dittmann, Dr. Annika Grabbe, Dr. Ingo Goldbeck
SLP-65 Δ20	Huhn SLP-65 AS 21-552, C-terminaler Citrin- <i>tag</i>	Dr. Ingo Goldbeck
SLP-65 Δ27	Huhn SLP-65 AS 28-552, C-terminaler Citrin- <i>tag</i>	Dr. Ingo Goldbeck
SLP-65 Δ31	Huhn SLP-65 AS 32-552, C-terminaler Citrin- <i>tag</i>	Dr. Ingo Goldbeck
SLP-65 Δ45	Huhn SLP-65 AS 46-552, C-terminaler Citrin- <i>tag</i>	Dr. Michael Engelke
SLP-65 ΔBED	Huhn SLP-65 AS 68-552, C-terminaler GFP- <i>tag</i>	Klonierung
SLP-65 ΔSH2	Huhn SLP-65 AS 1-441, N-terminaler HA- <i>tag</i>	Dr. Kai Dittmann, Dr. Annika Grabbe
TIRAP-SLP-65 wt	AS 1-40 von humanem TIRAP an AS 46-552 von Huhn SLP-65, C-terminaler GFP- <i>tag</i>	Klonierung
TIRAP-SLP-65 R468L	AS 1-40 von humanem TIRAP an AS 46-552 von Huhn SLP-65 mit AS-Austausch R <sup>468</sup> L, C-terminaler GFP- <i>tag</i>	Dr. Ingo Goldbeck
Lyn-SLP-65 wt	AS 1-23 von Maus Lyn an AS 46-552 von Huhn SLP-65, C-terminaler GFP- <i>tag</i>	Dr. Ingo Goldbeck
Lyn-SLP-65 R468L	AS 1-23 von Maus Lyn an AS 46-552 von Huhn SLP-65 mit AS-Austausch R <sup>468</sup> L, C-terminaler GFP- <i>tag</i>	Dr. Ingo Goldbeck
Syk-SLP-65 wt	AS 1-277 von humanem Syk an AS 46-552 von Huhn SLP-65, C-terminaler GFP- <i>tag</i>	Dr. Ingo Goldbeck
Syk-SLP-65 R468L	AS 1-277 von humanem Syk an AS 46-552 von Huhn SLP-65 mit AS-Austausch R <sup>468</sup> L, C-terminaler GFP- <i>tag</i>	Klonierung

<b>Bezeichnung</b>	<b>Eigenschaften</b>	<b>Herstellung/ Herkunft</b>
Citrin-SLP-65	Huhn SLP-65 AS 1-552, N-terminaler Citrin- <i>tag</i>	Dr. Ingo Goldbeck
Syk wt	humanes Syk AS 1-636	Dr. Abulizi Abudula
Syk K402G	humanes Syk AS 1-636 mit AS-Austausch K <sup>402</sup> G	Dr. Abulizi Abudula

**Tab. 4.6: Konstrukte**

## 5 Methoden

### 5.1 Molekularbiologische Methoden

#### 5.1.1 Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen

Zur Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen für die Transformation wurde der gewünschte Bakterienstamm in LB-Medium bei 37 °C im Schüttler kultiviert, bis eine optische Dichte von  $OD_{578\text{ nm}} = 0,45-0,55$  erreicht war. Die Bakterienkultur wurde 10 min auf Eis gekühlt und anschließend 10 min bei 500xg und 4 °C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 30 mL eiskaltem TFB I-Puffer resuspendiert, für 10 min auf Eis inkubiert und dann erneut für 10 min bei 500xg und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 6 mL TFB II-Puffer aufgenommen, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

#### 5.1.2 Transformation von kompetenten Bakterienzellen

Kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, 1 µg Plasmid-DNA oder ein kompletter Ligationsansatz oder 7 µL eines mit DpnI behandelten Mutagenese-PCR-Ansatzes addiert und vorsichtig gemischt. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wurde ein Hitzeschock bei 42 °C für 1 min durchgeführt und die Bakterien sofort für 2 min auf Eis abgekühlt. Es wurden 200 µL LB-Medium zugegeben und bei 37 °C für 30-60 min im Thermoblock unter Schütteln inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde dann auf vorgewärmten LB-Platten, die das gewünschte Antibiotikum enthielten, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### 5.1.3 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

LB- oder 2YT-Medium wurde mit dem Antibiotikum, über dessen Resistenzgen das in den Bakterien enthaltene Plasmid verfügte, versetzt und mit einer Einzelkolonie angeimpft. Die Kultivierung erfolgte dann im Schüttelinkubator bei 37 °C und 180 rpm bis zur gewünschten optischen Dichte.

Zur Langzeitaufbewahrung von Bakterienkulturen wurden diese mit 50 % (v/v) Glycerin vermischt und diese Glycerinkultur bei -80 °C gelagert.

### 5.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen erfolgte mit Hilfe kommerziell erhältlicher Kits nach Herstellerangaben. Für die analytische Plasmidisolierung wurde das *Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification System* der Firma Promega oder das *Invisorb® DNA cleanup kit* der Firma Invitex verwendet, für die präparative Isolierung das *NucleoBond® PC 100 kit* der Firma Macherey-Nagel. Bei der analytischen Plasmidisolierung wurde DNA mit 70 µL H<sub>2</sub>O eluiert. Bei der präparativen Plasmidisolierung wurde die DNA Konzentration auf 1 µg/mL in H<sub>2</sub>O eingestellt.

### 5.1.5 RNA-Isolierung

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte durch Herstellung homogener Lysate aus  $4 \times 10^6$  Ramos Zellen mit Hilfe des *QIAshredder kit* der Firma Qiagen und anschließender RNA-Isolierung unter Verwendung des *RNeasy kits* ebenfalls der Firma Qiagen. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. RNA wurde mit H<sub>2</sub>O eluiert und direkt für die reverse Transkription eingesetzt.

### 5.1.6 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA in wässriger Lösung erfolgte durch photometrische Messung mit dem BioPhotometer (Eppendorf) bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260 \text{ nm}$ . Als Referenz diente destilliertes Wasser. Eine Absorption von 1 bei einem Küvettendurchmesser von  $d = 10 \text{ mm}$  entspricht einer Konzentration von 50 µg/mL doppelsträngiger DNA oder 40 µg/mL einzelsträngiger RNA. Die Reinheit der Nucleinsäuren wird durch den Quotient  $\lambda_{260 \text{ nm}}/\lambda_{280 \text{ nm}}$  bestimmt und sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen.

### 5.1.7 Reverse Transkription

Die für die reverse Transkription verwendeten Komponenten entstammten dem *RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit* der Firma Fermentas und wurden wie folgt eingesetzt.

Zu 1 µg RNA in 12 µL H<sub>2</sub>O wurde 0,1 µg oligo dT<sub>12-18</sub> gegeben. Der Ansatz wurde für 3 min bei 70 °C denaturiert und anschließend direkt auf Eis abgekühlt. Die fehlenden Komponenten wurden gemischt und anschließend zum abgekühlten Ansatz addiert. Insgesamt lag ein 20 µL Ansatz mit folgenden Komponenten vor:

Komponente	Konzentration
RNA	1 µg
5x-Reaktionspuffer	1x
oligo dT <sub>12-18</sub>	5 ng/µL
dNTP	500 µM
DTT	2,5 mM
RNAse-Inhibitor	1 U
MoMLV Reverse Transkriptase	10 U

Tab. 5.1: Ansatz für Reverse Transkription

Die reverse Transkription erfolgte bei 37 °C für 1 h. Anschließend wurde 1 µL des Ansatzes für die PCR eingesetzt.

### 5.1.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation gewünschter DNA-Bereiche *in vitro* durch hitzestabile DNA-Polymerasen. Ausgehend von kurzen Oligonukleotiden (sogenannten Primern), die komplementär zu den flankierenden Bereichen der zu amplifizierenden Zielsequenz sind, erfolgt die Replikation in n Zyklen und resultiert in einer 2<sup>n</sup>-fachen Amplifikation der Zielsequenz (Saiki *et al.* 1988; Mullis *et al.* 1992).

#### Standard-PCR

Die Amplifikation von DNA mittels PCR erfolgte in einem 25 µL oder 50 µL Ansatz unter Verwendung der Polymerase Pfu (Tabelle 2).

Komponente	Konzentration
DNA-Templat	0,5-1 ng/µL
5' -Primer	0,2 µM
3' -Primer	0,2 µM
dNTP	0,2 mM
Puffer	1x
Pfu	0,06 U/µL

Tab. 5.2: Ansatz für Standard-PCR

Das Programm wurde entsprechend der unterschiedlichen *annealing*-Temperaturen der Oligonukleotide wie folgt abgestimmt (Tabelle 3).

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95 °C	30	1
Denaturierung	95 °C	30 s	29
Primeranlagerung	54-64 °C	1 min	
Polymerisation	72 °C	2 min/kb	
Polymerisation	72 °C	10 min	1
Ende	12 °C	∞	1

Tab. 5.3: Programm für Standard-PCR

Gewonnene PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert, isoliert und direkt für Restriktionen eingesetzt oder mittels des *TOPO TA cloning*<sup>®</sup> kit gesichert (vgl. Kap. 5.1.9).

#### Zielgerichtete Mutagenese

Die Methode der zielgerichteten Mutagenese stellt eine spezielle Form der PCR dar, die zur Einführung von Mutationen direkt in die zirkuläre Vektor-DNA dient. Hierbei werden als Primer zwei Oligonukleotide verwendet, die die entsprechende Mutation (Punkt-, Insertions- oder Deletionsmutation) aufweisen, so dass die entstehenden Tochterstränge die Mutation tragen. In den folgenden Zyklen werden die Mutationen weitergegeben. Die im Reaktionsgemisch enthaltene intakte Vektor-DNA ist aufgrund ihres bakteriellen Ursprungs methyliert und kann so anschließend durch Restriktionsspaltung mit DpnI spezifisch degradiert werden, während die nicht-methylierten PCR-Produkte erhalten bleiben.

Die Durchführung der zielgerichteten Mutagenese erfolgte unter Verwendung der Polymerase Pfu in einem 25 µL Ansatz nach Tabelle 4.

Das Programm wurde wie folgt abgestimmt:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95 °C	30	1
Denaturierung	95 °C	30 s	29
Primeranlagerung	60 °C + 0,1 °C/Zyklus	1 min	
Polymerisation	72 °C	2 min/kb	
Polymerisation	72 °C	10 min	1
Ende	12 °C	∞	1

Tab. 5.4: Programm für Mutagenese-PCR



Im Anschluss an die PCR wurde die Templat-DNA spezifisch degradiert, indem 0,5 µL DpnI direkt zum PCR-Ansatz addiert und dieser 1 h bei 37 °C inkubiert wurde. 7 µL des Reaktionsansatzes wurden für die Transformation von kompetenten TOP10F' *E. coli* eingesetzt.

#### Overlap-Extension-PCR

Um eine Fusion zweier DNA-Fragmente mittels PCR zu erlauben, werden zunächst in zwei getrennten PCR diese Fragmente amplifiziert und aufgereinigt. Dabei wird ein überlappender Bereich geschaffen, indem die Primer-Wahl so erfolgt, dass der 5' -Bereich des 3' -Fragmentes komplementär zum 3' -Bereich des 5' -Fragmentes ist. In einer folgenden PCR werden dann diese Fragmente zusammen mit dem 3' -Primer des 3' -Fragmentes und dem 5' -Primer des 5' -Fragmentes eingesetzt.

Die Durchführung der PCR erfolgte nach dem Protokoll für einen Standard-PCR-Ansatz (vgl. Tabelle 2) ohne zusätzliche Zugabe von Vektor-DNA, da die Fragmente als DNA-Templat dienen.

### **5.1.9 T/A-Klonierung**

Die DNA-Polymerase Taq fügt an die 3'-Enden eines PCR-Produktes ein zusätzliches Adenosin an, wodurch ein A-Überhang entsteht. Bei der T/A-Klonierung verfügt der Klonierungsvektor über einen T-Überhang an den 5'-Enden, so dass eine direkte Ligation des PCR-Produktes möglich ist. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde das *TOPO TA cloning*<sup>®</sup> kit mit dem Vektor pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup> der Firma Invitrogen nach Herstellerangaben verwendet.

PCR-Produkte, welche mit einer anderen Polymerase generiert wurden, mussten einer Taq-Nachbehandlung unterzogen werden. Dazu wurden die PCR-Produkte aufgereinigt, in 48 µL H<sub>2</sub>O eluiert und anschließend 0,5 µL Taq-Polymerase, 0,5 µL 10xTaq-Puffer und 1 µL dNTP (10 mM) zugegeben. Der Ansatz wurde 20 min bei 72 °C inkubiert. Weiter wurde nach Herstellerangaben verfahren. Die Transformation erfolgte in TOP10F' *E. coli*.

### **5.1.10 Restriktionsspaltung**

Die spezifische enzymatische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen ermöglicht die Analyse von DNA und liefert Edukte für weitere Klonierungsschritte. Die verwendeten Endonukleasen wurden von der Firma New England Biolabs bezogen und gemäß den Herstellerangaben in den mitgelieferten Puffern eingesetzt.

### 5.1.11 Dephosphorylierung

Bei Restriktion mit nur einem Enzym verhindert die anschließende enzymatische Dephosphorylierung am 5'-Ende der linearen Vektor-DNA die Religation. Die Dephosphorylierung erfolgte mit *calf intestine phosphatase* (CIP) der Firma New England Biolabs nach Herstellerangaben.

### 5.1.12 Ligation

T4-Ligase katalysiert die Verknüpfung von 3'-OH und 5'-Phosphatgruppe der DNA unter ATP Spaltung. Es wurde T4-Ligase der Firma New England Biolabs nach Herstellerangaben eingesetzt.

### 5.1.13 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese diente zum einen der Analyse von DNA-Proben zum anderen der Isolierung definierter DNA-Fragmente. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Ladepuffer (6x) versehen und auf Gele mit 0,8-1,5 % Agaroseanteil in TAE-Puffer aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Proben im elektrischen Feld erfolgte in einer horizontalen Elektrophoresekammer. DNA-Fragmente wurden mit dem in die DNA interkalierenden Fluorophor Ethidiumbromid angefärbt. Bei einer UV-Bestrahlung ( $\lambda = 302 \text{ nm}$ ) erfolgte dann die Visualisierung durch Fluoreszenz bei 590 nm. Als Größenstandard diente *GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder* der Firma Fermentas.

### 5.1.14 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem *NucleoSpin® Extract II kit* der Firma Macherey-Nagel nach Herstellerangaben.

### 5.1.15 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Proben erfolgte nach der Didesoxymethode (Sanger *et al.* 1977). Die Sequenzierung wurde von der Firma MWG Biotech durchgeführt.

## **5.2 Methoden der Zellkultur**

### **5.2.1 Allgemeines**

Sterile Bedingungen wurden dadurch sichergestellt, dass alle Arbeiten mit steriler Ausrüstung und an Sterilbänken erfolgten. Alle Zentrifugationsschritte eukaryotischer Zellen erfolgten mit einer gekühlten Zentrifuge für 4 min bei 300xg und 4 °C. Die Kultivierung aller Zellen erfolgte bei 37 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90 % und 5 % CO<sub>2</sub>.

### **5.2.2 Kultivierung von Suspensionszellen**

Die Kultivierung von Zellen der Linie Ramos erfolgte in RPMI1640+Glutamax mit 10% FCS, 50 U/mL Penicillin und 50 µg/mL Streptomycin. Alle DT40 Zelllinien wurden in RPMI1640+Glutamax mit 10 % FCS, 1 % CS, 50 µM β-Mercaptoethanol, 50 U/mL Penicillin und 50 µg/mL Streptomycin kultiviert.

### **5.2.3 Kultivierung von adhärennten Zellen**

PlatE Zellen wurden in DMEM mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 10 µg/mL Blastocidin S, 2 µg/mL Puromycin, 50 U/mL Penicillin und 50 µg/mL Streptomycin kultiviert. Die Verdünnung der Zellkulturen erfolgte mit Hilfe von Trypsin/EDTA.

### **5.2.4 Einfrieren von eukaryotischen Zellen**

$1-1,5 \times 10^7$  Zellen wurden einmal mit kaltem PBS gewaschen, in 1 mL Einfriermedium aufgenommen, in ein Cryo-Röhrchen überführt und sofort auf Eis gestellt. Die Cryo-Röhrchen wurden in einer Styroporbox bei -80 °C eingefroren. Dies gewährleistet eine Einfriereschwindigkeit von etwa -1 °C/min. Zur langfristigen Aufbewahrung wurden die Zellen anschließend bei -140 °C gelagert.

### **5.2.5 Auftauen von eukaryotischen Zellen**

Eukaryotische Zellen wurden bei 37 °C aufgetaut und anschließend sofort in 10 mL vorgewärmtes Medium überführt. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in 10 mL des entsprechenden Kulturmediums resuspendiert und auf eine 10 cm Kulturschale gegeben.

### 5.2.6 Zellzählung

Die Zellzählung eukaryotischer Zellen wurde mit einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt.

### 5.2.7 Transfektion von DT40 Zellen mittels Elektroporation

Für die Transfektion durch Elektroporation wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend in PBS auf eine Zelldichte von  $1 \times 10^7$  Zellen/mL eingestellt. In einer Elektroporationsküvette (4 mm Elektrodenabstand) wurden 15-30  $\mu\text{g}$  des linearisierten und gereinigten Plasmids vorgelegt, 700  $\mu\text{L}$  der Zellsuspension zugegeben, und 10 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 250 V, 975  $\mu\text{F}$  und einer Zeitkonstanten von 20-24 ms. Die Suspension wurde anschließend in 48 mL vorgewärmtem DT40 Kulturmedium und auf zwei Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen verteilt. Nach einem Tag wurde 1 mL Kulturmedium und Puromycin addiert (Puromycin mit einer Endkonzentration von 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Nach 5-10 Tagen wurden stabile Transfektanden ausgewählt und weiter kultiviert. Analysen wurden mit mindestens drei unabhängigen Klonen durchgeführt.

### 5.2.8 Infektion von DT40 Zellen mit rekombinanten Retroviren (Stork et al. 2004)

Die Infektion von DT40 B-Zellen erfolgte mit einem retroviralen Gentransfer-System der dritten Generation. Dieses beruht auf der getrennten Bereitstellung des retroviralen Expressionsvektors mit der zu übertragenden cDNA einerseits und der *gag*-, *env*- und *pol*-Gene durch eine Helferzelllinie (PlatE) andererseits. Der hier verwendete retrovirale Expressionsvektor pMSCV-puro verfügt neben der zu transferierenden cDNA und dem Selektionsmarker über das Verpackungssignal  $\Psi$  und die 5' - und 3' - LTR (*long terminal repeats*). Letztere sind für die reverse Transkription, Integration und Transkription wichtig. *gag*, *env* und *pol* codieren für Virusproteine, die sowohl für die Verpackung wichtig sind, als auch die Prozessierung der RNA zur Integration in das Genom der Zielzelle sichern. Zellen, welche diese Gene nicht tragen, können keine Viruspartikel produzieren. Das in PlatE vorhandene *env*-Gen führt zur Produktion von Viren, welche spezifisch für Nagerzellen sind (ecotroph). Durch Transfektion der Helferlinie mit dem für das Glykoprotein des vesicular stomatitis Virus (VSV-G) codierenden Gens kann eine Pseudotypisierung erfolgen, so dass Viren produziert werden, welche unabhängig von

Rezeptoren auf der Zielzelle sind und sich somit auch für die Infektion von Nicht-Nagerzellen eignen.

#### **5.2.8.1 Herstellung rekombinanter Retroviren**

Die Herstellung der rekombinanten Retroviren erfolgte durch Transfektion der Verpackungszelllinie PlatE mittels FuGENE®. Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen auf 6 cm-Schalen so ausgesät, dass am Folgetag eine Konfluenz von 50-60 % vorlag. Für die Transfektion wurden 7,5 µL FuGENE®, 0,7 µg VSV-G und 2 µg des Expressionsvektors in 200 µL serumfreiem RPMI1640 vorgelegt und für 15 min bei RT inkubiert. Das Medium der PlatE-Kulturen wurde durch 4 mL DT40 Kulturmedium ersetzt und der Reaktionsansatz zugegeben. Nach 48 h Inkubation bei 37 °C, 90 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> konnte der Überstand für die Infektion von DT40 B-Zellen eingesetzt werden.

#### **5.2.8.2 Retrovirale Infektion von DT40 Zellen**

Auf einer 6 cm-Schale wurden 1,5 mL DT40 Kulturmedium mit 4 µL einer frischen Polybren/PBS-Lösung (3 mg/mL) vorgelegt.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden in 2,5 mL Virusüberstand (s.o.) resuspendiert und hinzugefügt. Die Infektion erfolgte für 24 h bei 37 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90 % und 5 % CO<sub>2</sub>. Anschließend wurden die Zellen in 10 mL frisches DT40 Kulturmedium transferiert. Nach weiteren 24 h wurde das Medium gegen Selektionsmedium (DT40 Kulturmedium mit 1 µg/mL Puromycin) ausgetauscht.

Die Herstellung von pseudotypisierten Retroviren und die Infektion von DT40 B-Zellen erfolgte unter S2-Bedingungen.

#### **5.2.9 Expressionsanalyse von Fluorophor-markierten Proteinen und Oberflächen IgM mittels Durchflusscytometrie**

Zur Analyse der Expression Fluorophor-markierter Proteine wurden  $0,5-1 \times 10^6$  Zellen einmal mit 2 mL PBS gewaschen, in 500 µL PBS aufgenommen und am Durchflusscytometer untersucht. Für die Bestimmung der Oberflächenexpression von IgM wurden  $0,5-1 \times 10^6$  Zellen zweimal mit 2 mL PBS gewaschen, in 200 µL PBS aufgenommen und mit FITC-markierten Ziege-anti-Huhn-IgM (DT40) oder Ziege F(ab)<sub>2</sub>-anti-human-IgM (Ramos) Antikörpern für 15 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach

zweimaligem Waschen mit 2 mL PBS wurden die Zellen in 500  $\mu$ L PBS aufgenommen und am Durchflusscytometer analysiert.

### 5.2.10 $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen am Durchflusscytometer

Um die BCR induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung in B-Zellen zu untersuchen, wurden diese mit dem Farbstoff Indo-1 beladen, welcher bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  bei 435 nm emittiert (blau). Sind Calciumionen anwesend, werden diese gebunden und die Emissionswellenlänge verschiebt sich zu 400 nm (violett). Der Farbstoff liegt als membrangängiges Esterderivat (Acetoxymethylester) vor. In der Zelle wird der Farbstoff durch Esterasen zur entsprechenden Carbonsäure hydrolysiert. Diese hat eine deutlich reduzierte Membrangängigkeit. Das Detergenz Pluronic F-127 erleichtert die Aufnahme des Farbstoffs und verhindert eine Kompartimentierung des Fluorophors in den Zellmembranen.

$1 \times 10^6$  Zellen wurden in 700  $\mu$ L RPMI1640 mit 5 % FCS vorgelegt und 0,7  $\mu$ L Indo-AM (1 mM in DMSO) und 2,1  $\mu$ L Pluronic F-127 (5 % (w/v) in  $\text{H}_2\text{O}$ ) addiert, vorsichtig gevortext und 25 min bei leichtem Schütteln (Thermomixer Eppendorf, 300 rpm) und 30 °C inkubiert. Nach Zugabe von 700  $\mu$ L RPMI1640 mit 10 % FCS wurde weitere 10 min bei 37 °C geschüttelt, die Zellen anschließend zweimal mit 600  $\mu$ L Krebs-Ringer-Lösung mit 1 mM  $\text{CaCl}_2$  gewaschen und in 600  $\mu$ L Krebs-Ringer-Lösung mit 1 mM  $\text{CaCl}_2$  bis zur Messung bei RT bereitgehalten.

Die Analyse der BCR-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung erfolgte am LSRII der Firma Becton Dickinson. Nach Dokumentation des Basissignals für 30 s wurden die Zellen durch Zugabe von 1,5  $\mu$ g/mL M4 stimuliert. Die Analyse erstreckte sich über einen Zeitraum von 5 min. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software FlowJo und Excel.

### 5.2.11 Konfokale *laser-scanning* Mikroskopie

Die *in vivo*-Lokalisationsstudien von Fluorophor-markierten Fusionsproteinen erfolgten durch konfokale *laser-scanning* Mikroskopie am *confocal Laserscanning*-System TCS SP2 & DM IRB (Leica, Objektiv HCX PL APO 63.0x1.32 OIL UV). Die Steuerung erfolgte durch die Leica Confocal Software v2.61. Die konfokalen Fluoreszenzaufnahmen wurden softwarebasiert dokumentiert (Goldbeck 2007). GFP hat eine maximale Anregungswellenlänge von 488 nm; das Emissionsmaximum liegt bei 507 nm. Im Falle von Citrin liegt das Anregungsmaximum bei 513 nm, die Emission ist bei 527 nm maximal.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden geerntet und zweimal mit Krebs-Ringer-Lösung mit 1mM  $\text{CaCl}_2$  gewaschen. Anschließend wurden Zellen in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/400  $\mu$ L in

Krebs-Ringer-Lösung mit  $\text{CaCl}_2$  in 4-Kammer-Objekträgern (4 well chambered coverglass #1.0 Lab-Tek®, Nunc) ausgesät, 20 min sedimentieren gelassen und für die Analyse am Mikroskop eingesetzt. Die BCR-Stimulation der Zellen erfolgte durch die Zugabe von 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  M4.

## **5.3 Biochemische Methoden**

### **5.3.1 Expression von GST-Fusionsproteinen**

Zur Expression von GST-Fusionsproteinen im großen Maßstab wurden 500 mL LB-Medium mit 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ampicillin mit einer frischen Übernachtskultur *E. coli* BL-21 angeimpft und bei 37 °C im Schüttler inkubiert, bis eine optische Dichte von  $\text{OD}_{578\text{nm}} = 0,6-0,8$  erreicht wurde. Die Expression des entsprechenden Fusionsproteins wurde dann durch Zugabe von IPTG auf eine Endkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  induziert und die Bakterien für weitere 2-3 h bei 37 °C geschüttelt. Nach Abkühlen der Suspension auf Eis wurden die Zellen bei 3000xg und 4 °C abzentrifugiert und die Bakterienpellets bei -80 °C eingefroren.

Zur Lyse wurden 0,5 g Nasspellet in 2 mL Bakterienlysepuffer suspendiert, einer Ultraschalllyse unterzogen und anschließend Triton-X-100 auf eine Endkonzentration von 0,5 % zugegeben. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis und Zentrifugation für 15 min bei 20000xg und 4 °C wurde das klare Lysat mit 100  $\mu\text{L}$  einer 50 %igen Glutathion-Sepharose-Suspension eine Stunde bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Die Matrix wurde dreimal mit 1,5 mL Bakterienlysepuffer gewaschen (300xg, 2 min, 4°C), in 100  $\mu\text{L}$  Lysepuffer ohne  $\text{Ca}^{2+}$  aufgenommen und bei 4 °C gelagert oder direkt für Affinitätspräzipitationen eingesetzt. Die Quantifizierung der an die Matrix gekoppelten Proteine erfolgte über Auftrennung mittels SDS-PAGE (vgl. Kapitel 5.3.6) und anschließender Färbung mit CBB (vgl. Kapitel 5.3.7).

Für Interaktionsstudien von GST-Fusionsproteinen mit Lipiden auf Nitrocellulosemembranen (PIP-strip™) wurden die Proteine durch Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  Elutionspuffer E1 und 30-minütiger Inkubation bei RT von der Matrix gelöst. Die Quantifizierung der Proteine im Eluat erfolgt ebenfalls wie oben beschrieben.

### 5.3.2 Expression von His<sub>6</sub>-Fusionsproteinen

Zur Expression von His<sub>6</sub>-Fusionsproteinen wurden 500 mL LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin mit einer frischen Übernachtskultur *E. coli* BL-21 angeimpft und bei 37 °C im Schüttler bis zu einer optischen Dichte von  $OD_{578\text{ nm}} = 0,6-0,8$  inkubiert. Induktion der Expression erfolgte durch Zugabe von IPTG auf eine Endkonzentration von 1 mM. Nach 3 h Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen auf Eis abgekühlt und bei 3000xg und 4 °C pelletiert. Die Bakterienpellets wurden bei -80 °C eingefroren.

3 g Nasspellet wurden in 6 mL LEW-Puffer aufgenommen und einer Ultraschalllyse unterzogen. Anschließend wurde Triton-X-100 auf eine Endkonzentration von 0,25 % addiert, 15 min auf Eis inkubiert und bei 4000xg und 4 °C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde dann auf eine mit 2 mL LEW-Puffer equilibrierte Protino<sup>®</sup> Ni-IDA Säule gegeben, die Säule dreimal mit 2 mL LEW-Puffer gewaschen und das Protein durch Zugabe von 1,5 mL Elutionspuffer E2 eluiert. Diese Arbeiten wurden im 4 °C Raum durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung des Proteins im Eluat erfolgte mittels Auftrennung durch SDS-PAGE (vgl. Kapitel 5.3.6) und anschließender Färbung mit CBB (vgl. Kapitel 5.3.7). Dazu wurden definierte Mengen an BSA als Standard mit aufgetragen.

### 5.3.3 Stimulation und Lyse von eukaryotischen B-Zellen

Zur Präparation von Ramos-Zelllysaten wurden die Zellen abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und 30 min bei 37°C in RPMI1640 inkubiert. Dann wurde die Zellzahl auf  $3-5 \times 10^7$  Zellen/mL in RPMI1640 ohne Zusätze eingestellt und die Zellen im Thermoblock auf 37 °C temperiert. Im Falle von DT40 B-Zellen wurde die Zellzahl auf  $3-5 \times 10^7$  Zellen/mL in RPMI1640 ohne Zusätze eingestellt und die Zellen im Thermoblock für 10 min inkubiert.

Unstimulierte Zellen wurden mit der Tischzentrifuge pelletiert, vorsichtig in  $200 \mu\text{L}/10^7$  Zellen eisgekühltem Lysepuffer resuspendiert und 10-30 min auf Eis inkubiert. Zur Sedimentation unlöslicher Zelltrümmer und Zellkerne wurden die Lysate für 10 min bei 4 °C mit 10000xg zentrifugiert und der klare Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß überführt.

Eine Stimulation der B-Zellen erfolgte über Kreuzvernetzung des BCR. Hierzu wurden  $3-5 \times 10^7$  Zellen in 1 mL RPMI1640 ohne Zusätze mit 10 µg F(ab)<sub>2</sub> (Ramos) oder 2 µg M4 (DT40) bei 37 °C inkubiert und die Inkubation durch Pelletieren der Zellen und Aufnahme in  $200 \mu\text{L}/10^7$  Zellen eiskaltem Lysepuffer nach der angegebenen Zeit gestoppt. Weiter wurde verfahren wie mit Lysaten unstimulierter Zellen (s.o.).



Die geklärten Lysate wurden für Immun- oder Affinitätspräzipitationen eingesetzt oder zur Herstellung von Gesamtlysaten mit 1/5 Vol. Probenpuffer (5x) für 5 min bei 95 °C denaturiert.

Die Zusammensetzung des Lysepuffers variierte je nach Zweck der Anwendung. Für Calmodulin-Interaktionsstudien wurde *Lysepuffer mit Ca<sup>2+</sup>* oder *Lysepuffer mit EGTA* eingesetzt; für die Phosphorylierungsstudien von SLP-65 (-Varianten) und PLC- $\gamma$ 2 wurde *Lysepuffer für IP* eingesetzt (vgl. Kapitel 4.5).

### 5.3.4 Immunpräzipitation

Geklärte Lysate  $3 \times 10^7$  unstimulierter oder stimulierter Zellen wurden mit 0,8  $\mu$ g Antikörper gegen GFP oder 3  $\mu$ g Antikörper gegen PLC- $\gamma$ 2 über Nacht bei 4 °C unter Rotation inkubiert, 20  $\mu$ L Protein A/G-Agarose zugegeben und weitere 45 min bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Die Matrix wurde dreimal mit 600  $\mu$ L Lysepuffer für IP gewaschen (250xg, 2min, 4 °C) und anschließend in 50  $\mu$ L Probenpuffer (2x) aufgenommen und bei 95 °C 5 min aufgeköcht. Die isolierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE (vgl. Kapitel 5.3.6) aufgetrennt und durch Westernblotting (vgl. Kapitel 5.3.8) analysiert.

### 5.3.5 Affinitätspräzipitationen mit GST-Fusionsproteinen oder Calmodulin-Agarose

Für Affinitätspräzipitationen wurde zu geklärten Lysate  $5 \times 10^7$  unstimulierter oder stimulierter Zellen 10  $\mu$ g des entsprechenden GST-Fusionsproteins, gekoppelt an Glutathion-Sepharose in einem Gesamtmatrixvolumen von 15  $\mu$ L, oder 25  $\mu$ L Calmodulin-Agarose (Sigma) addiert. Anschließend wurde über Nacht bei 4 °C im Rotator inkubiert. Die Matrix wurde viermal mit 1 mL des für die Lyse verwendeten Puffers (250xg, 2min, 4 °C) gewaschen, anschließend in 25  $\mu$ L Probenpuffer (2x) aufgeköcht und für SDS-PAGE (vgl. Kapitel 5.3.6) eingesetzt. Um ein gutes Laufverhalten kleiner Proteine im Gel bei der anschließenden SDS-PAGE sicherzustellen, sollte der Probenpuffer nicht höher konzentriert sein.

### 5.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts wurden die Proben der aufzutrennenden Proteine einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unterworfen. Dabei wandern die aufzutrennenden Proteine in einem elektrischen Feld durch eine Polyacrylamid-Gelmatrix. Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein

anionisches Detergenz, welches sich an Proteine anlagert, sie dadurch denaturiert und mit einer negativen Nettoladung versieht. Somit wirkt sich die Eigenladung des Proteins nicht mehr auf das Wanderungsverhalten des Proteins aus und die Proteine wandern lediglich anhand ihrer molekularen Masse im elektrischen Feld.

Die Acrylamidkonzentration betrug in Sammelgelen 5 % und in Trenngelen 10 %. Im Falle der Analyse von Calmodulin wurden Gradientengele hergestellt mit einer Acrylamidkonzentration von 10-18 %, um eine klare Auftrennung im Bereich von 16 kDa zu erhalten.

Die SDS-PAGE erfolgte in einer vertikalen Elektrophoresekammer und wurde bei konstanter Stromstärke von 20 mA im Sammelgel und 25 mA im Trenngel durchgeführt. Aufgetrennte Proteine wurden anschließend durch Anfärben mit CBB (vgl. Kapitel 5.3.7) oder mittels Westernblotting (vgl. Kapitel 5.3.8) analysiert. Als Größenstandard diente *prestained protein marker broad range* der Firma New England Biolabs.

### **5.3.7 Anfärben von Polyacrylamidgelen mittels *Coomassie Brilliant Blue* (CBB)**

Das Anfärben von Polyacrylamidgelen erfolgte mit Hilfe von *Coomassie Brilliant Blue R250* (Merck). Die Gele wurden für 15-20 min mit einer gesättigten Lösung von *Coomassie Brilliant Blue R250* in Fixierer inkubiert. Die Entfärbung der Gele erfolgte mit H<sub>2</sub>O bei RT.

### **5.3.8 Westernblotting**

Das Westernblotting ist eine hochsensitive Nachweismethode für Proteine, die mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Hierbei werden die Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und anschließend mit spezifischen Primärantikörpern markiert (Towbin *et al.* 1979; Burnette 1981). Die Primärantikörper-erkennenden Sekundärantikörper sind an das Enzym *horseradish peroxidase* (HRPO) gekoppelt, welches die Oxidation von Luminol durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalysiert. Die dabei auftretende Chemilumineszenz bei 428 nm tritt nur an den Stellen auf, wo Sekundärantikörper gebunden haben.

Zur Übertragung der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde ein Filterpapier gefolgt von einer Nitrocellulosemembran, dem Polyacrylamidgel und einem weiteren Filterpapier luftblasenfrei auf die Anode einer *Semidry-Blotting-Unit* gelegt. Filterpapiere und Nitrocellulosemembran wurden zuvor mit Transferpuffer equilibriert. Der Transfer der Proteine erfolgte durch Anlegen einer konstanten Spannung von 16 V für 1 h. Zur

Absättigung freier Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran wurde diese 1 h in Blockpuffer B1 inkubiert und anschließend dreimal für 10 min mit PBST gewaschen. Die Membran wurde mit dem entsprechenden in PBST (+0,01% Natriumazid +1% BSA) verdünnten Primärantikörper (vgl. Kapitel 4.8) 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert und nach erneutem, dreimaligem Waschen mit PBST für 1 h mit einem HRPO-gekoppelten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:10000 in PBST) behandelt. Die Membran wurde wieder dreimal mit PBST gewaschen und 1 min mit ECL-Lösung behandelt. Die Proteinbanden wurden am ChemiLux Imager der Firma Intas digital dokumentiert.

Zur mehrfachen Entwicklung unter Verwendung von Primärantikörpern unterschiedlicher Spezies wurde die Membran 30 min bei RT mit 0,1 % Natriumazid in PBST behandelt und anschließend mit den entsprechenden Primärantikörpern behandelt wie oben beschrieben.

### **5.3.9 PIP-strip™-assay**

Um Interaktionen zwischen Proteinen und Lipiden *in vitro* zu studieren sind sogenannte PIP-strips™ kommerziell erhältlich. Dabei handelt es sich um Nitrocellulosemembranen, auf denen definierte Lipide immobilisiert sind. Bei Inkubation mit Proteinen oder Proteindomänen, welche diese Lipide binden, verbleiben diese auf der entsprechenden Stelle auf der Membran und können anschließend durch Antikörper immun-spezifisch nachgewiesen werden.

PIP-strips™ wurden 1 h bei RT mit Blockpuffer B2 inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit TBST wurden die PIP-strips™ 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit 0,5 µg/mL oder 1 µg/mL Protein in Blockpuffer B2 inkubiert, dreimal mit TBST gewaschen, 1 h mit Primärantikörpern und nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBST 45 min mit Sekundärantikörpern inkubiert. Die Detektion der gebundenen Proteine erfolgte wie oben beschrieben nach dreimaligem Waschen mit TBST und Inkubation mit ECL-Lösung am ChemiLux Imager (Intas).

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Analysen zum N-Terminus von SLP-65

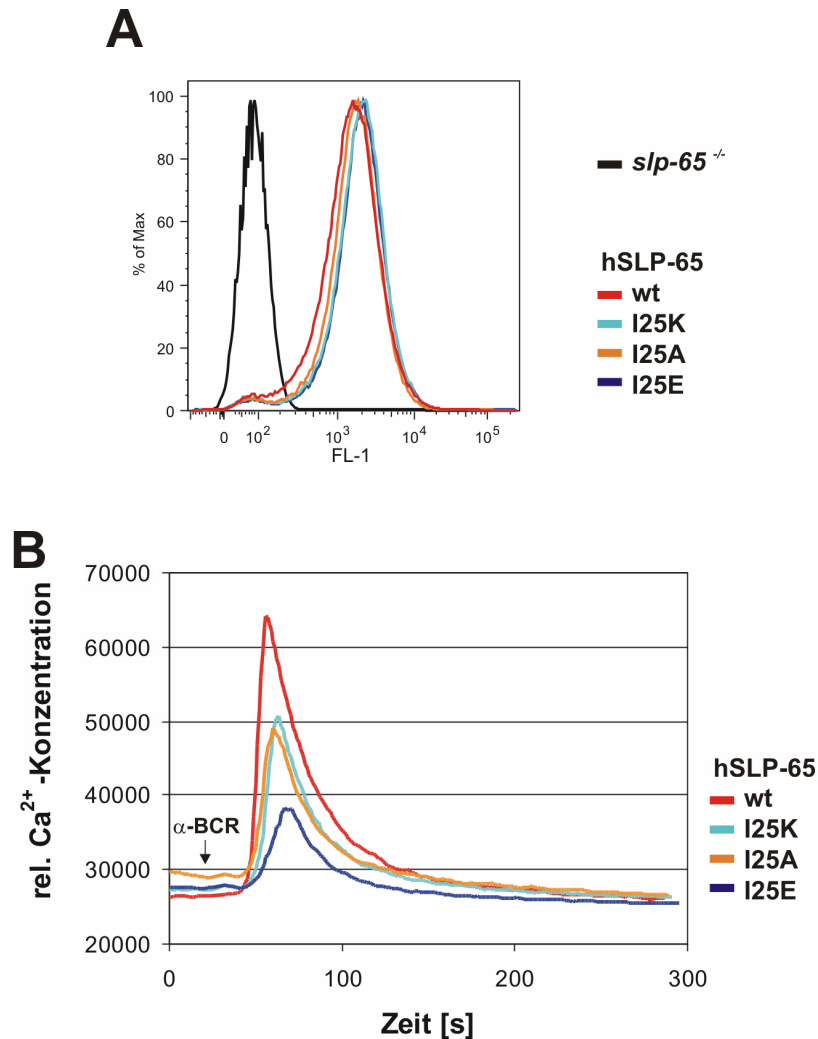
Der N-Terminus von SLP-65 umfasst einen basischen Bereich von etwa 50 Aminosäuren, welcher unter den Spezies hochkonserviert ist. Weiterhin ist auffällig, dass dieser Bereich von in regelmäßigen Abständen positionierten, hydrophoben Aminosäuren gekennzeichnet ist, vornehmlich Leucinen und Isoleucinen. 2005 beschrieben Köhler *et al.* ein Leucin-Zipper-Motiv in der N-terminalen Region von SLP-65 und konnten in primären Maus-B-Zellen die funktionelle Relevanz dieser Region in der B-Zell-Entwicklung zeigen (Kohler *et al.* 2005). Weiterhin zeigten die Autoren, dass der Aminosäureaustausch von Isoleucin in Position 25 zu Glutamat innerhalb dieses Motivs zum Block in der B-Zell-Entwicklung und damit wieder zum Phänotyp der SLP-65-defizienten Primärzellen führt. Sie führten dies auf den Verlust des Leucin-Zipper-Motivs zurück.

Bei DT40 Zellen handelt es sich um eine B-Zelllinie des Huhns, welche sich aufgrund hoher Rekombinationswahrscheinlichkeit gut eignet, um Zelllinien, die defizient in der Expression eines gewünschten Proteins sind, herzustellen (Yasuda und Yamamoto 2004). Somit stehen mehrere solcher Linien zur Verfügung, u. a. auch eine, deren Zellen kein SLP-65 exprimieren (Ishiai *et al.* 1999). Durch Gentransfer können diese Zellen mit wildtypischem SLP-65 oder Varianten dieses Proteins ausgestattet und funktionelle Analysen durchgeführt werden. Auf dieses System wurde nun zurückgegriffen, um die N-terminale, basische Region von SLP-65 näher zu charakterisieren.

#### 6.1.1 Aminosäureaustausche im postulierten Leucin-Zipper-Motiv stellen dessen Funktion für die Initiation der B-Zell-Signalleitung in Frage.

Zur Untersuchung des Leucin-Zipper-Motivs habe ich zunächst an humaner *slp-65* cDNA zielgerichtete Mutagenesen durchgeführt, so dass die Expressionsprodukte Aminosäureaustausche von Isoleucin in Position 25 zu Glutamat (I25E), wie von Köhler *et al.* beschrieben (Kohler *et al.* 2005), aber auch zu Lysin (I25K) oder Alanin (I25A) aufwiesen. Weiterhin wurde cDNA für einen Citrin-tag, der N-terminal der Expressionsprodukte liegen sollte, eingeführt. Die hergestellten Vektoren wurden retroviral in SLP-65-defiziente DT40 Zellen transduziert. Aufgrund des N-terminal gelegenen Citrin-tags konnte die Expression der SLP-65-Varianten in den hergestellten

Linien durchflusscytometrisch ermittelt werden (Abb. 6.1 A). Die Expression von wildtypischem SLP-65 und den Varianten ist in den hergestellten Linien gleich stark.



**Abb. 6.1:** Aminosäureaustausche von Isoleucin in Position 25 zu Lysin, Alanin oder Glutamat wirken sich unterschiedlich auf die Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung nach BCR-Stimulation in DT40 Zellen aus. **A**, SLP-65-defiziente DT40 Zellen (*slp-65*<sup>-/-</sup>, schwarz) wurden mit Expressionsvektoren für humanes wildtypisches SLP-65 (wt, rot) und SLP-65 mit einem Aminosäureaustausch von Isoleucin in Position 25 zu Lysin (I25K, türkis), Alanin (I25A, orange) oder Glutamat (I25E, blau) transduziert. Die Expression der Proteine wurde über deren N-terminal gelegenen Citrin-tag am LSRII im FL-1 Kanal analysiert. **B**, Die beschriebenen Zellen wurden mit dem Farbstoff Indo-1 beladen und die Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung nach Stimulation mit 1,5 μg/mL M4 am LSRII ermittelt.

Um die Funktionalität der SLP-65-Varianten zu analysieren, wurde die Kompetenz der Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung in den hergestellten Zellen betrachtet. Während die Expression von wildtypischem SLP-65 (Abb. 6.1 B, rot) einen deutlichen Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration nach BCR-Kreuzvernetzung durch gegen Huhn-IgM gerichtete Antikörper (M4) zur Folge hatte, konnte im Falle von I25E (blau) nur eine geringe

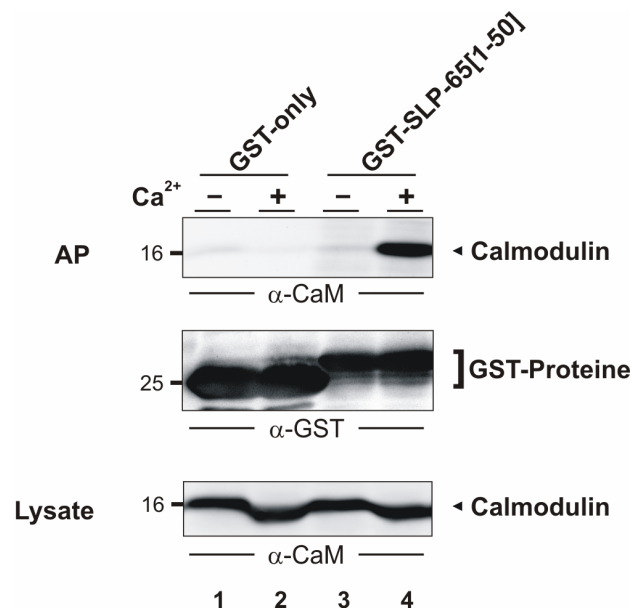
Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung festgestellt werden. Zellen, welche die Varianten I25A (orange) und I25K (türkis) exprimieren, zeigten Ca<sup>2+</sup>-Antworten, die zwischen denen von I25E und wt lagen. Keiner der Aminosäureaustausche führte zum völligen Verlust der Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierungskompetenz von SLP-65.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Leucin-Zipper-Funktion für die initialen Signalereignisse nicht erforderlich ist. Dennoch konnte anhand von I25E und auch einer N-terminal deletierten Variante von SLP-65, welche keine Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung vermitteln kann (Daten hier nicht gezeigt), bestätigt werden, dass diese Region an sich eine wichtige Funktion in der Signalinitiation ausübt. Aufgrund dieser Erkenntnisse soll nun der N-terminale, basische Bereich allgemeiner als basische Effektor-domäne (BED) bezeichnet werden.

Die in regelmäßigen Abständen angesiedelten, hydrophoben Aminosäuren Leucin und Isoleucin definieren das Leucin-Zipper-Motiv (Landschulz *et al.* 1988). Bei genauerer Betrachtung der BED-Aminosäuresequenz ist die hohe Anzahl basischer Aminosäuren auffallend. Ähnliche Eigenschaften der Primärstruktur ist auch für andere Motive beschrieben. Die Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Interaktionen einiger Proteindomänen mit dem Calciumsensor Calmodulin erfolgen über deren sogenannte 1-5-10 oder 1-8-14 Motive (Rhoads und Friedberg 1997). Diese Motive sind gekennzeichnet durch hydrophobe Aminosäuren in definierten Positionen, nämlich Positionen 1, 5 und 10 oder Positionen 1, 8 und 14 oder 1, 5, 8 und 14, und weisen dazwischen basische Aminosäuren, vorwiegend Lysine und Arginine, auf. Spricht man sauren Aminosäuren eine Ladung von -1 und basischen eine von +1 zu, sollte die Gesamtladung zwischen +2 und +6 liegen. Neben diesen strikten Motiven sind auch Varianten bekannt, die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Calmodulinbindung vermitteln können (Rhoads und Friedberg 1997). Zur genaueren Charakterisierung der BED wurde dieser Ansatz verfolgt.

### **6.1.2 Die BED vermittelt eine direkte Bindung von SLP-65 mit Calmodulin in Anwesenheit von Calciumionen.**

Um eine mögliche Bindung der BED von SLP-65 an Calmodulin zu untersuchen habe ich zunächst erfolgreich ein Fusionsprotein bestehend aus Glutathiontransferase und den ersten 50 Aminosäuren des humanen SLP-65-Proteins rekombinant hergestellt und, an eine GSH-Matrix gekoppelt, für Affinitätspräzipitationen aus Ramos Zelllysaten eingesetzt. Diese wurde zum einen in Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup> durchgeführt, zum anderen wurde der Chelator Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N',-tetraessigsäure (EGTA) eingesetzt, um freie Calciumionen abzufangen. Als Kontrolle diente Glutathiontransferase allein (GST-only).

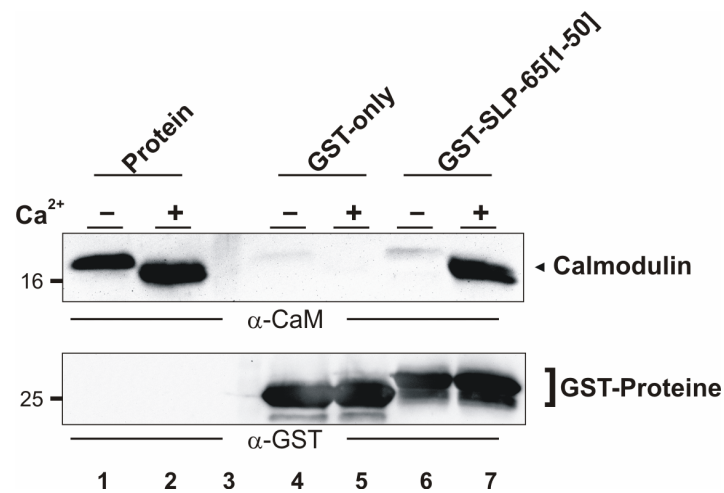


**Abb. 6.2: SLP-65-BED bindet Calmodulin in Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup>.**  $3 \times 10^7$  Zellen der Linie Ramos wurden mit Lysepuffer mit Ca<sup>2+</sup> (+) oder Lysepuffer mit EGTA (-) lysiert. Die Lysate wurden dann einer Affinitätspräzipitation (AP, oben und Mitte) mit dem Fusionsprotein GST-SLP-65[1-50] unterzogen (Spuren 3 und 4) und die präzipitierten Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Westernblotting mit Antikörpern gegen Calmodulin (CaM, oben) und GST (Mitte) analysiert. Als Kontrolle diente die parallel durchgeführte Affinitätspräzipitation mit GST-only (Spuren 1 und 2). Proben der hergestellten Lysate wurden der SDS-PAGE unterzogen und die aufgetrennten Proteine mittels Westernblotting mit Antikörpern gegen Calmodulin analysiert (unten). Die relativen Molekulargewichte von Markerproteinen sind links in kDa angegeben.

Obwohl sogar eine größere Menge an Kontrollprotein (GST-only, Abb. 6.2, Spuren 1 und 2) für die Affinitätspräzipitation eingesetzt wurde (Mitte), konnte nur mit dem Fusionsprotein (GST-SLP-65[1-50], Spur 4) Calmodulin aus den Lysaten isoliert werden (oben). Hierbei war die Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup> unerlässlich (Spur 4). Die eingesetzten Lysate wiesen gleiche Mengen an Calmodulin auf (unten). Auffällig ist, dass das Laufverhalten des Proteins je nach Lysepuffer unterschiedlich war.

Diese hier erstmalig beschriebene Interaktion zwischen der BED von SLP-65 und Calmodulin ist eine direkte Bindung, wie ich durch Affinitätspräzipitationen zeigen konnte, bei denen rekombinantes Calmodulin in Lysepuffer mit Ca<sup>2+</sup> oder mit EGTA vorgelegt wurde (Abb. 6.3). Aus Proteinlösungen mit vergleichbaren Mengen an Calmodulin in den unterschiedlichen Puffern (Spuren 1 und 2) konnte nur mit dem Fusionsprotein GST-SLP-65[1-50] in Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup> Calmodulin isoliert werden (Spur 7), jedoch nicht mit dem Kontrollprotein GST-only oder in Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> (Spuren 4 bis 6). Wiederum war das unterschiedliche Laufverhalten von Calmodulin in den verschiedenen

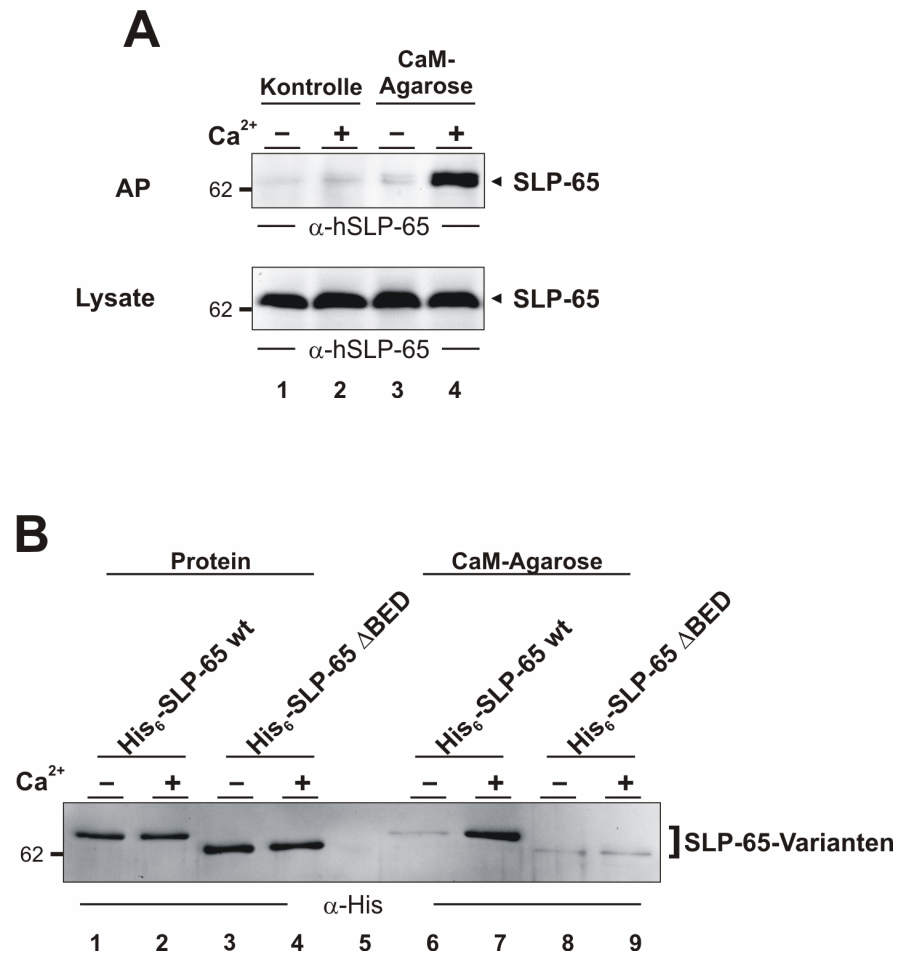
Puffern festzustellen. Dies ist wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Kompositionen der Lysepuffer zurückzuführen und war auch in den folgenden Experimenten zu beobachten.



**Abb. 6.3: Die basische Effektdomäne von SLP-65 bindet Calmodulin direkt.** Rekombinantes Calmodulin wurde in Lysepuffer mit  $Ca^{2+}$  (+) oder Lysepuffer mit EGTA (-) vorgelegt und eine Affinitätspräzipitation mit GST-only (Spuren 4 und 5) oder GST-SLP-65[1-50] (Spuren 6 und 7) durchgeführt. Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden diese mittels Westernblotting mit Antikörpern gegen Calmodulin (oben) und GST (unten) analysiert. Eine Probe der eingesetzten Proteinlösungen wurde in Spuren 1 und 2 analysiert.

Ebenfalls war es mir möglich mit kovalent an Agarose gekoppeltem Calmodulin wildtypisches, endogenes SLP-65 aus Lysaten der humanen B-Zelllinie Ramos zu isolieren. SLP-65 konnte wiederum nur in Anwesenheit von  $Ca^{2+}$  erhalten werden (Abb. 6.4 A, Spur 4). Als Kontrolle diente eine Protein A/G-Agarose-Matrix (Spuren 1 und 2). Um auch hier die direkte Interaktion des kompletten SLP-65 mit Calmodulin zu bestätigen, habe ich die humane cDNA von wildtypischem SLP-65 und solchem, bei dem die ersten 48 Aminosäuren fehlen, in einen Expressionsvektor so ligiert, dass die entsprechenden Produkte mit einem N-terminal gelegenen  $His_6$ -tag rekombinant in *E.coli* hergestellt werden konnten. Die Aufreinigung der Proteine  $His_6$ -SLP-65 wt und  $His_6$ -SLP-65  $\Delta$  BED erfolgte über die Histidinreste an einer Protino<sup>®</sup>  $Ni^{2+}$ -IDA Säule. Gleiche Mengen an Proteinen (Abb. 6.4 B, Spuren 1 bis 4) wurden in Lysepuffer mit  $Ca^{2+}$  (+) und Lysepuffer mit EGTA (-) vorgelegt. Die Aufreinigung mit Calmodulin-Agarose war nur im Falle von  $His_6$ -SLP-65 wt in der Anwesenheit von Calciumionen (Spur 7) möglich. Diese hier erzielten Ergebnisse bestätigen die Interaktion von SLP-65 mit Calmodulin und zeigen *in vitro* die Abhängigkeit von der BED.

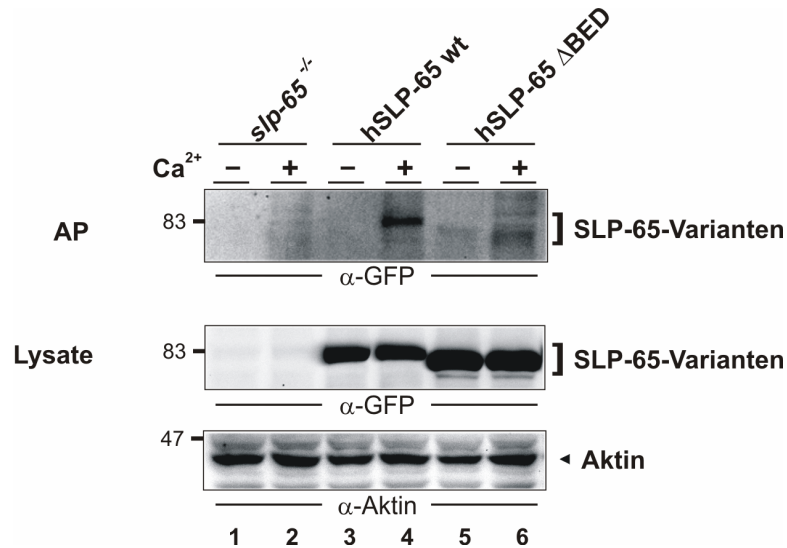




**Abb. 6.4: Wildtypisches SLP-65 bindet Calmodulin in Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup>.** **A**,  $3 \times 10^7$  Ramos Zellen wurden mit Lysepuffer mit Ca<sup>2+</sup> (+) oder Lysepuffer mit EGTA (-) lysiert. Die Lysate wurden einer Affinitätspräzipitation (AP; oben) mit an Agarose gekoppeltem Calmodulin (Spuren 3 und 4) unterzogen, die präzipitierten Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Westernblotting mit Antikörpern gegen SLP-65 analysiert (oben). Als Kontrolle diente Protein A/G-Agarose (Spuren 1 und 2). Proben der hergestellten Lysate wurden ebenfalls durch Auftrennung der Proteine im Gel und anschließendem Westernblotting analysiert (unten). **B**, Wildtypisches SLP-65 (His<sub>6</sub>-SLP-65 wt) und SLP-65, welchem die ersten 48 Aminosäuren fehlen (His<sub>6</sub>-SLP-65 ΔBED), wurden in *E. coli* exprimiert und die Proteine mittels eines N-terminal gelegenen His<sub>6</sub>-tags über eine Protino<sup>®</sup> Ni-IDA-Matrix aufgereinigt. Die so gewonnenen Proteine wurden in Lysepuffer mit Ca<sup>2+</sup> (+) oder Lysepuffer mit EGTA (-) vorgelegt und einer Affinitätspräzipitation mit Calmodulin-Agarose unterzogen (Spuren 6 bis 9). Nach Auftrennung der erhaltenen Proteine mittels SDS-PAGE wurden diese durch Westernblotting mit Antikörpern gegen Histidin analysiert. Proben der eingesetzten Proteinlösungen wurden in Spuren 1 bis 4 mit analysiert.

Weiterhin habe ich die für die beschriebenen Proteine codierende cDNA in einen retroviralen Expressionsvektor ligiert und SLP-65-defiziente B-Zellen damit transfiziert. Die Expressionsprodukte weisen einen N-terminalen Citrin-tag auf. Lysate dieser Zellen wurden Affinitätspräzipitationen mit Calmodulin-Agarose unterzogen. Aus Lysaten von Zellen, welche wildtypisches SLP-65 (hSLP-65 wt, Abb. 6.5, Spuren 3 und 4) exprimierten, konnte das Protein in Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup> mit Calmodulin-Agarose isoliert

werden (oben, Spur 4). Fehlten die ersten 48 Aminosäuren von SLP-65 (hSLP-65  $\Delta$ BED, Spuren 5 und 6), wurden nur geringe Mengen an Protein erhalten (oben, Spur 6), trotz der stärkeren Expression dieser Variante (Mitte und unten). Als Kontrolle diente hier die parentale Zelllinie, welche kein endogenes SLP-65 exprimiert (*slp-65*<sup>-/-</sup>, Spuren 1 und 2). Dies bestätigt wiederum eine BED-abhängige Interaktion von SLP-65 mit Calmodulin.

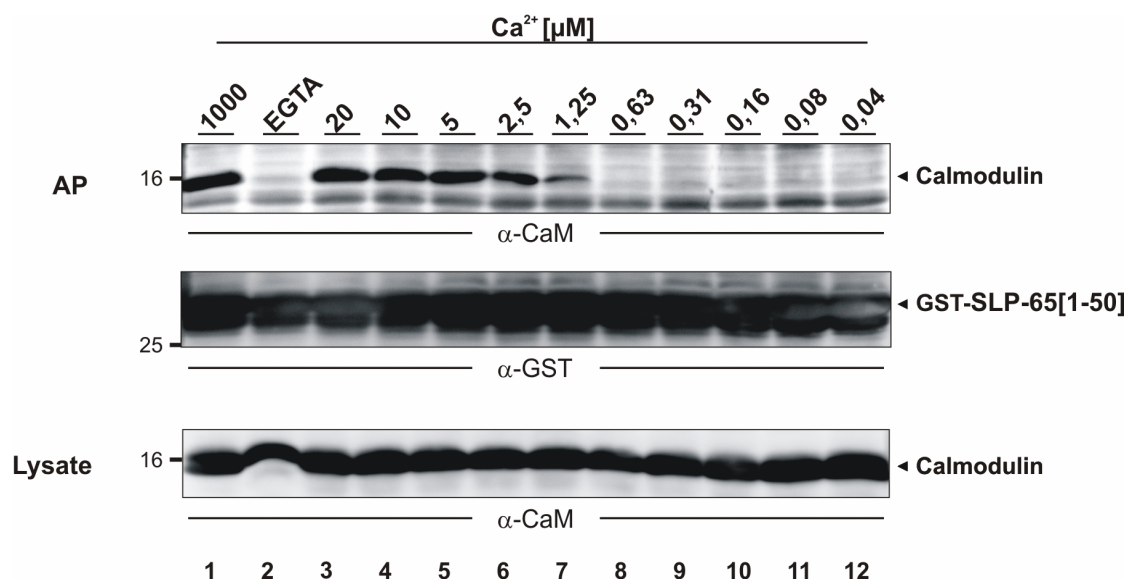


**Abb. 6.5:** Nur wildtypisches SLP-65 kann aus Zelllysaten mit Calmodulin-Agarose aufgereinigt werden.  $3 \times 10^7$  SLP-65-defiziente DT40 Zellen (*slp-65*<sup>-/-</sup>, Spuren 1 und 2) oder mit humanem wildtypischem SLP-65 (hSLP-65 wt, Spuren 3 und 4) oder SLP-65 ohne BED (hSLP-65  $\Delta$ BED, Spuren 5 und 6) rekonstituierte DT40 Zellen wurden mit Lysepuffer mit  $\text{Ca}^{2+}$  (+) oder Lysepuffer mit EGTA (-) lysiert. Die Lysate wurden einer Affinitätspräzipitation mit Calmodulin-Agarose unterzogen und präzipitierte Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Westernblotting mit Antikörpern gegen GFP (oben) sichtbar gemacht. Proben der hergestellten Lysate wurden ebenfalls einer SDS-PAGE unterzogen und aufgetrennte Proteine mit Antikörpern gegen GFP (Mitte) oder Aktin (unten) detektiert. Die relativen Molekulargewichte von Markerproteinen sind links angegeben in kDa.

Zusammenfassend konnte ich unter Verwendung unterschiedlicher Systeme eine direkte, durch die N-terminale BED vermittelte Interaktion von SLP-65 mit Calmodulin zeigen. Diese Interaktion ist abhängig von der Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 6.1.3 Die kritische $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration für die Interaktion von SLP-65-BED und Calmodulin liegt im Bereich der cytosolischen $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von stimulierten Zellen.

In ruhenden Säugerzellen liegt die cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in einem Bereich von 10-100 nM. Rezeptorstimulation und damit verbundene Öffnung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen kann in einem Anstieg dieser Konzentration auf je nach Zelltyp bis zu 10  $\mu\text{M}$  resultieren (Engelke *et al.* 2007). Um eine physiologische Relevanz der soeben erstmalig beschriebenen Interaktion von SLP-65 und Calmodulin und eine Rolle in der Signalleitung nach BCR-Stimulation abzuschätzen, wurde die Konzentration der Calciumionen im Lysepuffer über genau diesen Bereich variiert. Eine Analyse der mit dem Fusionsprotein GST-SLP-65[1-50] isolierten Proteine aus den so hergestellten Lysaten ist in Abbildung 6.6 gezeigt. Als Kontrollen dienten Lysepuffer mit  $\text{Ca}^{2+}$  (1 mM, Spur 1) und Lysepuffer mit EGTA (EGTA, Spur 2), wie sie in den schon beschriebenen Experimenten eingesetzt wurden. Wie ich zeigen konnte, ist eine Präzipitation von Calmodulin durch die BED von SLP-65 nur möglich, wenn die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei 1,25  $\mu\text{M}$  und höher liegt (Spur 1 und Spuren 3 bis 7).



**Abb. 6.6:** Die für die SLP-65-Calmodulin-Interaktion kritische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration liegt zwischen 0,63  $\mu\text{M}$  und 1,25  $\mu\text{M}$ .  $3 \times 10^7$  Zellen der Linie Ramos wurden mit Lysepuffer mit den angegebenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (Spuren 1 und 3 bis 12) oder Lysepuffer mit EGTA (Spur 2) lysiert und die Lysate einer Affinitätspräzipitation mit dem Fusionsprotein GST-SLP-65[1-50] unterzogen. Isolierte Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Westernblotting mit Antikörpern gegen Calmodulin (oben) oder GST (Mitte) analysiert. Proben der hergestellten Lysate wurden ebenfalls mit Antikörpern gegen Calmodulin analysiert (unten).

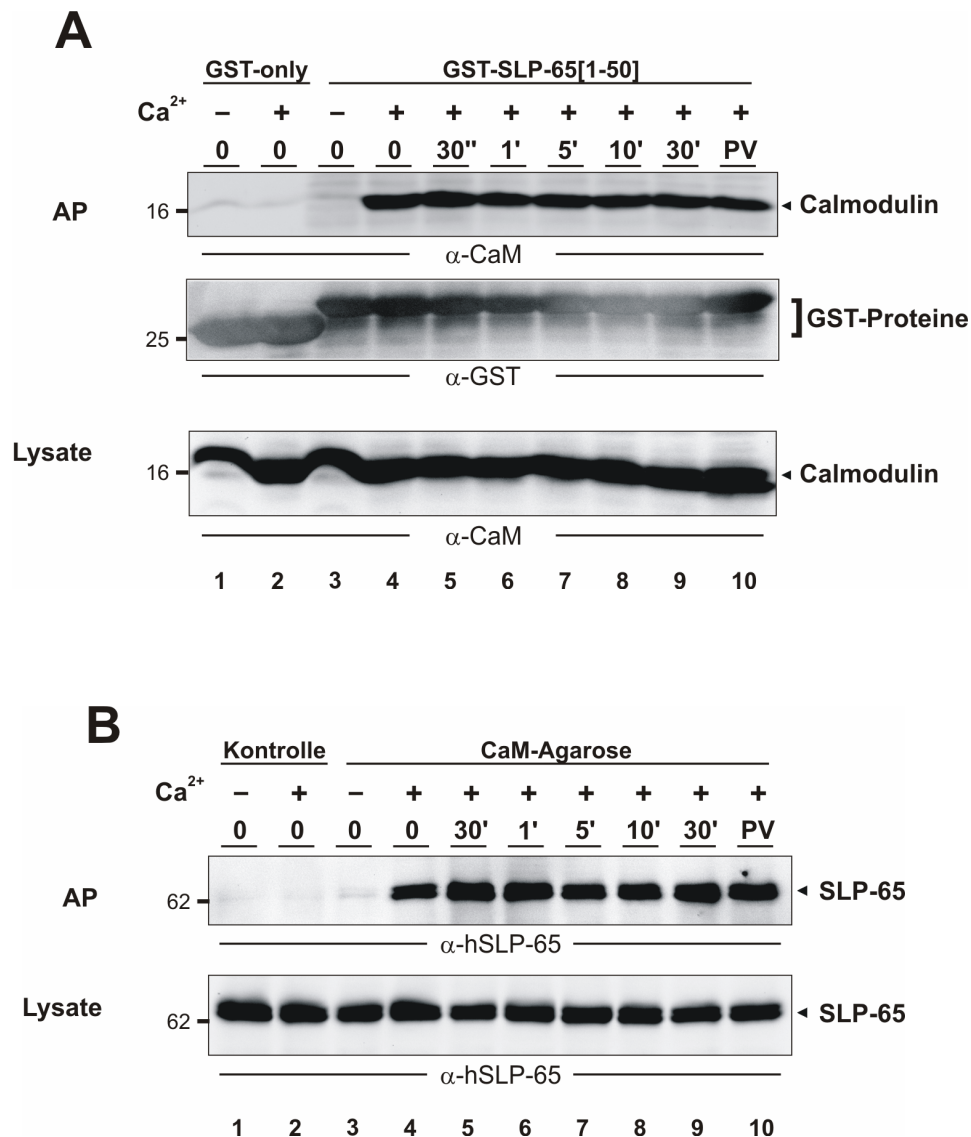
Somit liegt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, welche für die Interaktion der BED mit Calmodulin essentiell ist, in einem Bereich, der die cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von stimulierten, nicht aber von unstimulierten Zellen widerspiegelt. Dieses Ergebnis legt nahe, dass *in vivo* eine Interaktion der BED mit Calmodulin nicht in ruhenden Zellen, sondern erst mit einem Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Stimulation stattfindet. Ob weitere stimulationsabhängige Faktoren diese Interaktion beeinflussen, wurde im folgenden erörtert.

#### **6.1.4 Die Interaktion von SLP-65 und Calmodulin ist unabhängig von bekannten oder möglichen stimulationsabhängigen Modifikationen dieser Proteine.**

Nach BCR-Stimulation kommt es zu einer Reihe von Modifikationen an Proteinen. Auch SLP-65 wird stimulationsabhängig an unterschiedlichen Tyrosinresten phosphoryliert (Fu *et al.* 1998). Weiterhin konnten Oellerich *et al.* kürzlich 41 Phosphorylierungsstellen innerhalb von SLP-65 (für die Spezies Huhn) nachweisen, wovon 26 Serine, sechs Threonine und neun Tyrosine exakt zugeordnet wurden (Oellerich *et al.* 2009). Tatsächlich ist die Phosphorylierung von Serinresten und Threoninresten nahe von Calmodulinbindestellen als Regularium für diese Bindung beschrieben (McIlroy *et al.* 1991; Matsuoka *et al.* 1996). Umgekehrt ist bislang noch keine Modifikation an Aminosäuren von Calmodulin nach BCR-Stimulation beschrieben. Dennoch ist die Phosphorylierung von Calmodulin nach Rezeptorstimulation bekannt (Sacks *et al.* 1992; Benguria *et al.* 1994; Joyal und Sacks 1994; Joyal *et al.* 1996). Weiterhin ist beschrieben, dass die Phosphorylierung von Calmodulin an Serinen, Threoninen oder Tyrosinen dessen Interaktion mit Zielproteinen beeinflusst (Corti *et al.* 1999; Leclerc *et al.* 1999).

Um festzustellen, ob mögliche stimulationsabhängige Aminosäuremodifikationen von Calmodulin die Interaktion mit der SLP-65-BED beeinflussen, habe ich Affinitätspräzipitationen mit dem GST-SLP-65[1-50] Fusionsprotein in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  aus Lysaten stimulierter Ramos Zellen durchgeführt (Abb. 6.7 A, Spuren 5 bis 10). Die Zellen wurden zum einen durch Kreuzvernetzung des BCR für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert (Spuren 5 bis 9) oder für 10 min mit Pervanadat, einem Phosphatase-Inhibitor (Spur 10), behandelt. Es konnte kein Unterschied in der Isolierung von Calmodulin festgestellt werden, solange die Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  gegeben war.

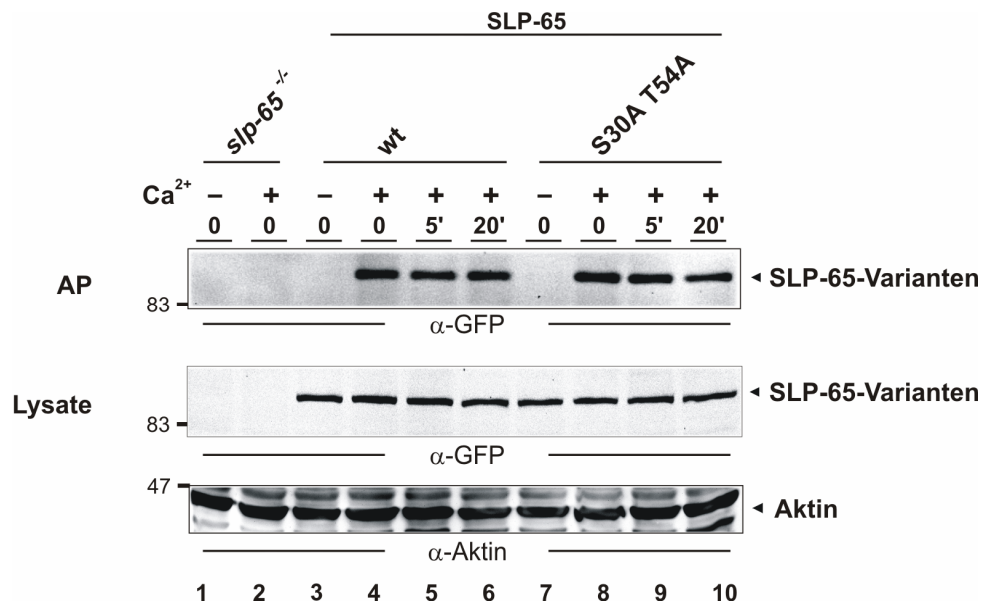
Auch stimulationsabhängige Phosphorylierungen von SLP-65 konnten über diesen Zeitraum die Isolierung des Proteins mit Calmodulin-Agarose in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  nicht beeinflussen (Abb. 6.7 B).



**Abb. 6.7:** Stimulationsabhängige bekannte oder mögliche Modifikationen der Interaktionspartner SLP-65 und Calmodulin beeinflussen die Bindung nicht. A,  $3 \times 10^7$  Ramos Zellen wurden unstimuliert belassen (0) oder für die angegebene Zeit mit anti-hlgM-F(ab)<sub>2</sub> (Spuren 5 bis 9) oder 10 min mit einer Pervanadatlösung (PV, Spur 10) stimuliert und mit Lysepuffer mit Ca<sup>2+</sup> (+) oder Lysepuffer mit EGTA (-) lysiert. Die Lysate wurden einer Affinitätspräzipitation mit GST-only (Spuren 1 und 2) oder GST-SLP-65[1-50] (Spuren 3 bis 10) unterzogen und erhaltene Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Westernblotting mit Antikörpern gegen Calmodulin (oben) oder GST (Mitte) sichtbar gemacht. Proben der Lysate wurde ebenfalls analysiert (unten). Die relativen Molekulargewichte von Markerproteinen sind links in kDa angegeben. B, Lysate aus wie in A behandelten Zellen wurden einer Affinitätspräzipitation mit Protein A/G-Agarose (Spuren 1 und 2) oder Calmodulin-Agarose (Spuren 3 bis 10) unterzogen und erhaltene Proteine mittels Westernblotting mit Antikörpern gegen SLP-65 sichtbar gemacht (oben). Proben der Lysate wurden ebenfalls analysiert (unten).

Die in Abbildung 6.7 beschriebenen Affinitätspräzipitationen erfolgten aus Lysaten der humanen Linie Ramos. SLP-65 der Spezies Huhn weist im N-terminalen, basischen Bereich in Position 30 ein Serin und in Position 54 ein Threonin auf, welche nach BCR-

Stimulation phosphoryliert werden (Oellerich *et al.* 2009). Diese beiden Reste sind im humanen SLP-65 nicht vorhanden. Somit könnte die Situation bezüglich der Regulation der Calmodulinbindung durch Phosphorylierung von Serinen und Threoninen zwischen diesen Spezies unterschiedlich sein. Daher wurden zusätzlich DT40 Zellen untersucht, welche SLP-65 des Huhns entweder in wildtypischer Form oder mit Aminosäureaustauschen von Serin zu Alanin in Position 30 und Threonin zu Alanin in Position 54 exprimieren. Diese Zellen wurden freundlicherweise von Hanibal Bohnenberger zur Verfügung gestellt. Die Expressionsprodukte weisen einen C-terminalen GFP-*tag* auf. Die Isolation der SLP-65-Varianten mit Calmodulin-Agarose war in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  aus Lysaten sowohl unstimulierter (Abb. 6.8, Spuren 4 und 8), als auch für 5 min (Spuren 5 und 9) oder 20 min (Spuren 6 und 10) stimulierter Zellen möglich. Dabei nahmen die Aminosäureaustausche keinen Einfluss.



**Abb. 6.8:** Aminosäureaustausche von Serin in Position 30 und Threonin in Position 54 zu jeweils Alanin in SLP-65 beeinflussen die SLP-65-Calmodulin-Interaktion nicht.  $3 \times 10^7$  SLP-65-defiziente DT40 Zellen (*slp-65*<sup>-/-</sup>, Spuren 1 und 2) oder mit wildtypischem Huhn SLP-65 (wt, Spuren 3 bis 6) oder Huhn SLP-65 mit Aminosäureaustauschen von Serin zu Alanin in Position 30 und Threonin zu Alanin in Position 54 (S30A T54A, Spuren 7 bis 10) rekonstituierte DT40 B-Zellen wurden unstimuliert belassen (Spuren 1 bis 4 und 7 und 8) oder mit 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  M4 für 5 min (Spuren 5 und 9) oder 20 min (Spuren 6 und 10) stimuliert. Die Zellen wurden mit Lysepuffer mit  $\text{Ca}^{2+}$  (+) oder Lysepuffer mit EGTA (-) lysiert und die geklärten Lysate einer Affinitätspräzipitation mit Calmodulin-Agarose unterzogen. Erhaltene Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Westernblotting mit Antikörpern gegen GFP (oben) sichtbar gemacht. Proben der hergestellten Lysate wurden ebenfalls einer SDS-PAGE unterzogen und aufgetrennte Proteine mit Antikörpern gegen GFP (Mitte) oder Aktin (unten) detektiert. Die relativen Molekulargewichte von Markerproteinen sind links angegeben in kDa.

Zusammenfassend zeigt dies, dass bekannte oder mögliche stimulationsabhängige Modifikationen der Interaktionspartner SLP-65 und Calmodulin deren Bindung über den hier beobachteten Zeitraum nicht beeinflussen.

### 6.1.5 Ein Aminosäureaustausch I25K im zweiten Calmodulinbindemotiv unterbindet die Interaktion der isolierten BED mit Calmodulin.

Drei Motive für die Calmodulinbindung sind in den ersten 50 Aminosäuren von SLP-65 möglich (Abb. 6.9).

		1	5	8	15	1	5	8	10	15	
Mensch	1-	MDKLNKITVP	ASQKLRQLQK	MVHDIKNNEG	GIMNKIKKLK	VKAPPSVPRR	-50				
Maus	1-	MDKLNKITVP	ASQKLRQLQK	MVHDIKNNEG	GIMDKIKKLK	VKGPPSVPRR	-50				
Huhn	1-	MDKLNKLAVP	AGEKFRKLQK	MVHDIKNNES	GIINKFKKFQ	NEQVALICKT	-50				

**Abb. 6.9:** Die BED von SLP-65 beinhaltet drei mögliche Calmodulinbindemotive. Sequenzen der ersten 50 Aminosäuren von SLP-65 der Spezies Mensch (oben), Maus (Mitte) und Huhn (unten). Drei mögliche Calmodulinbindemotive sind in schwarz angegeben. Abweichungen für Huhn SLP-65 sind in grau gehalten.

Während die ersten beiden nicht strikt einem 1-8-14 Motiv entsprechen, sondern die letzte Aminosäure um eine Position verschoben ist, ist im Falle des dritten ein klassisches 1-5-10 Motiv zu erkennen. Das erste Motiv umfasst die Aminosäuren 4 bis 18. In den Positionen 1, 8 und 15 sind hydrophobe Aminosäuren lokalisiert und die Ladung in diesem Bereich ist +3 (für SLP-65 von Mensch und Maus). Im Falle der Aminosäuresequenz von SLP-65 des Huhns ist sogar zusätzlich eine hydrophobe Aminosäure in Position 5 vorhanden und die Ladung beträgt +4. Das zweite Motiv umfasst die Aminosäuren 25 bis 39. Auch hier sind hydrophobe Aminosäuren in Positionen 1, 8 und 15 angesiedelt, die Ladung beträgt +3 für Mensch, +2 für Maus und +4 für Huhn. Das dritte, einzige strikte Motiv für die Sequenz von Mensch und Maus, liegt im Bereich der Aminosäuren 32 bis 41 und weist die hydrophoben Reste in Positionen 1, 5 und 10 auf. Die Ladung ist hier +3 für Mensch und +2 für Maus. Bei diesem Motiv ist im Falle des SLP-65 des Huhns eine andere Anordnung zu finden, nämlich hydrophobe Aminosäuren in Positionen 1, 8 und 15 mit einer Ladung von +2.

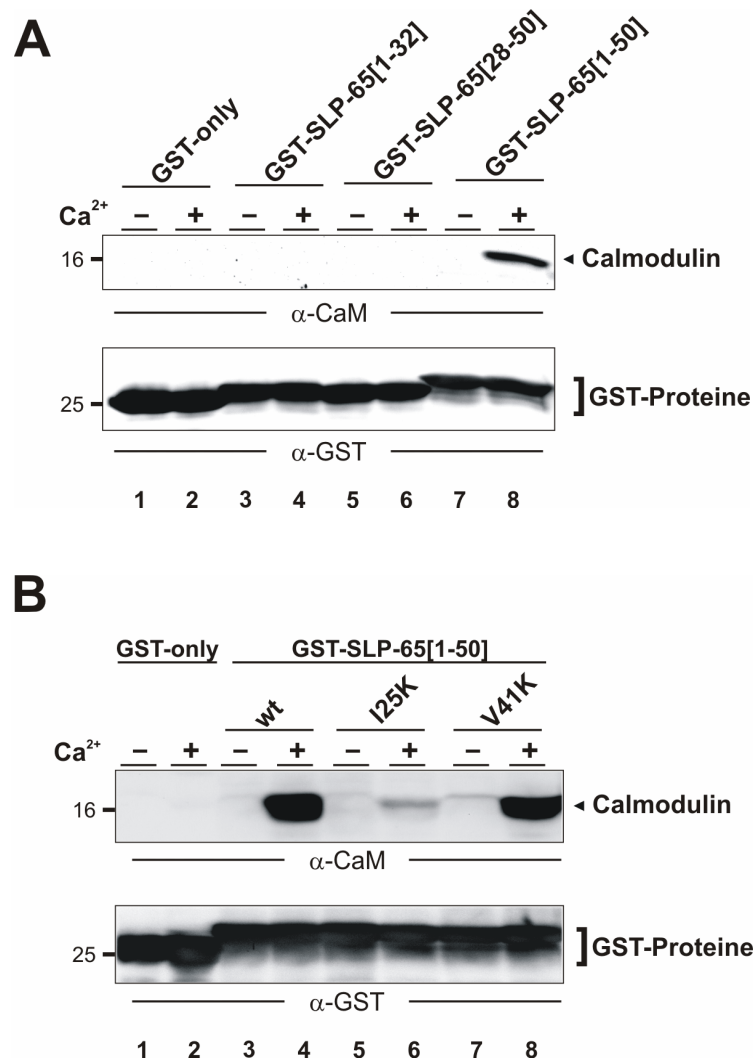
Ein weiteres Calmodulinbindemotiv wäre denkbar für den Bereich der Aminosäuren 18 bis 32, jedoch wird die Ladung hier durch saure Aminosäuren (Aspartat in Position 24 und

Glutamat in Position 29) ausgeglichen und liegt somit bei 0 für alle drei hier betrachteten Spezies.

Um die Calmodulinbindefähigkeit der BED von SLP-65 näher zu charakterisieren, habe ich zunächst Fusionsproteine hergestellt, welche das erste Motiv oder das dritte, strikte Motiv von humanem SLP-65 komplett enthalten, nämlich GST-SLP-65[1-32] und GST-SLP-65[28-50]. Affinitätspräzipitationen mit diesen Fusionsproteinen zeigten, dass eine Isolierung von Calmodulin aus Zelllysaten in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  nur mit GST-SLP-65[1-50] möglich ist (Abb. 6.10 A, Spur 8). Mit den das erste oder das dritte Motiv beinhaltenden Fusionsproteinen GST-SLP-65[1-32] und GST-SLP-65[28-50] war die Isolierung nicht möglich (Spuren 3 und 4, sowie Spuren 5 und 6). Dies ließ darauf schließen, dass das zweite Motiv oder mehrere Motive zusammen für eine Interaktion mit Calmodulin nötig sind. Aminosäureaustausche innerhalb des zweiten und dritten Motivs sollten Aufschluss darüber geben. Durch zielgerichtete Mutagenesen an der für das Fusionsprotein GST-SLP-65[1-50] codierenden cDNA habe ich Aminosäureaustausche in Position 25 von Isoleucin zu Lysin für das zweite Motiv und in Position 41 von Valin zu Lysin für das dritte Motiv vorgenommen. Durch die Wahl von Lysinen sollte die nötige Gesamtladung in diesem Bereich nicht negativ verändert werden, wie es bei Austauschen zu sauren Aminosäuren der Fall gewesen wäre.

Wiederum wurden Affinitätspräzipitationen aus Ramoslysaten durchgeführt. Im Falle des Aminosäureaustausches von Valin zu Lysin im dritten Motiv (V41K; Abb. 6.10B, Spuren 7 und 8) konnte keine Einschränkung der Interaktion mit Calmodulin in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  beobachtet werden (Spur 8). Dahingegen führte der Aminosäureaustausch im mittleren Motiv (I25K, Spuren 5 und 6) zu einem nahezu vollständigen Verlust der Interaktion der BED mit Calmodulin. Für die Interaktion der isolierten SLP-65-BED mit Calmodulin ist also das die Aminosäuren 25-39 umfassende Motiv essentiell.

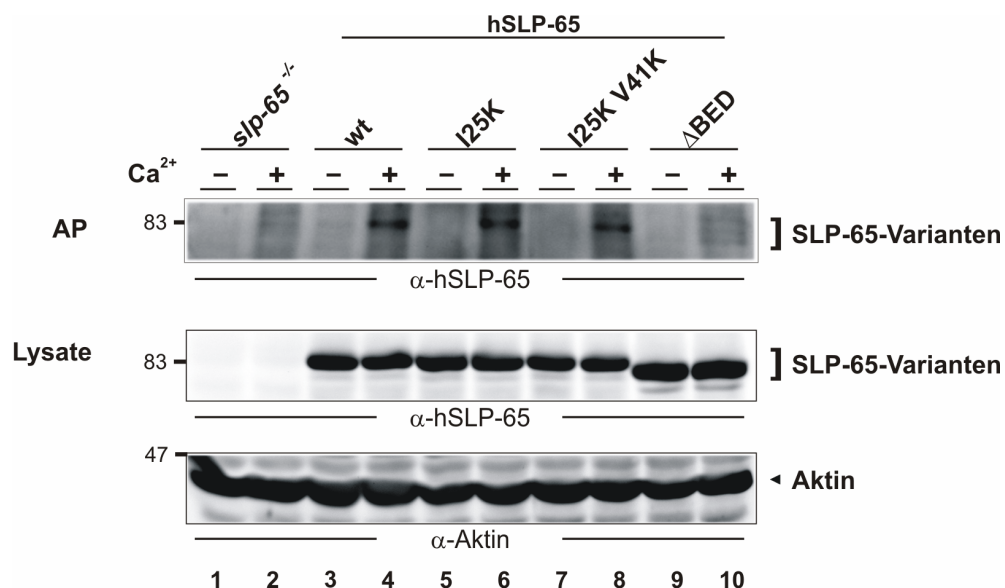




**Abb. 6.10: Die Interaktion der BED von SLP-65 mit Calmodulin ist von Isoleucin in Position 25 abhängig.** **A**,  $3 \times 10^7$  Zellen der Linie Ramos wurden mit Lysepuffer mit  $Ca^{2+}$  (+) oder Lysepuffer mit EGTA (-) lysiert. Die geklärten Lysate wurden vereint und anschließend wieder gleiche Mengen an Lysat für Affinitätspräzipitationen mit den Fusionsproteinen GST-SLP-65[1-32] (Spuren 3 und 4), GST-SLP-65[28-50] (Spuren 5 und 6) und GST-SLP-65[1-50] (Spuren 7 und 8) eingesetzt. Die erhaltenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Westernblotting mit Antikörpern gegen Calmodulin (oben) und GST (unten) analysiert. Als Kontrolle diente die parallel durchgeführte Affinitätspräzipitation mit GST-only (Spuren 1 und 2). Die relativen Molekulargewichte von Markerproteinen sind links in kDa angegeben. **B**, Wie in A hergestellte Lysate wurden Affinitätspräzipitationen mit dem wildtypischen Fusionsprotein GST-SLP-65[1-50] (wt, Spuren 3 und 4) oder Fusionsproteinen, bei denen Aminosäureaustausche in Position 25 (I25K, Spuren 5 und 6) oder 41 (V41K, Spuren 7 und 8) vorlagen, unterzogen. Präzipitierte Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Westernblotting mit Antikörpern gegen Calmodulin (oben) und GST (unten) analysiert. Als Kontrolle diente die parallel durchgeführte Affinitätspräzipitation mit GST-only (Spuren 1 und 2).

### 6.1.6 Vollständiges, in B-Zellen-exprimiertes SLP-65 kann trotz Aminosäureaustausch I25K mit Calmodulin interagieren.

Im Folgenden habe ich DT40 Zelllinien etabliert, welche die humanen SLP-65-Varianten exprimieren, die die Aminosäureaustausche I25K und V41K allein oder in Kombination aufweisen. Analog zu den schon beschriebenen Linien (Kapitel 1.1.1) sind auch hier die Expressionsprodukte mit einem N-terminalen Citrin-tag ausgestattet. Wiederum wurden aus Lysaten Affinitätspräzipitationen mit an Agarose gekoppeltem Calmodulin durchgeführt (Abb. 6.11). Sowohl wildtypisches SLP-65 (wt, Spuren 3 und 4), als auch die Varianten mit den Aminosäureaustauschen I25K (Spuren 5 und 6) oder I25K V41K (Spuren 7 und 8) konnten mit Calmodulin-Agarose isoliert werden. Dies zeigt, dass die zuvor erzielten Ergebnisse für die isolierte BED nicht auf das komplette, direkt in B-Zellen-exprimierte SLP-65-Protein zu übertragen sind. Hier scheinen andere Faktoren hinzuzukommen.



**Abb. 6.11:** Die Interaktion von SLP-65 und Calmodulin wird nicht durch Aminosäureaustausche von Isoleucin in Position 25 und Valin in Position 41 beeinflusst.  $3 \times 10^7$  SLP-65-defiziente DT40 Zellen (*slp-65<sup>-/-</sup>*, Spuren 1 und 2) oder mit humanem wildtypischem SLP-65 (wt, Spuren 3 und 4), SLP-65 mit den Aminosäureaustauschen I25K (Spuren 5 und 6) oder I25K V41K (Spuren 7 und 8) oder SLP-65 ohne BED ( $\Delta$ BED, Spuren 9 und 10) rekonstituierte Zellen wurden mit Lysepuffer mit Ca<sup>2+</sup> (+) oder Lysepuffer mit EGTA (-) lysiert. Geklärte Lysate wurden einer Affinitätspräzipitation mit Calmodulin-Agarose unterzogen und isolierte Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Westernblotting mit Antikörpern gegen humanes SLP-65 (oben) sichtbar gemacht. Proben der hergestellten Lysate wurden ebenfalls einer SDS-PAGE unterzogen und aufgetrennte Proteine mit Antikörpern gegen humanes SLP-65 (Mitte) oder Aktin (unten) detektiert. Die relativen Molekulargewichte von Markerproteinen sind links in kDa angegeben.

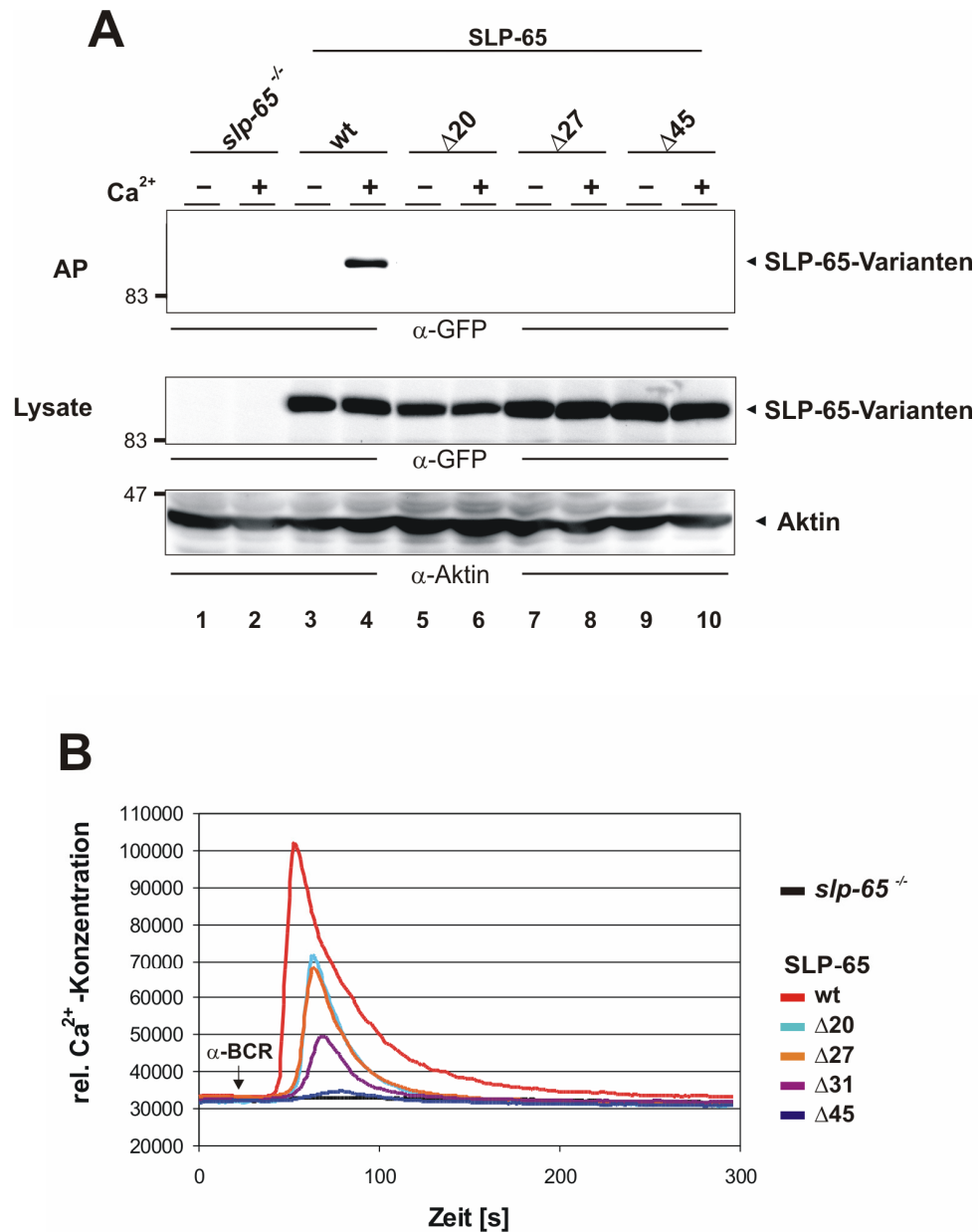
### **6.1.7 SLP-65 $\Delta$ 20 bindet kein Calmodulin und zeigt moderate $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung.**

Die für die Interaktion von GST-SLP-65[1-50] mit Calmodulin essentielle Aminosäure Isoleucin in Position 25 scheint für das komplette Protein vernachlässigbar. Um auch für das komplette Protein mögliche Calmodulinbindestellen einzuschränken, wurde im folgenden auf Zellen zurückgegriffen, die wildtypisches SLP-65 (wt) oder Varianten, denen die ersten 20 ( $\Delta$ 20), 27 ( $\Delta$ 27), oder 45 ( $\Delta$ 45) Aminosäuren fehlen, exprimieren. Alle Proteine basieren auf SLP-65 der Spezies Huhn und weisen einen C-terminalen Citrin-*tag* auf. Die Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Ingo Goldbeck zur Verfügung gestellt.

Eine Isolierung von wildtypischem SLP-65 aus Zelllysaten war hier wiederum möglich (Abb. 6.12 A, Spuren 3 und 4), wohingegen bereits bei der Deletion der ersten 20 Aminosäuren keine Interaktion von Calmodulin und SLP-65 mehr nachzuweisen war (Spuren 5 und 6). Auch die weiteren Deletionsvarianten von SLP-65 konnten nicht mit Calmodulin-Agarose isoliert werden (Spuren 7 bis 10). Ich konnte also zeigen, dass schon das Fehlen der ersten 20 Aminosäuren die Interaktion von SLP-65 mit Calmodulin verhindert. Darüber hinaus ist hiermit auch gezeigt, dass die zuvor für humanes SLP-65 beschriebene Interaktion mit Calmodulin in Abhängigkeit der BED auch für SLP-65 des Huhns existiert.

Die Interaktion von SLP-65 und Calmodulin setzt eine gewisse  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration voraus, die in ruhenden Zellen nicht gegeben ist, wie oben gezeigt (vgl. Abb. 6.6). Dies lässt vermuten, dass die initiale Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$  nach BCR-Stimulation nicht von der Interaktion abhängt, sondern diese erst danach stattfindet. Somit wurden die gerade beschriebenen Zellen auf Ihre Kompetenz nach BCR-Stimulation  $\text{Ca}^{2+}$  zu mobilisieren untersucht.

Zellen, die SLP-65  $\Delta$ 20 oder  $\Delta$ 27 exprimierten, zeigten ein noch sehr deutliches  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal nach BCR-Stimulation (Abb. 6.12 B, türkis und orange), welches aber unterhalb des wildtypischen Signals lag (rot). Fehlten die ersten 31 Aminosäuren von SLP-65, war das Signal nochmal reduziert (violett) und im Falle der Variante, bei der 45 Aminosäuren deletiert sind, war kein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal zu erkennen (blau). Dennoch war bei allen Deletionsvarianten keine Interaktion von SLP-65 mit Calmodulin nachweisbar (Abb. 6.12 A). Somit ist anzunehmen, dass diese Interaktion von Calmodulin und SLP-65 keinen oder nur einen geringen Effekt auf den stimulationsabhängigen Konzentrationsanstieg von  $\text{Ca}^{2+}$  in B-Zellen hat.



**Abb. 6.12: Ein Verlust der Calmodulinbindung schließt eine moderate Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung nicht aus.**

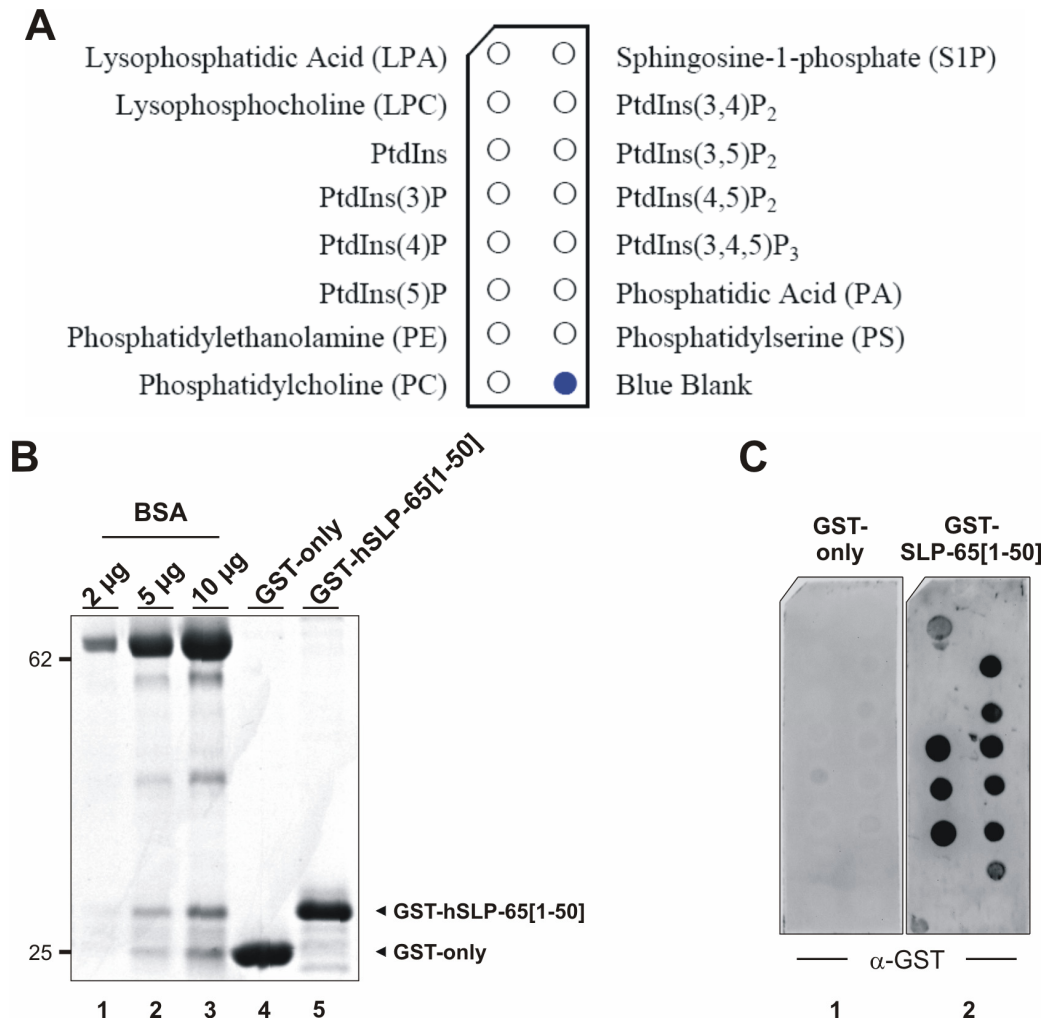
**A**, SLP-65-defiziente DT40 Zellen (*slp-65<sup>-/-</sup>*, Spuren 1 und 2) wurden mit C-terminal Citrin markiertem, wildtypischen SLP-65 (SLP-65 wt, Spuren 3 und 4), oder SLP-65, welchem die ersten 20 (SLP-65 Δ20, Spuren 5 und 6), 27 (SLP-65 Δ27, Spuren 7 und 8) oder 45 Aminosäuren (SLP-65 Δ45, Spuren 9 und 10) fehlen, rekonstituiert.  $3 \times 10^7$  Zellen wurden mit Lysepuffer mit Ca<sup>2+</sup> (+) oder Lysepuffer mit EGTA (-) lysiert. Die Lysate wurden dann einer Affinitätspräzipitation (AP; oben) mit an Agarose gekoppeltem Calmodulin unterzogen und die erhaltenen Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Westernblotting mit Antikörpern gegen GFP analysiert (oben). Proben der hergestellten Lysate wurden ebenfalls durch Auftrennung der Proteine im Gel und anschließendem Westernblotting mit Antikörpern gegen GFP (Mitte) oder Aktin (unten) analysiert. **B**, In A beschriebene Zellen wurden mit dem Farbstoff Indo-1 beladen und die Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung nach Stimulation mit 1,5 μg/mL M4 am LSR bestimmt. Der Farbcode ist der Legende zu entnehmen.

### 6.1.8 Die BED von SLP-65 vermittelt dessen Bindung mit Phosphoinositolphosphaten *in vitro*

Der Calciumsensor Calmodulin reguliert eine Vielzahl von Proteinen. Eine wichtige Funktion ist die Aktivierung von Enzymen durch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Bindung innerhalb oder nahe autoinhibitorischer Domänen, was zu einer strukturellen Freigabe der Enzymtasche führt und diese somit für das Substrat zugänglich macht (Klee *et al.* 1998; Hook und Means 2001; Shohat *et al.* 2002). Da SLP-65 als Adapterprotein keine enzymatische Aktivität besitzt, ist eine weitere Funktion von Calmodulin in diesem Zusammenhang viel interessanter. Calmodulinbindestellen gehen oft einher mit Phosphatidylinositolphosphat (PIP)-bindenden Domänen.

PIP sind Bestandteile der Plasmamembran oder anderer Lipidmembranen der Zellorganellen. Die negativ geladenen Phosphatgruppen können mit basischen, meist lysinreichen Regionen in Proteinen interagieren und so eine Membranassoziation des Proteins oder auch einer Proteindomäne vermitteln. Tatsächlich sind einige Proteine beschrieben, die nahe oder genau in der PIP-bindenden Domäne ebenfalls eine Calmodulinbindedomäne aufweisen (Quetglas *et al.* 2000; McLaughlin *et al.* 2005; Dong *et al.* 2007; Kwon *et al.* 2007). Ein Beispiel bildet myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS), welches einen Myristinanker am N-Terminus aufweist, der allein nicht für eine feste Membranassoziation ausreicht. In Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin bindet zusätzlich eine basische Region im Protein an  $\text{PI-(4,5)-P}_2$  und stabilisiert das Protein an der Membran. Ein Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration hat zur Folge, dass  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin in dieser Region binden kann und damit nicht nur diese Region, sondern das ganze Protein von der Membran löst und somit dessen Lokalisation reguliert (Kim *et al.* 1994; Swierczynski und Blackshear 1995). Dieser Mechanismus der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin regulierten Membranassoziation wird auch für andere Proteine diskutiert (McLaughlin *et al.* 2005). Tatsächlich ist auch innerhalb der BED von SLP-65 eine hohe Anzahl Lysinreste zu finden. Der isoelektrische Punkt in diesem Bereich liegt bei  $\text{pI}=10,87$ . Weiterhin wurde schon von Köhler *et al.* 2005 beschrieben, dass es sich bei dem N-Terminus von SLP-65 um einen Plasmamembrananker handle (Köhler *et al.* 2005).

Zunächst wurde die Fähigkeit der SLP-65-BED PIP zu binden *in vitro* untersucht. Dazu wurden sogenannte PIP-strips™ mit dem schon beschriebenen Fusionsprotein GST-SLP-65[1-50] inkubiert. PIP-strips™ sind Nitrocellulosemembranen, welche mit Lipiden bestückt sind und mit dem zu untersuchenden Protein oder der Proteindomäne inkubiert werden (Abb. 6.13 A). Nur bei einer Interaktion mit den Lipiden kann das jeweilige Protein an der entsprechenden Stelle mit Antikörpern nachgewiesen werden.

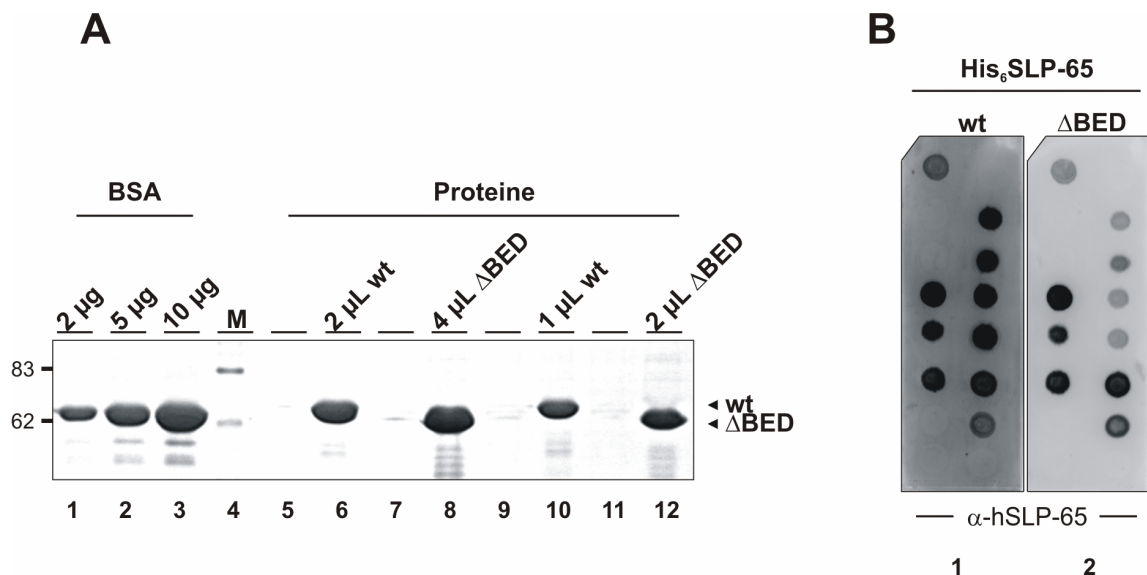


**Abb. 6.13: Die BED von SLP-65 bindet unterschiedliche Phospholipide *in vitro*.** **A**, Schema der Anordnung unterschiedlicher Lipide auf PIP-strips™ (Echelon). **B**, GST-only oder GST-hSLP-65[1-50] wurden in BL-21 DE3 *E.coli* exprimiert. Bakterien aus 0,5 g Nasspellet wurden lysiert und die Proteine aus den geklärten Lysaten durch Kopplung an eine Glutathion-Sepharose-Matrix isoliert. Die Elution von der Matrix erfolgte dann mittels reduziertem Glutathion. Zur Quantifizierung wurden die Proteine aus 10 µL Eluat durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit CBB anfärbt (Spuren 4 und 5). Als Standard dienten definierte Mengen an BSA (Spuren 1 bis 3). Die relativen Größen von Markerproteinen sind links in kDa angegeben. **C**, PIP-strips™ wurden mit 1 µg/mL GST-only (PIP-strip™ 1) oder GST-SLP-65[1-50] (PIP-strip™ 2) in TBS-T inkubiert und gebundene Proteine mit Antikörpern gegen GST sichtbar gemacht.

Tatsächlich konnte das Fusionsprotein GST-SLP-65[1-50] mit Antikörpern gegen GST nachgewiesen werden (C, PIP-strip™ 2). Eine Bindung war zu detektieren im Falle der Phosphatidylinositol-mono-, bis- und trisphosphate. Im Falle von LPA, PA und PS muss an dieser Stelle bemerkt werden, dass je nach Charge der PIP-strips™ unterschiedliche Ergebnisse erhalten wurden und daher die hier sichtbare Detektion nicht als reproduzierbare Interaktion gewertet werden kann. Sie bleibt in der Beurteilung außen vor.

Das Kontrollprotein GST-only konnte nicht detektiert werden (PIP-strip™ 1). Beide Proteine wurden in gleichen Mengen eingesetzt (B). Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit der von mir betreuten Diplomandin Insa Weigel durchgeführt.

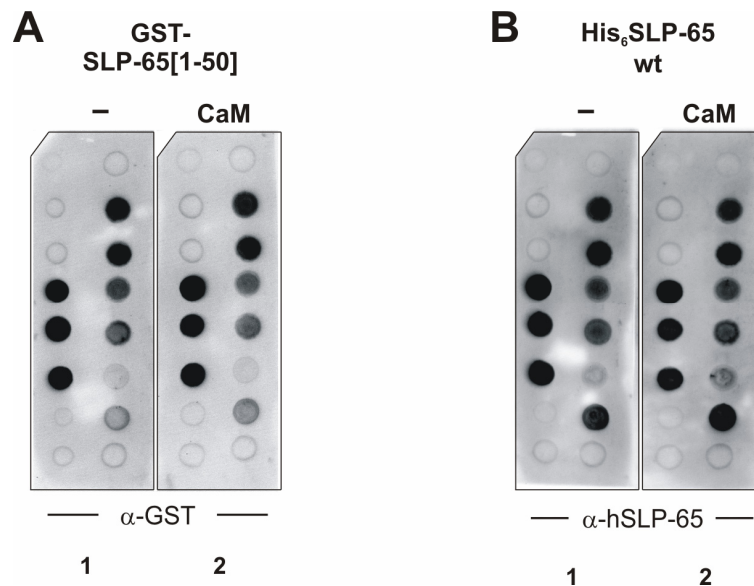
Darüber hinaus konnte ich zeigen, dass auch das komplette SLP-65-Protein an PIP *in vitro* bindet (Abb. 6.14 B, PIP-strip™ 1). Dazu erfolgte die Inkubation der PIP-strips™ mit den schon beschriebenen His<sub>6</sub>SLP-65-Varianten und die Detektion der Proteine mit Antikörpern gegen humanes SLP-65. Abbildung 6.14 A zeigt die für die Proteinbäder eingesetzten Mengen an Eluat. Bei His<sub>6</sub>-SLP-65  $\Delta$ BED war die Bindung aller drei Phosphatidylinositol-bisphosphate und Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphats deutlich reduziert (B, PIP-strip™ 2) verglichen mit dem wildtypischen Protein (PIP-strip™ 1), obwohl sogar eine größere Menge an His<sub>6</sub>SLP-65  $\Delta$ BED eingesetzt wurde (A, Spuren 8 und 12).



**Abb. 6.14: Deletion der BED resultiert in einer reduzierten Interaktion von SLP-65 mit PI(3,4)P<sub>2</sub>, PI(3,5)P<sub>2</sub>, PI(4,5)P<sub>2</sub> und PI(3,4,5)P<sub>3</sub> *in vitro*.** **A**, His<sub>6</sub>-SLP-65 wt oder His<sub>6</sub>-SLP-65  $\Delta$ BED wurden in BL-21 DE3 *E.coli* exprimiert. Bakterien aus 0,5 g Nasspellet wurden lysiert und die Proteine aus den geklärten Lysaten durch Kopplung an eine Protino® Ni-IDA-Matrix isoliert. Die Elution von der Matrix erfolgte mittels Imidazol. Zur Quantifizierung wurden die Proteine aus den angegebenen Volumina Eluat durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit CBB angefärbt (Spuren 6, 8, 10 und 12). Als Standard dienten definierte Mengen an BSA (Spuren 1 bis 3). Die relativen Molekulargewichte von Markerproteinen sind links in kDa angegeben. **B**. PIP strips™ wurden mit 1 µg/mL His<sub>6</sub>SLP-65 wt (PIP-strip™ 1) oder His<sub>6</sub>SLP-65  $\Delta$ BED (PIP-strip™ 2) in TBS-T inkubiert und gebundene Proteine mit Antikörpern gegen humanes SLP-65 sichtbar gemacht.

Diese Ergebnisse zeigen eine Interaktion von SLP-65 mit unterschiedlichen Lipiden *in vitro*, wobei die Interaktion mit PI(3,4)P<sub>2</sub>, PI(3,5)P<sub>2</sub>, PI(4,5)P<sub>2</sub> und PI(3,4,5)P<sub>3</sub> von der BED abhängt.

Wie schon erwähnt, kann Calmodulin die Interaktion einiger Proteine mit PIP regulieren, indem es selber nahe oder sogar in der PIP-bindenden Region bindet. Eine mögliche Beeinflussung der hier beschriebenen *in vitro* PIP-Interaktion mit SLP-65 durch  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin habe ich für beide Ansätze, d.h. nur mit der BED oder mit dem kompletten Protein, untersucht. Dazu wurden PIP-strips™ mit Protein in An- und Abwesenheit von Calmodulin untersucht. Alle Puffer und Inkubationslösungen enthielten 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Sowohl im Falle des GST-SLP-65[1-50] (Abb. 6.15 A) als auch des kompletten SLP-65-Proteins (His<sub>6</sub>-SLP-65 wt, B) konnte kein Unterschied festgestellt werden zwischen der Anwesenheit (jeweils PIP-strip™ 2) oder der Abwesenheit (jeweils PIP-strip™ 1) von Calmodulin. Somit scheint *in vitro* Calmodulin nicht mit einer PIP-Interaktion der BED konkurrieren zu können.

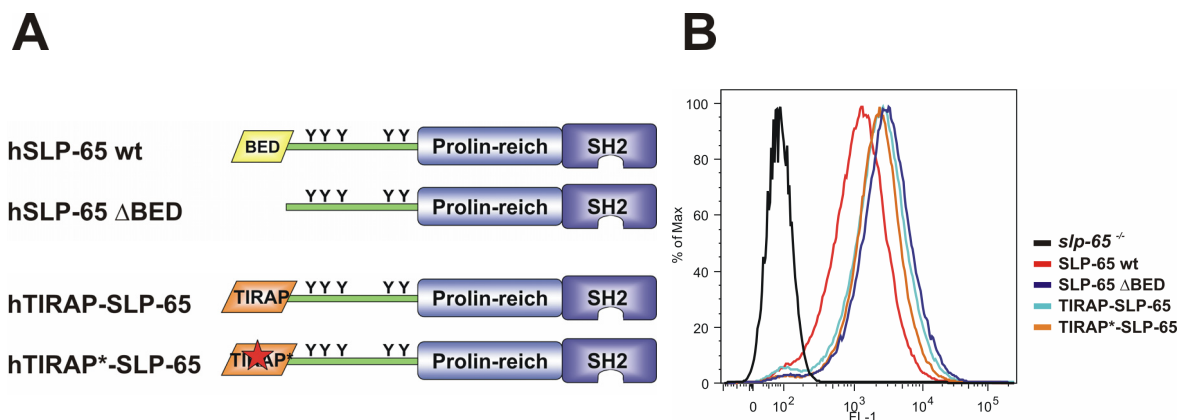


**Abb. 6.15: Calmodulin hat keinen Einfluss auf die *in vitro* Interaktion der rekombinanten Proteine mit Lipiden auf PIP-strips™.** **A**, PIP-strips™ wurden mit 0,5 µg/mL GST-SLP-65[1-50] allein (-, PIP-strip™ 1) oder zusammen mit 4 µg/mL Calmodulin (CaM, PIP-strip™ 2) in TBS-T mit 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  inkubiert und gebundene Proteine mit Antikörpern gegen GST sichtbar gemacht. **B**, PIP strips™ wurden mit 0,5 µg/mL His<sub>6</sub>-SLP-65 wt allein (-, PIP-strip™ 1) oder zusammen mit 4 µg/mL Calmodulin (CaM, PIP-strip™ 2) in TBS-T mit 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  inkubiert. Gebundene Proteine wurden mit Antikörpern gegen humanes SLP-65 sichtbar gemacht.



### 6.1.9 Die Substitution der BED von SLP-65 durch das PIP-Bindemotiv von TIRAP resultiert in einem signalkompetenten Protein.

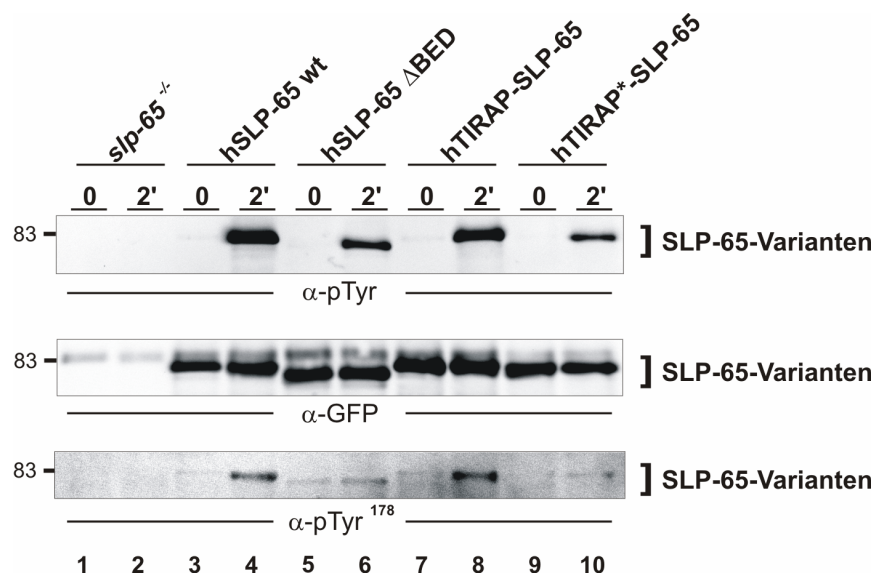
*In vitro* konnte ich die Interaktion von SLP-65 mit PIPs zeigen. Um eine funktionelle Relevanz dieser PIP-Bindungskompetenz *in vivo* zu untersuchen, stellte ich DT40 Zellen her, welche eine Chimäre hTIRAP-SLP-65 exprimieren. Bei dieser Chimäre ist die BED von SLP-65 durch ein bekanntes PIP-Bindemotiv, nämlich jenes des Adapterproteins TIRAP (*TIR domain containing adaptor protein*) (Kagan und Medzhitov 2006), ersetzt. Kagan und Medzhitov konnten die PIP-Bindeeigenschaft von TIRAP auf 4 Lysine zurückführen. Durch zielgerichtete Mutagenesen an den für diese Lysine codierenden Nukleotidtriplets habe ich eine Variante der Chimäre mit dieser fehlenden PIP-Bindeeigenschaft im TIRAP-N-Terminus hergestellt (hTIRAP\*-SLP-65). Als Kontrollen dienten wildtypisches SLP-65 (hSLP-65 wt) und die N-terminal deletierte Variante hSLP-65  $\Delta$ BED. Alle Expressionsprodukte waren mit einem N-terminal gelegenen Citrin-tag ausgestattet und sind in Abbildung 6.16 A zusammengefasst. Alle Varianten werden ähnlich stark exprimiert (Abb. 6.16 B).



**Abb. 6.16:** Die Expression der SLP-65-Varianten in den hergestellten DT40 B-Zelllinien ist vergleichbar. **A**, Schematische Darstellung der Proteine, welche in den hergestellten DT40 Zelllinien exprimiert werden. **B**, SLP-65-defiziente DT40 Zellen (*slp-65*<sup>-/-</sup>, schwarz) wurden retroviral mit cDNA codierend für das wildtypische SLP-65 (hSLP-65 wt, rot), SLP-65, welchem die ersten 48 Aminosäuren fehlen (hSLP-65  $\Delta$ BED, blau), die Chimäre aus PIP-Bindemotiv von TIRAP und SLP-65 (hTIRAP-SLP-65, türkis) und die Chimäre, in welcher die PIP-Bindedomäne von TIRAP inaktiviert wurde (hTIRAP\*-SLP-65, orange), transduziert und die Expression der Proteine über den N-terminal gelegenen Citrin-tag durchflusszytometrisch analysiert.

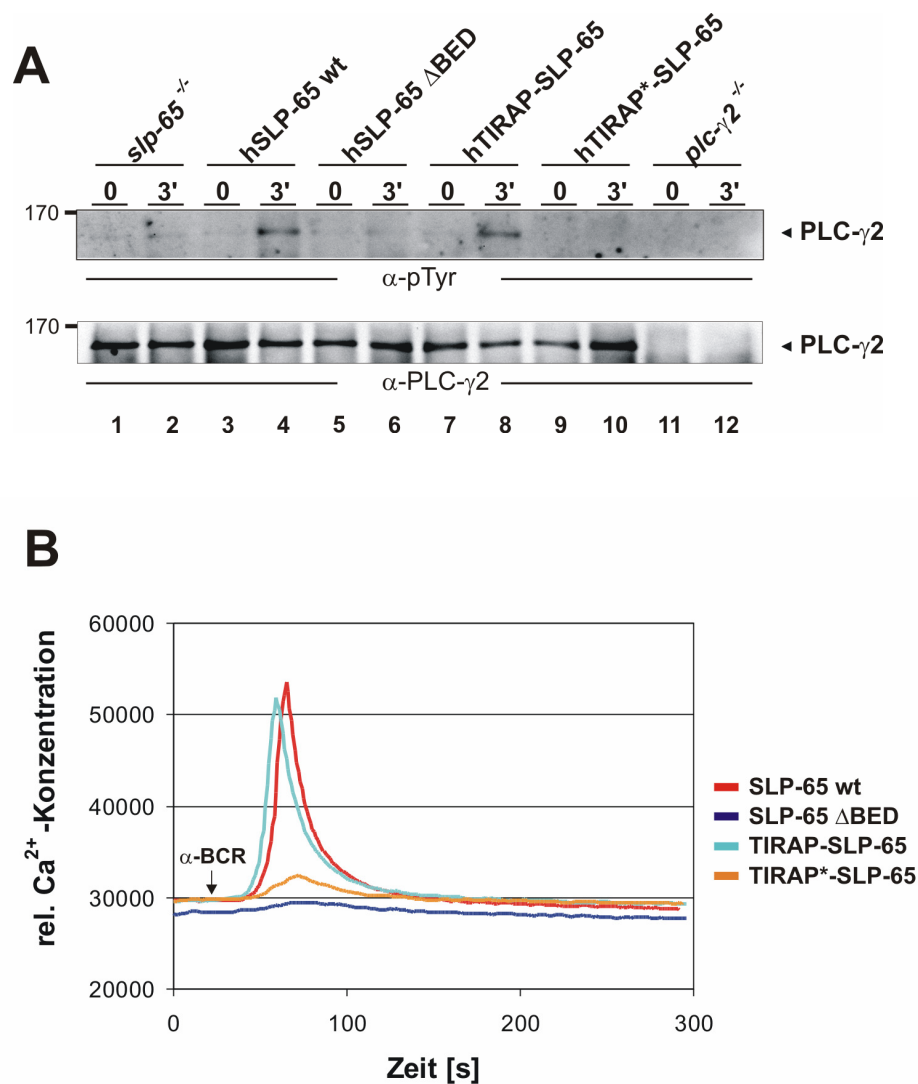
Die hergestellten Zellen wurden zunächst auf die stimulationsinduzierte Phosphorylierung der SLP-65-Varianten hin untersucht. Wildtypisches SLP-65 wurde nach BCR-Stimulation phosphoryliert (Abb. 6.17, oben, Spur 4). Diese Phosphorylierung war deutlich reduziert,

fehlte die N-terminale BED von SLP-65 (Spur 6). Im Falle der Chimäre hTIRAP-SLP-65 war die Phosphorylierung des Proteins vergleichbar mit der des wildtypischen SLP-65 (Spur 8). Dagegen wies die Chimäre mit der inaktivierten PIP-Bindedomäne ein Phosphorylierungsniveau auf, welches dem der Deletionsvariante hSLP-65  $\Delta$ BED (Spur 10) entsprach. Neben der Gesamtphosphorylierung der SLP-65-Varianten wurde mit Hilfe spezifischer Antikörper die Phosphorylierung des Tyrosins in Position 178 untersucht (unten), welches in phosphoryliertem Zustand eine PLC- $\gamma$ 2-Bindestelle darstellt (Chiu *et al.* 2002). Nur das wildtypische SLP-65 und die intakte Chimäre hTIRAP-SLP-65 zeigten nach Stimulation eine deutliche Phosphorylierung in dieser Position (Spuren 4 und 8).



**Abb. 6.17:** Das Phosphorylierungsniveau von intaktem hTIRAP-SLP-65 ist vergleichbar mit dem des wildtypischen SLP-65-Proteins.  $2 \times 10^7$  der in Abb. 6.16 beschriebenen Zellen wurden unstimuliert belassen (0) oder mit  $2 \mu\text{g/mL}$  M4 für 2 min bei  $37^\circ\text{C}$  stimuliert (2') und lysiert. Die Citrin-markierten Proteine wurden mit Antikörpern gegen GFP aus den geklärten Lysaten immunpräzipitiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Westernblotting mit Antikörpern gegen p-Tyr (oben), GFP (Mitte) und den phosphorylierten Aminosäurerest Tyr<sup>178</sup> (unten) analysiert.

Weiterhin wurde die Aktivierung der PLC- $\gamma$ 2 nach BCR-Stimulation anhand ihrer Phosphorylierung in den hergestellten Zellen analysiert. Zellen, welche SLP-65  $\Delta$ BED exprimieren, zeigten keine Phosphorylierung von PLC- $\gamma$ 2 (Abb. 6.18 A, Spur 6), wohingegen die Expression der Chimäre hTIRAP-SLP-65 (Spuren 7 und 8) eine wildtypische PLC- $\gamma$ 2-Phosphorylierung (Spur 4) nach Stimulation ermöglichte, jedoch nicht bei inaktivierter PIP-Bindedomäne (Spur 10).



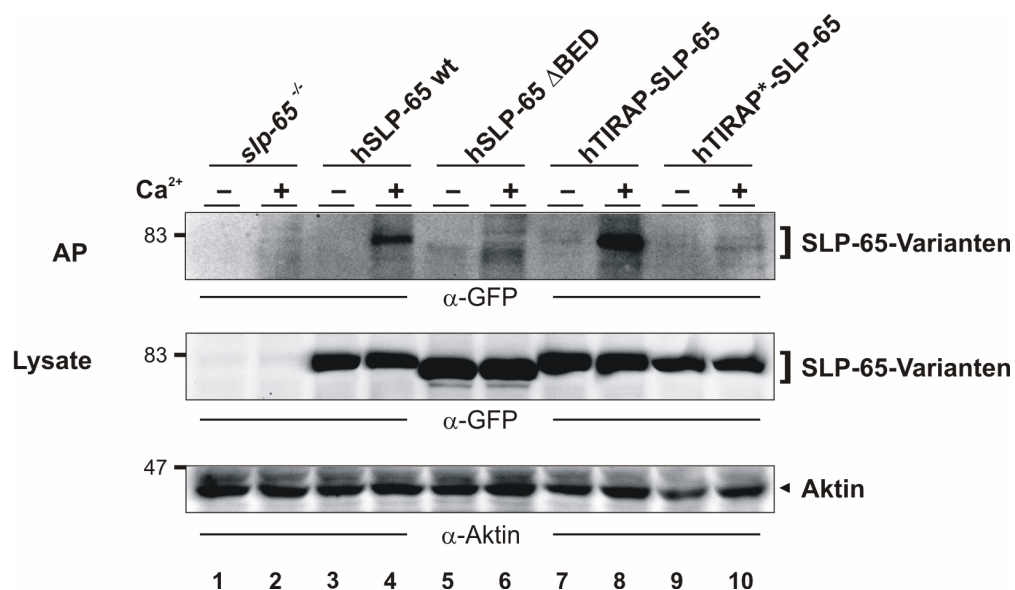
**Abb. 6.18:** Das intakte PIP-Bindemotiv von TIRAP kann die Signalkompetenz von N-terminal deletiertem SLP-65 wieder herstellen. **A**,  $3 \times 10^7$  PLC- $\gamma$ 2-defiziente DT40 Zellen (Spur 11 und 12) oder in Abb. 6.16 beschriebene Zellen (Spuren 1 bis 10) wurden unstimuliert belassen (0) oder für 3 min mit 2  $\mu$ g/mL M4 stimuliert (3') und anschließend lysiert. Die geklärten Lysate wurden einer Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen PLC- $\gamma$ 2 unterzogen und erhaltene Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Westenblotting mit Antikörpern gegen pTyr (oben) oder PLC- $\gamma$ 2 (unten) sichtbar gemacht. Die relativen Größen von Markerproteinen sind links in kDa angegeben. **B**, Die in Abb. 6.16 beschriebenen Zellen wurden mit dem Farbstoff Indo-1 beladen und die Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung nach BCR-Stimulation mittels 1,5  $\mu$ g/mL M4 von Citrin-positiven Zellen am LSR ermittelt.

Zusätzlich wurde die Kompetenz der Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung untersucht. Zellen, welche SLP-65 ΔBED exprimieren, zeigten keine Ca<sup>2+</sup>-Antwort nach Stimulation (Abb. 6.18 B, blau). Die Expression der intakten Chimäre hTIRAP-SLP-65 (türkis) ermöglichte eine wildtypische Ca<sup>2+</sup>-Antwort (rot), während die inaktivierte Chimäre hTIRAP<sup>\*</sup>-SLP-65 (orange) wiederum keine Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung vermitteln konnte.

Zusammenfassend bestätigen die hier gezeigten Experimente noch einmal die funktionelle Relevanz der BED für die BCR-Signalleitung. Das intakte, nicht aber das

inaktivierte, PIP-Bindemotiv von TIRAP kann die BED funktionell ersetzen. Zusätzlich zu den mit Hilfe der PIP-strips™ *in vitro* erzielten Daten, spricht dies für eine PIP-Interaktion der BED auch *in vivo*.

Da, wie oben schon erwähnt, PIP-Bindemotive oft auch mit Calmodulinbindestellen einhergehen, wurden auch die Chimären auf ihre Eigenschaft, Calmodulin in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  zu binden, hin untersucht. Dazu wurden Zellen der hergestellten Linien mit Lysepuffer mit  $\text{Ca}^{2+}$  oder Lysepuffer mit EGTA lysiert und die geklärten Lysate einer Affinitätspräzipitation mit Calmodulin-Agarose unterzogen. Es konnte neben dem wildtypischen SLP-65 (Abb. 6.19, Spur 4) auch die Chimäre hTIRAP-SLP-65 (Spur 8) isoliert werden. Im Falle der Chimäre mit inaktivierter PIP-Bindedomäne war keine Präzipitation möglich (Spur 10). Da auch diese Eigenschaft der BED durch das PIP-Bindemotiv von TIRAP ersetzt werden kann, liefert dies einen weiteren Hinweis, dass es sich hier um zwei verwandte Motive handelt.



**Abb. 6.19:** Die Chimäre hTIRAP-SLP-65 kann ebenfalls mit Calmodulin-Agarose aus Lysaten isoliert werden.  $3 \times 10^7$  der in Abb. 6.16 beschriebenen Zellen wurden mit Lysepuffer mit  $\text{Ca}^{2+}$  (+) oder Lysepuffer mit EGTA (-) lysiert. Die geklärten Lysate wurden dann einer Affinitätspräzipitation mit an Agarose gekoppeltem Calmodulin unterzogen und die erhaltenen Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Westernblotting mit Antikörpern gegen GFP analysiert (oben). Proben der hergestellten Lysate wurden ebenfalls durch Auftrennung der Proteine im Gel und anschließendem Westernblotting mit Antikörpern gegen GFP (Mitte) oder Aktin (unten) analysiert.

Insgesamt zeigen die hier vorgestellten Ergebnisse, dass die BED von SLP-65 und das PIP-Bindemotiv von TIRAP molekulare Eigenschaften teilen, die die funktionelle Substitution dieser Domänen zulässt. Dies und die zuvor gezeigten *in vitro*-Studien legen nahe, dass es sich im Falle der BED ebenfalls um eine PIP-Interaktionsdomäne handelt.

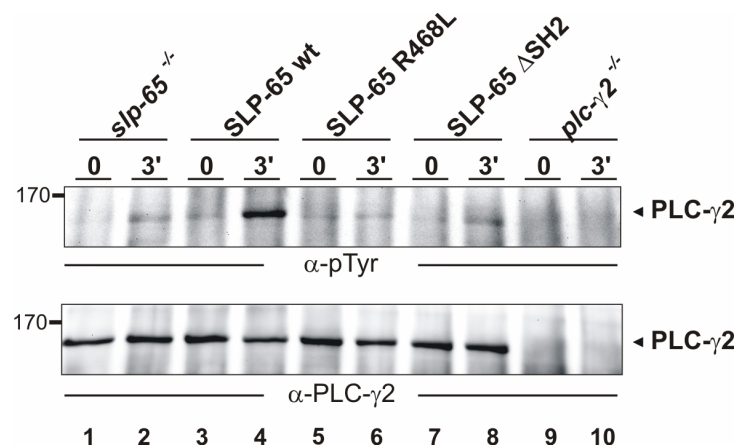
## **6.2 Kooperation der N-terminalen BED und der C-terminalen SH2-Domäne von SLP-65**

### **6.2.1 Für die Signalkompetenz von SLP-65 ist eine funktionelle SH2-Domäne essentiell.**

SLP-65 ist das zentrale Adapterprotein in B-Zellen, welches für die Rekrutierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes an die Plasmamembran verantwortlich ist. Die Mechanismen dieser Rekrutierung sind nur teilweise verstanden. Wie bereits beschrieben spielt der N-Terminus von SLP-65 eine zentrale Rolle für die Membranlokalisation und Funktion dieses Proteins. Eine weitere Komponente, nämlich die C-terminal gelegene SH2-Domäne von SLP-65, ist ebenfalls entscheidend. Die Interaktion der SLP-65-SH2-Domäne mit Ig- $\alpha$  über dessen phosphorylierten Tyrosinrest 204 (für Ig- $\alpha$  der Spezies Maus) ist beschrieben (Engels *et al.* 2001; Kabak *et al.* 2002).

DT40 Zellen, welche wildtypisches SLP-65 (SLP-65 wt), in der Funktion der SH2-Domäne inaktiviertes SLP-65 (SLP-65 R468L) oder eine SH2-Domänen-deletierte Form von SLP-65 (SLP-65  $\Delta$ SH2) exprimieren, wurden von Dr. Annika Grabbe und Dr. Kai Dittmann hergestellt. Die nach BCR-Stimulation erfolgende Phosphorylierung von SLP-65 ist deutlich reduziert in Zellen, welche keine funktionelle SH2-Domäne mehr besitzen (Grabbe 2005; Abudula *et al.* 2007). Darüber hinaus konnte ich zeigen, dass auch die stimulationsabhängige Phosphorylierung von PLC- $\gamma$ 2 in Zellen, welche SLP-65 mit einer inaktiven SH2-Domäne (SLP-65 R468L, Abb. 6.20, Spuren 5 und 6) oder ohne SH2-Domäne (SLP-65  $\Delta$ SH2, Spuren 7 und 8) exprimieren, nicht mehr erfolgt.

Die stimulationsabhängige Rekrutierung von SLP-65 an die Plasmamembran findet in Zellen, welche SLP-65 mit nicht-funktionaler oder deletierter SH2-Domäne exprimieren, nicht statt (Abudula *et al.* 2007; Goldbeck 2007).



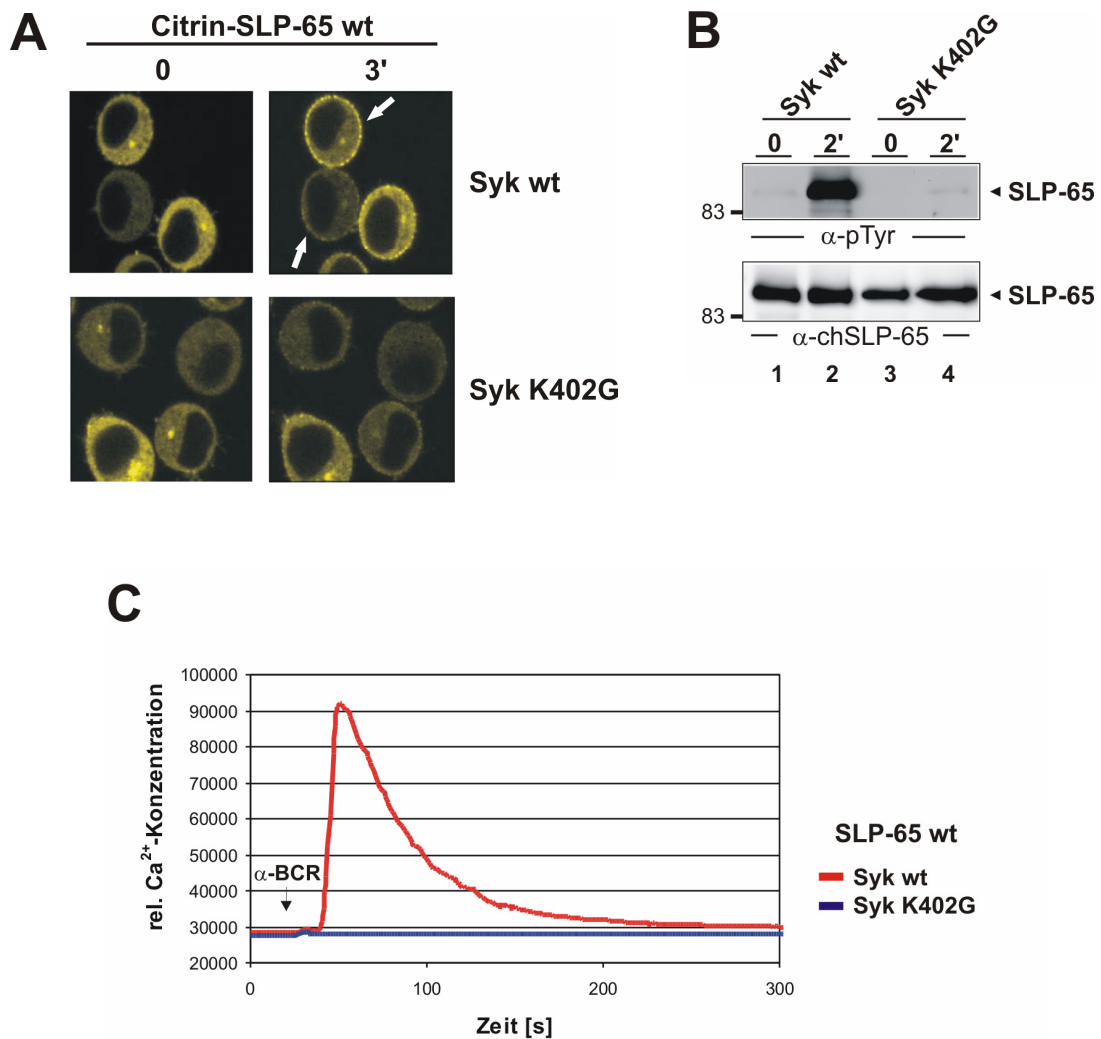
**Abb. 6.20:** Ist die SH2-Domäne von SLP-65 inaktiv oder nicht mehr vorhanden, kann PLC- $\gamma$ 2 nach BCR-Stimulation nicht mehr phosphoryliert werden. SLP-65-defiziente DT40 Zellen (Spuren 1 und 2) wurden mit wildtypischem (SLP-65 wt, Spuren 3 und 4), in der SH2-Domäne inaktiviertem (SLP-65 R468L, Spuren 5 und 6) oder C-terminal deletiertem (SLP-65  $\Delta$ SH2, Spuren 7 und 8) SLP-65 rekonstituiert. Als Kontrolle dienten PLC- $\gamma$ 2-defiziente DT40 Zellen. Zellysate aus  $3 \times 10^7$  unstimulierten (0) oder mit  $2 \mu\text{g/mL}$  M4 für 3 min bei  $37^\circ\text{C}$  stimulierten (3') Zellen wurden einer Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen PLC- $\gamma$ 2 unterzogen, erhaltene Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Westernblotting mit Antikörpern gegen pTyr (oben) oder PLC- $\gamma$ 2 (unten) sichtbar gemacht. Die relativen Molekulargewichte von Markerproteinen sind links in kDa angegeben.

Src-Kinasen, vornehmlich Lyn, stellen die Phosphorylierung von Ig- $\alpha$  und Ig- $\beta$  als eines der ersten Ereignisse nach BCR-Stimulation sicher (Sefton und Campbell 1991; Yamanashi *et al.* 1991; Takata *et al.* 1994). Dies führt dann zur Rekrutierung und Aktivierung von Syk. Diese Kinase ist für die Phosphorylierung von SLP-65 verantwortlich, jedoch konnte Dr. Ingo Goldbeck zeigen, dass für die Membranrekrutierung von SLP-65 nach BCR-Stimulation eine Phosphorylierung des Proteins selbst nicht nötig ist (Fu *et al.* 1998; Goldbeck 2007). Um festzustellen, ob Lyn alleine eine Membranrekrutierung von SLP-65 durch Substratphosphorylierung vermitteln kann oder ob Syk bzw. weitere, in der Signalleitung folgende Kinasen eine Rolle spielen, habe ich Syk und SLP-65 doppelt-defiziente DT40 Zellen mit Citrin-markiertem SLP-65 und einer in der Kinasedomäne inaktivierten Syk-Variante, Syk K402G (Wang *et al.* 2005), ausgestattet.

In Zellen, welche SLP-65 zusammen mit wildtypischer Syk exprimieren, erfolgte die Rekrutierung von SLP-65 an die Plasmamembran nach Stimulation (Abb. 6.21 A, oben rechts). Es kam zur Ausbildung punktueller Strukturen (Pfeile). Wurde die in der Kinasedomäne inaktivierte Variante von Syk (Syk K402G, unten) exprimiert, so wurde SLP-65 nach Stimulation kaum rekrutiert (unten rechts).

Da SLP-65 vornehmlich durch Syk phosphoryliert wird, wurde die Phosphorylierung in den hergestellten Zellen untersucht (Fu *et al.* 1998). Nach BCR-Stimulation wurde SLP-65 in Zellen mit wildtypischer Syk phosphoryliert (Abb. 6.21 B, Spur 2), wohingegen diese

Phosphorylierung unterblieb, wenn Kinase-inaktive Syk exprimiert wird (Spur 4). Diese Kontrolle zeigt, dass die Kinasefunktion durch diesen Aminosäureaustausch tatsächlich inaktiviert wurde. Wird SLP-65 nicht phosphoryliert und ist somit die Bildung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes nicht möglich, wird kein  $\text{Ca}^{2+}$  freigesetzt. Dies wird bestätigt durch Abbildung 6.21 C.



**Abb. 6.21: Stimationsinduzierte SLP-65-Membranrekrutierung und -Phosphorylierung, sowie die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierungskompetenz sind nicht gegeben in DT40 Zellen, welche eine Kinase-inaktive Form von Syk exprimieren.** **A**, SLP-65- und Syk-doppeltdefiziente DT40 B-Zellen wurden mit Citrin-markiertem wildtypischen SLP-65 und entweder wildtypischer Syk (Syk wt) oder bezüglich der Kinasefunktion inaktivierte Syk (Syk K402G) kotransfiziert. Die Lokalisation von SLP-65 vor (0, links) und nach dreiminütiger Stimulation mit 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  M4 (3', rechts) wurde am Konfokalmikroskop durch Dr. Michael Engelke untersucht. **B**,  $2 \times 10^7$  der in A beschriebenen Zellen wurden unstimuliert belassen (0) oder für 2 min mit 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  M4 stimuliert (2') und lysiert. Die Lysate wurden einer Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen GFP unterzogen und die erhaltenen Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Analyse erfolgte mittels Westernblotting mit Antikörpern gegen pTyr (oben) oder Huhn SLP-65 (unten). Die relativen Molekulargewichte von Markerproteinen sind links in kDa angegeben. **C**,  $1 \times 10^6$  in A beschriebene Zellen wurden mit dem Farbstoff Indo-1 beladen und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung nach BCR-Stimulation mit 1,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  M4 am LSR ermittelt.

Somit ist Lyn als aktive Kinase für die stimulationsinduzierte Translokation von SLP-65 an die Plasmamembran nicht ausreichend, sondern die Aktivität von Syk und/oder weiteren in der Signalleitung folgenden Kinasen ist notwendig.

Die N-terminale BED von SLP-65 und die C-terminale SH2-Domäne sind essentiell für die Membranrekrutierung und Funktion von SLP-65. Dabei ist keine der beiden Domänen so prominent, dass sie den Verlust der anderen überwinden könnte. Die nähere Charakterisierung der Kooperation beider Domänen sei im Folgenden betrachtet.

### **6.2.2 Die essentiellen Domänen für die Membranrekrutierung von SLP-65, BED und SH2-Domäne, kooperieren *in cis*.**

Zellen, welche eine SLP-65-Variante ohne N-terminale BED oder ohne C-terminale SH2-Domäne exprimieren, zeigen keine intakte Signalleitung nach Stimulation des BCR. Sowohl die Membranrekrutierung und Phosphorylierung des Proteins selber, als auch die Phosphorylierung von PLC- $\gamma$ 2 und damit einhergehend die Kompetenz der Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung, sind eingeschränkt oder nicht mehr vorhanden. Der Verlust der Funktion von SLP-65 erfolgt also schon, wenn eine der Domänen nicht vorhanden ist. Wie ist es jedoch um die Signalkompetenz bestellt, wenn beide, für sich nicht-funktionale Deletionsvarianten parallel exprimiert werden? Ist es erforderlich, dass beide Domänen auf einem Molekül aktiv sind, also *in cis* kooperieren, oder reicht eine parallele Expression beider Deletionsvarianten aus, was dann als *in trans* Komplementierung bezeichnet werden kann? Diese Fragestellung wurde von mir an Frau Insa Weigel als Teil Ihrer Diplomarbeit weitergegeben und in Zusammenarbeit mit ihr bearbeitet. Die bezüglich der Membranrekrutierung von SLP-65 erhobenen Daten am Konfokalmikroskop wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Michael Engelke und Dr. Ingo Goldbeck generiert.

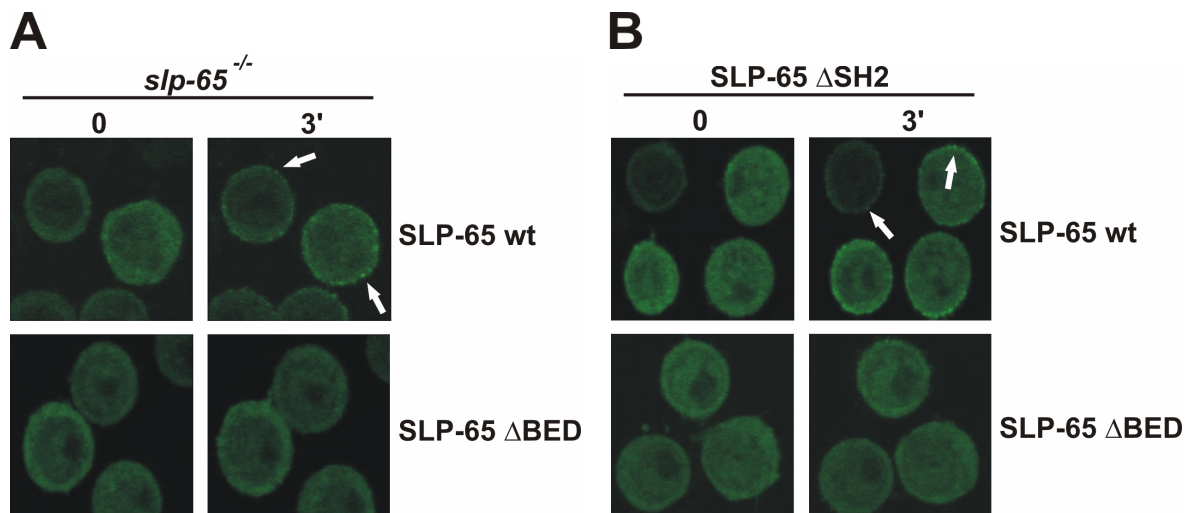
Da auf Zellen zurückgegriffen wurde, welche schon eine SLP-65-Variante der Spezies Huhn exprimierten, wurde für diese Experimente mit cDNA derselben Spezies gearbeitet. Der N-Terminus von SLP-65 des Huhns weist in der Sequenz einen zusätzlichen Bereich von 19 Aminosäuren auf. Die bisherigen Studien zum N-Terminus am humanen Protein in DT40 bezogen sich auf die ersten 48 Aminosäuren (Kapitel 6.1.2-6.1.9). Dazu analog entspricht im SLP-65 des Huhns der Bereich bis Aminosäure 67 (vgl. Abb. 6.22). Dieser wurde hier vollständig deletiert (Pfeil).



Mensch	1-	MDKLNKITVP	ASQKLRQLQK	MVHDIKNNEG	-30
Maus	1-	MDKLNKITVP	ASQKLRQLQK	MVHDIKNNEG	-30
Huhn	1-	MDKLNKLAVP	AGEKFRKLQK	MVHDIKKNES	-30
				↓	
Mensch	31-	GIMNKIKK--	-----	-----LKV	KAPPSVPRR -50
Maus	31-	GIMDKIKK--	-----	-----LKV	KGPPSVPRR -50
Huhn	31-	GIINKFKKFQ	NEQVALICKT	GKDTWDRLLK	KPPPSLPRR -69

**Abb. 6.22: Aminosäuresequenzen des N-Terminus von SLP-65 für Mensch, Maus und Huhn.** hSLP-65  $\Delta$ BED entspricht der Deletionsvariante von humanem SLP-65, bei dem die ersten 48 Aminosäuren fehlen. Das entsprechende Protein des Huhns beinhaltet eine zusätzliche, 19 Aminosäuren umfassende Sequenz, so dass für die analoge Deletionsvariante SLP-65  $\Delta$ BED hier die ersten 67 Aminosäuren fehlen. Der Pfeil zeigt an, an welcher Stelle die Deletion für beide Spezies vorgenommen wurde.

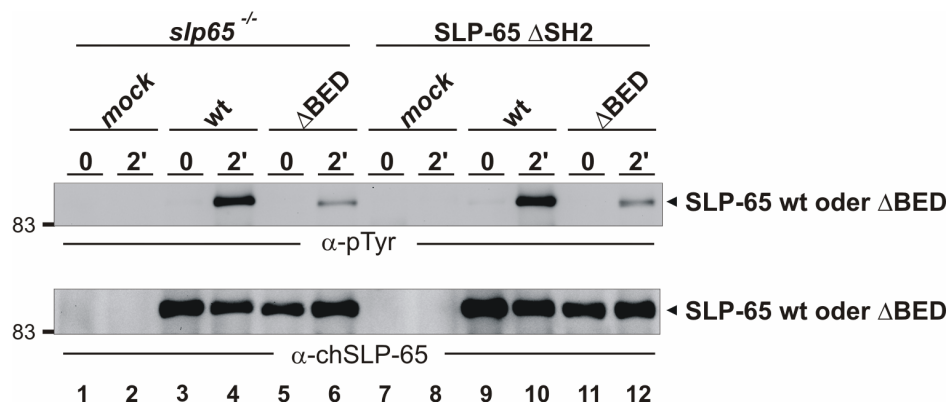
SLP-65-defiziente DT40 Zellen (*slp-65*<sup>-/-</sup>) oder SLP-65  $\Delta$ SH2-exprimierende DT40 Zellen (in Kapitel 6.2.1 beschrieben) wurden retroviral mit Expressionsvektoren für GFP-markiertes wildtypisches SLP-65 (SLP-65 wt) oder SLP-65, bei welchem die ersten 67 Aminosäuren fehlten (SLP-65  $\Delta$ BED), der Spezies Huhn transduziert. Am Konfokalmikroskop wurden die erhaltenen Zelllinien bezüglich der stimulationsabhängigen Rekrutierung der infizierten SLP-65-Varianten an die Plasmamembran untersucht.



**Abb. 6.23: Es erfolgt keine stimulationsinduzierte Membranrekrutierung von SLP-65  $\Delta$ BED, unabhängig von der Koexpression von SLP-65  $\Delta$ SH2.** SLP-65-defiziente DT40 Zellen (*slp-65*<sup>-/-</sup>, A) und DT40 Zellen, welche SLP-65  $\Delta$ SH2 exprimieren (SLP-65  $\Delta$ SH2, B) wurden retroviral mit Expressionsvektoren für GFP-markiertes wildtypisches (SLP-65 wt, A und B oben) oder N-terminal deletiertes (SLP-65  $\Delta$ BED, A und B unten) SLP-65 transduziert. Die Lokalisation der GFP-markierten Proteine vor (0, links) und nach dreiminütiger Stimulation mit 4  $\mu$ g/mL M4 (3', rechts) wurde am Konfokalmikroskop durch Dr. Michael Engelke untersucht.

Wie Abbildung 6.23 A zeigt, erfolgt nach BCR-Stimulation eine Rekrutierung von wildtypischem SLP-65 (SLP-65 wt, Abb. 6.23 A, oben) an die Plasmamembran. Ist die BED in diesem Protein nicht mehr vorhanden, bleibt die Rekrutierung aus (SLP-65  $\Delta$ BED, unten). Wird parallel eine SLP-65-Variante mit fehlender SH2-Domäne exprimiert (Abb. 6.23 B), wird wildtypisches SLP-65 nach wie vor nach Stimulation rekrutiert (SLP-65 wt, oben), aber auch der Verlust der Rekrutierung bei fehlender BED bleibt erhalten (unten).

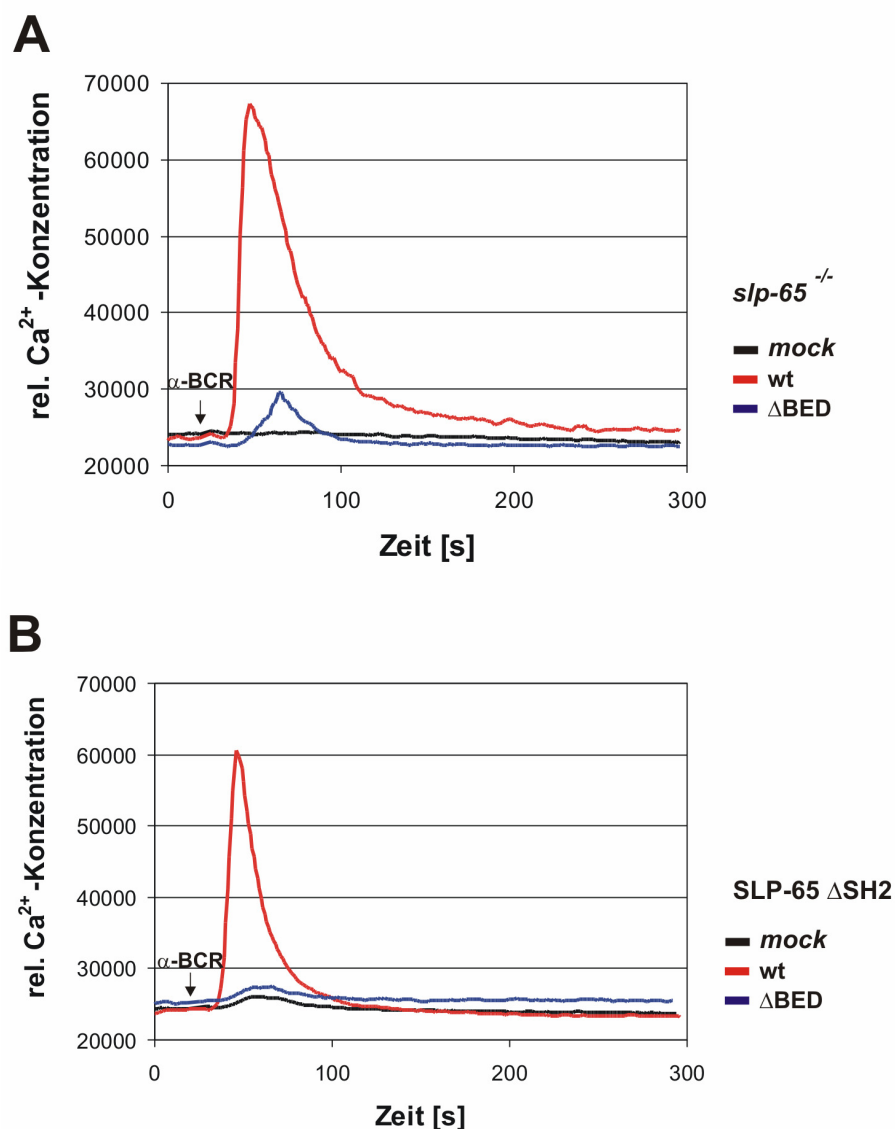
Auch die stimulationsabhängige Phosphorylierung von SLP-65 durch Syk wurde untersucht. Während wildtypisches SLP-65 nach Stimulation deutlich phosphoryliert wird (wt, Abb. 6.24), sowohl in der SLP-65-defizienten Parentallinie exprimiert (Spur 4), als auch in der zusätzlich SLP-65  $\Delta$ SH2-exprimierenden Parentallinie (Spur 10), ist die Phosphorylierung von SLP-65  $\Delta$ BED in beiden Fällen gleichermaßen stark reduziert (Spuren 6 und 12).



**Abb. 6.24: Die reduzierte Phosphorylierung von SLP-65  $\Delta$ BED ist unabhängig von der Koexpression von SLP-65  $\Delta$ SH2.** SLP-65-defiziente DT40 Zellen (Spuren 1 und 2) oder Zellen, welche Huhn SLP-65  $\Delta$ SH2 exprimieren (Spuren 7 und 8), wurden mit wildtypischem SLP-65 (wt, Spuren 3 und 4 oder 9 und 10) oder N-terminal deletiertem SLP-65 ( $\Delta$ BED, Spuren 5 und 6 oder 11 und 12) rekonstituiert.  $2 \times 10^7$  Zellen wurden unstimuliert belassen (0) oder für 2 min mit  $2 \mu\text{g}/\text{mL}$  M4 stimuliert (2') und anschließend lysiert. Die geklärten Lysate wurden einer Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen den C-terminal gelegenen GFP-tag unterzogen und die erhaltenen Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Analyse erfolgte durch Westernblotting mit Antikörpern gegen pTyr (oben) oder SLP-65 (unten). Die relativen Molekulargewichte von Markerproteinen sind links in kDa angegeben.

Somit ist zum einen gezeigt, dass die reduzierte Phosphorylierung von SLP-65 bei fehlender BED, wie ich sie für humanes SLP-65 gezeigt habe (vgl. Abb. 6.17), auch für das hier untersuchte SLP-65 des Huhns zu beobachten ist. Weiterhin hat die Koexpression von SLP-65  $\Delta$ SH2 keinen Einfluss auf diese Phosphorylierung.

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung in Zellen, welche SLP-65  $\Delta\text{BED}$  allein exprimieren (Abb. 6.25 A, blau) ist nahezu nicht mehr vorhanden, während die Expression von wildtypischem SLP-65 zu einer deutlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort führt (rot). Die parentale SLP-65-defiziente Zelllinie hat keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierungskompetenz (schwarz). Dies stimmt also mit dem Ergebnis, welches für humanes SLP-65 erzielt wurde, überein (vgl. Abb. 6.18 B). Die parentale Linie, welche SLP-65  $\Delta\text{SH2}$  exprimiert (Abb. 6.25 B, schwarz), zeigt nahezu keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung. Wird in diesen Zellen jedoch zusätzlich wildtypisches SLP-65 exprimiert, so ist eine deutliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort zu beobachten (rot). Die Koexpression von SLP-65  $\Delta\text{SH2}$  und SLP-65  $\Delta\text{BED}$  führt, wie die alleinige Expression einer der beiden Varianten, zu keiner  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung (blau).



**Abb. 6.25: Unabhängig von der Koexpression von SLP-65  $\Delta\text{SH2}$  besitzt die SLP-65  $\Delta\text{BED}$  keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierungskompetenz.** SLP-65-defiziente DT40 Zellen (A) oder SLP-65  $\Delta\text{SH2}$  exprimierende DT40 Zellen (B) wurden mit wildtypischem (wt, rot) oder N-terminal deletiertem ( $\Delta\text{BED}$ , blau) SLP-65 rekonstituiert.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden mit dem Farbstoff Indo-1 beladen und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung von GFP-positiven Zellen nach BCR-Stimulation mit  $1,5 \mu\text{g/mL}$  M4 am LSR ermittelt.

Es konnte gezeigt werden, dass der Verlust der Signalkompetenz von SLP-65 bei fehlender BED, wie er in Kapitel 6.1.9 für das humane Protein beschrieben ist, auch für die hier verwendete Variante des Huhns zu beobachten ist.

Es wurde auf drei unterschiedliche, SLP-65  $\Delta$ SH2-exprimierende Klone für den retroviralen Transfer von Expressionsvektoren für wildtypisches SLP-65 oder SLP-65  $\Delta$ BED zurückgegriffen (hier ein repräsentativer Klon gezeigt). Die Koexpression von wildtypischem SLP-65 als Positivkontrolle zeigt, dass der bei der Parentallinie zu beobachtende  $\text{Ca}^{2+}$ -Effekt ausschließlich auf das Fehlen der SH2-Domäne von SLP-65 zurückzuführen ist und keinem klonalen Effekt unterliegt. Weiterhin hat das schon exprimierte SLP-65  $\Delta$ SH2 Protein keinen dominant-negativen Effekt.

Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass die parallele Expression von SLP-65  $\Delta$ SH2 die Signalkompetenz von SLP-65  $\Delta$ BED nicht *in trans* komplementieren kann und somit beide Domänen *in cis* kooperieren.

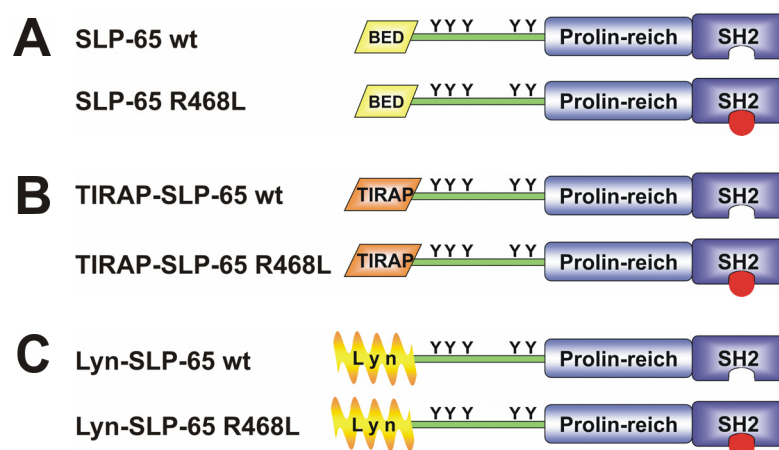
### **6.2.3 Die SH2-Domäne von SLP-65 vermittelt die Lokalisation in Signalmikrodomänen nahe des BCR.**

Sowohl die BED als auch die C-terminale SH2-Domäne von SLP-65 sind für dessen stimulationsabhängige Rekrutierung essentiell. Keine der Domänen ist so prominent, dass sie die zweite funktionell ausgleichen könnte, sondern die Kooperation erfolgt *in cis*. Nur beide Domänen zusammen vereinen in sich die Voraussetzungen für die Membranrekrutierung von SLP-65 und damit für eine funktionelle Signalleitung. Welche Eigenschaften müssen also zusammenkommen? Diese Fragestellung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Ingo Goldbeck und Dr. Michael Engelke studiert. Wie ich gezeigt habe, kann das PIP-Bindemotiv von TIRAP die BED von SLP-65 funktionell ersetzen (vgl. Kapitel 6.1.9). Doch ob mit dieser Membraninteraktionsdomäne auch die Funktion der SH2-Domäne von SLP-65 überwunden werden kann, blieb zu klären. Auch die Substitution des N-Terminus von SLP-65 durch den Membrananker von Lyn kann die Funktion wieder herstellen (Dr. Ingo Goldbeck nicht veröffentlichte Daten; (Kohler *et al.* 2005)).

Der Membrananker von Lyn besteht aus zwei, auf Myristin- (Tetradecan-) und Palmitin- (Hexadecan-)säure basierenden Acylketten, welche durch posttranslationale Modifikation im N-terminalen Bereich der Src-Kinase kovalent assoziiert sind. Durch hydrophobe Wechselwirkungen mit Komponenten der Plasmamembran sind die Fettsäureketten fest in dieser verankert. Die Lokalisation von Lyn in *lipid rafts* wird dabei durch den Palmitinanker vermittelt (Kovarova *et al.* 2001).

Ist bei einer solchen permanenten Membranassoziation die SH2-Domäne für die Funktion von SLP-65 noch von Belang? Um dies zu untersuchen, sollten Chimäre, bei denen der N-Terminus von SLP-65 durch das PIP-Bindemotiv von TIRAP oder die Myristoylierungs- und Palmitoylierungssequenz von Lyn ersetzt ist, in Abhängigkeit der pTyr-Bindekompetenz der SH2-Domäne von SLP-65 untersucht werden. Dazu wurde die SH2-Domäne durch einen Aminosäureaustausch inaktiviert (R468L) (Waksman *et al.* 1992; Abudula *et al.* 2007).

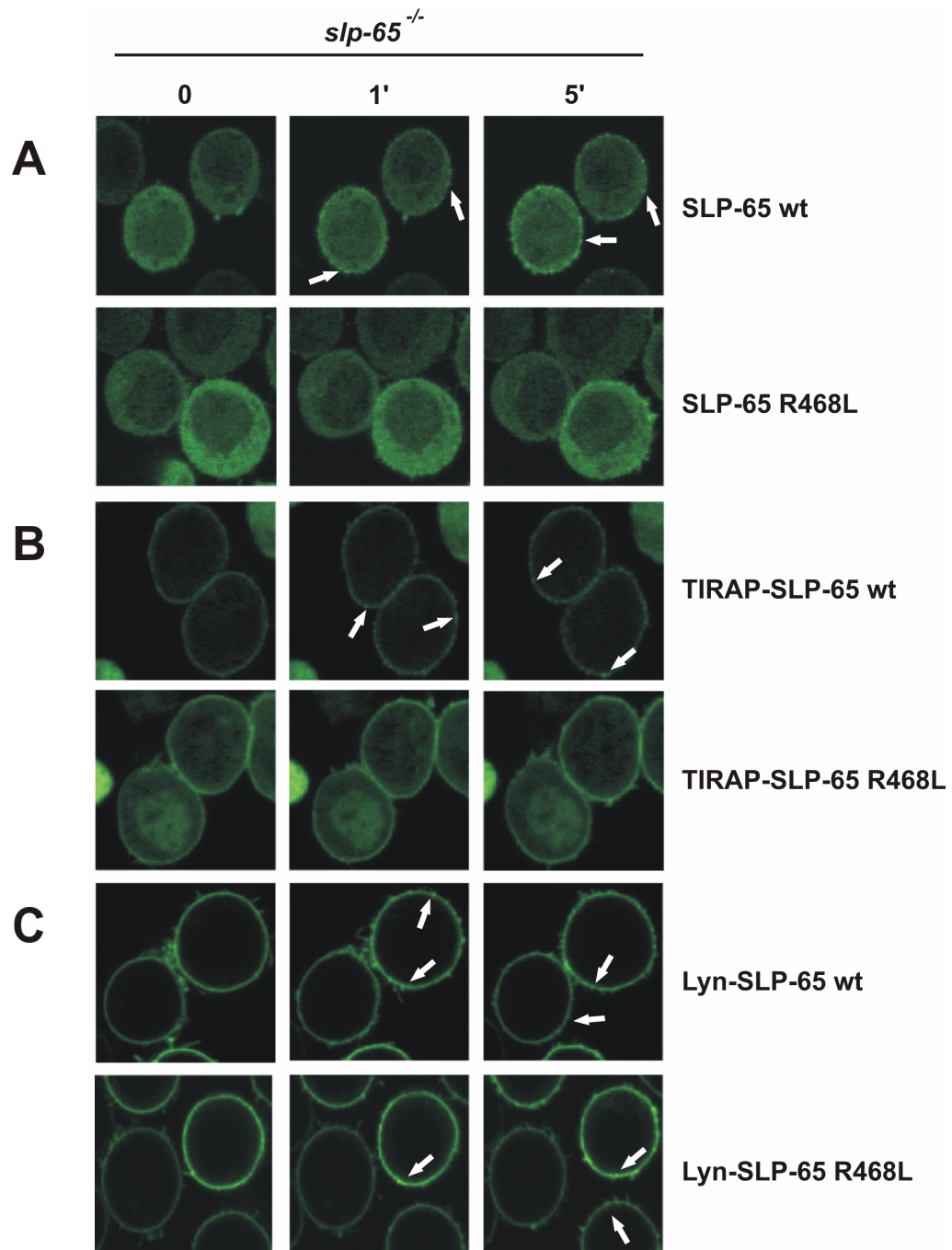
In Anlehnung an die vorangegangenen Studien bezüglich der SH2-Domäne von SLP-65 wurden alle folgenden Chimäre basierend auf Huhn cDNA für SLP-65 hergestellt. Aufbauend auf schon vorhandenen Chimären wurden die ersten 45 Aminosäuren durch das Myristoylierungs- und Palmitoylierungsmotiv von Maus Lyn oder das PIP Bindemotiv von humanem TIRAP ersetzt. Alle Expressionsprodukte weisen einen C-terminalen GFP-tag auf. Eine Übersicht der zu untersuchenden Proteine ist in Abbildung 6.26 gezeigt.



**Abb. 6.26:** Schematische Darstellung der Proteine SLP-65 wt, SLP-65 R468L, TIRAP-SLP-65 wt, TIRAP-SLP-65 R468L, Lyn-SLP-65 wt und Lyn-SLP-65 R468L, die im folgenden in DT40 Zellen untersucht wurden. Die ersten 45 Aminosäuren von wildtypischem Huhn SLP-65 (SLP-65 wt, A, oben) und in der SH2-Domäne inaktiviertem SLP-65 (SLP-65 R468L, A, unten) wurden durch das PIP-Bindemotiv von TIRAP (Aminosäuren 1-41, human) (TIRAP-SLP-65 wt und TIRAP-SLP-65 R468L, B) oder die Palmitoylierungs- und Myristoylierungs-sequenz von Lyn (Aminosäuren 1-23, Maus) (Lyn-SLP-65 wt und Lyn-SLP-65 R468L, C) ersetzt. Alle Proteine sind C-terminal GFP-markiert.

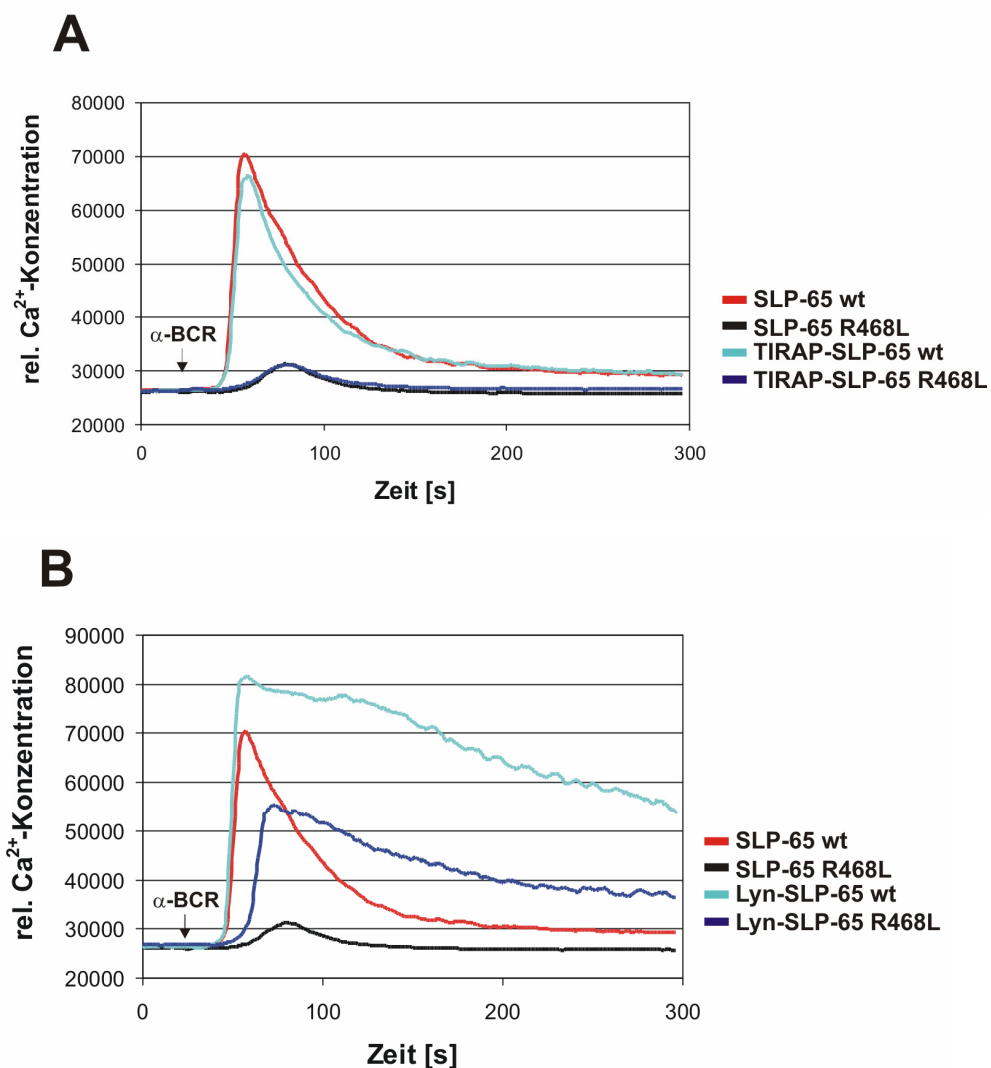
In unstimulierten Zellen waren alle Chimäre vorwiegend gleichmäßig verteilt an der Plasmamembran lokalisiert (Abb. 6.27 B und C, links), während das wildtypische SLP-65 im gesamten Cytoplasma lokalisiert war (A, links). Nach Stimulation wurde wildtypisches SLP-65 an die Plasmamembran rekrutiert (A, oben, Mitte und rechts). Es kam zur Bildung punktueller Strukturen, welche eine Akkumulation von SLP-65-Molekülen an diesen Stellen anzeigten (Pfeile). War die SH2-Domäne von SLP-65 inaktiviert, so war keine

Rekrutierung von SLP-65 an die Plasmamembran zu beobachten (A, unten). Im Falle der TIRAP- und Lyn-Chimären mit intakter SLP-65-SH2-Domäne ist nach Stimulation ebenfalls zu beobachten, dass sich punktuelle Strukturen bilden (B und C, oben, Pfeile). Bei inaktivierter SH2-Domäne war die Ausbildung der punktuellen Strukturen im Falle der TIRAP-Chimäre etwas reduziert (B, unten) und nur vereinzelt zu beobachten. Bei Lyn-SLP-65 R468L war die Ausbildung dieser Strukturen wiederum deutlicher (C, unten).



**Abb. 6.27: Lokalisationsstudien unterschiedlicher SLP-65-Chimären.** SLP-65-defiziente DT40 Zellen wurden mit Expressionsvektoren für die in Abbildung 6.26 gezeigten Proteine transfiziert. Die Lokalisation der GFP-markierten Proteine vor (0, links) und nach ein- (1', Mitte) oder fünf- (5', rechts) minütiger Stimulation mit 4 µg/mL M4 wurde am Konfokalmikroskop durch Dr. Michael Engelke untersucht.

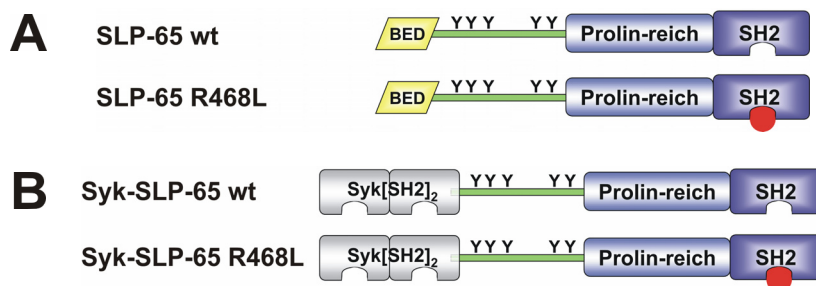
Die Kompetenz der BCR-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung in Zellen, welche SLP-65 mit inaktivierter SH2-Domäne exprimieren (SLP-65 R468L, Abb. 6.28 A und B, schwarz), war, wie schon beschrieben, nicht mehr gegeben. Die Chimäre, welche die PIP Bindedomäne von TIRAP aufweist, zeigte eine wildtypische  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort ebenfalls nur bei intakter (TIRAP-SLP-65 wt, A, türkis), nicht aber bei inaktivierter (TIRAP-SLP-65 R468L, A, blau) SH2-Domäne. Im Falle der Chimäre mit einem N-terminalen Lyn-Anker war bei intakter SH2-Domäne ein anhaltendes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal zu beobachten (Lyn-SLP-65 wt, B, türkis). Im Falle einer inaktivierten SH2-Domäne war das Signal reduziert, aber noch deutlich und ebenfalls anhaltend (Lyn-SLP-65 R468L, B, blau).



**Abb. 6.28: TIRAP-SLP-65 benötigt eine funktionale SH2-Domäne von SLP-65 für eine intakte  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort, Lyn-SLP-65 dagegen nur bedingt.**  $1 \times 10^6$  DT40 B-Zellen, welche die in Abbildung 6.26 vorgestellten Proteine exprimieren (Farbcode siehe Legende), wurden mit dem Farbstoff Indo-1 beladen und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung von GFP-positiven Zellen nach Stimulation mit  $1,5 \mu\text{g}/\text{mL}$  M4 am LSR untersucht.

Die Membranlokalisierung der TIRAP- und Lyn-Chimäre ist deutlich zu erkennen, sowohl in stimulierten, als auch in unstimulierten Zellen. Dennoch kann die Funktion der SH2-Domäne von SLP-65 nur im Falle der Lyn-Chimäre teilweise überwunden werden. Eine einfache Membranassoziation ist also nicht ausreichend. Vielmehr scheint die stimulationsinduzierte Ausbildung der punktuellen Strukturen an der Plasmamembran eine Voraussetzung zu sein, denn diese ist reduziert im Falle der TIRAP-SLP-65 R468L-Chimäre und geht einher mit einer fehlenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort nach Stimulation.

Der Membrananker von Lyn vermittelt eine Lokalisation in sogenannten *lipid rafts*. Weiterhin ist beschrieben, dass es nach Stimulation zu einer Translokation des BCR in diese *lipid rafts* kommt (Cheng *et al.* 1999). Um im folgenden zu analysieren, ob eine Kolo-kalisation von SLP-65 mit dem BCR durch die SH2-Domäne vermittelt wird, wurden Chimäre generiert, bei denen der N-Terminus von SLP-65 durch die Tandem-SH2-Domäne von Syk ersetzt ist (Abb. 6.29 B). Dabei wurde sich zu Nutze gemacht, dass diese Domäne direkt an phosphorylierte ITAM des BCR bindet. Wiederum wurde bei einer Chimäre die SLP-65-SH2-Domäne intakt belassen (Syk-SLP-65 wt, Abb. 6.29 B oben) oder durch den schon beschriebenen Aminosäureaustausch inaktiviert (Syk-SLP-65 R468L, B, unten).



**Abb. 6.29: Schematische Darstellung der Proteine SLP-65 wt, SLP-65 R468L, Syk-SLP-65 wt und Syk-SLP-65 R468L, die im folgenden in DT40 Zellen untersucht wurden.** Die ersten 45 Aminosäuren von wildtypischem SLP-65 des Huhns (SLP-65 wt, A, oben) und in der SH2-Domäne inaktiviertem SLP-65 (SLP-65 R468L, A, unten) wurden durch die Tandem-SH2-Domäne von Syk (Aminosäuren 1-277, human) (Syk-SLP-65 wt und Syk-SLP-65 R468L, B) ersetzt.

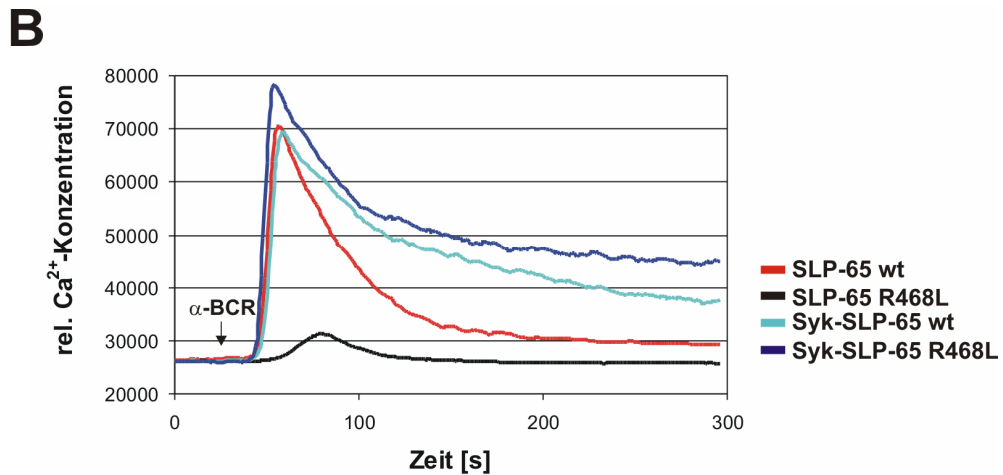
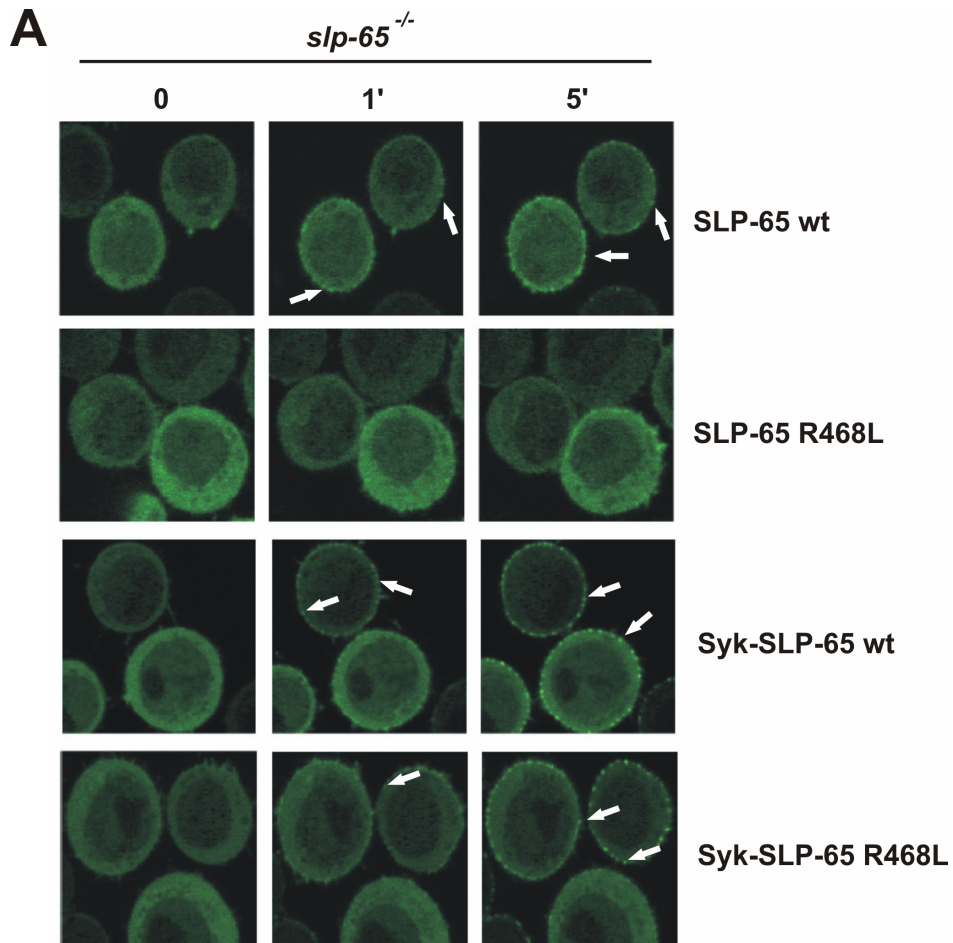
Stimulationsabhängige Lokalisationsstudien am Konfokalmikroskop wurden von Dr. Michael Engelke durchgeführt. In unstimulierten Zellen waren alle Proteine gleichmäßig im Cytosol verteilt. Nach Kreuzvernetzung des BCR mit Antikörpern kam es zur Rekrutierung von wildtypischem SLP-65 (SLP-65 wt, Abb. 6.30 A) mit Ausbildung der beschriebenen punktuellen Strukturen, nicht jedoch bei inaktivierter SH2-Domäne (SLP-



65 R468L). Auch die Chimäre, welche anstelle der BED von SLP-65 die Tandem-SH2-Domäne von Syk aufweist, wurde nach BCR-Stimulation an die Plasmamembran rekrutiert (Syk-SLP-65 wt). Hier kam es ebenfalls zur Ausbildung der schon beschriebenen punktuellen Strukturen. Anders als bei SLP-65 selbst hat eine Inaktivierung der C-terminalen SH2-Domäne von SLP-65 hier also keinen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins (Syk-SLP-65 R468L).

Tatsächlich ist auch die Kompetenz der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung in Zellen, welche die Syk-SLP-65-Chimäre exprimieren, nicht nur gegeben (Abb. 6.30 B, türkis), sondern zusätzlich entkoppelt von der Funktion der SH2-Domäne von SLP-65 (blau).

Ich konnte also zeigen, dass eine Membranassoziation von SLP-65 nicht die Funktion beider Membrananker ersetzen kann. Vielmehr ist eine Koloalisation mit dem BCR in *lipid rafts* nötig, damit SLP-65 seine Funktion erfüllen kann. Dies wird durch die C-terminale SH2-Domäne vermittelt.



**Abb. 6.30:** Substitution der BED von SLP-65 durch die Tandem-SH2-Domäne von Syk führt zu einem funktionalen Protein unabhängig von der SH2-Domäne von SLP-65. **A**, SLP-65-defiziente DT40 B-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für die in Abbildung 6.29 beschriebenen Proteine transduziert. Die Lokalisation der GFP-markierten Proteine vor (0, links) und nach ein- (1', Mitte) oder fünf- (5', rechts) minütiger Stimulation mit 4 µg/mL M4 wurde am Konfokalmikroskop durch Dr. Michael Engelke untersucht. **B**,  $1 \times 10^6$  Zellen, welche die in Abbildung 6.29 vorgestellten Proteine exprimieren (Farbcode siehe Legende), wurden mit dem Farbstoff Indo-1 beladen und die Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung von GFP-positiven Zellen nach Stimulation mit 1,5 µg/mL M4 am LSR ermittelt.

## 7 Diskussion

SLP-65 ist das zentrale Adapterprotein in der BCR-Signalleitung und sichert die korrekte Membranlokalisation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes und damit die Einleitung intrazellulärer Signalprozesse. Der genaue Mechanismus der Lokalisation von SLP-65 an die Plasmamembran in aktivierten B-Zellen ist bislang ungeklärt. Ziel dieser Arbeit war die molekularen Aspekte zu entschlüsseln, die eine korrekte Rekrutierung von SLP-65 nach BCR-Stimulation ermöglichen. Im Zuge dessen stand die Charakterisierung der N-terminalen, basischen Region von SLP-65, der ursprünglich eine Leucin-Zipper-Funktion zugeschrieben wurde (Kohler *et al.* 2005), der C-terminalen SH2-Domäne als bekannter Interaktionspartner des Membranproteins Ig- $\alpha$  (Engels *et al.* 2001) und die Kooperation beider Domänen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich bestätigen, dass die N-terminale, basische Effektdomäne (BED) von SLP-65 essentiell für die initialen Signalereignisse nach BCR-Stimulation ist. Zellen, welche die N-terminal deletierten Varianten von humanem SLP-65 (Abb. 6.18) oder SLP-65 des Huhns (Abb. 6.25) exprimieren, zeigten keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung nach BCR-Stimulation. Durch unterschiedliche Aminosäureaustausche von Isoleucin in Position 25 konnte ich zeigen, dass nur der Austausch zu saurem Glutamat eine deutlich Reduktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung zur Folge hatte, wohingegen basisches Lysin und neutrales Alanin nur einen geringen Einfluss hatten. Somit ist die Funktion eines Leucin-Zippers innerhalb der BED fraglich. Darüber hinaus war es mir möglich neue Bindungspartner für die BED von SLP-65 zu identifizieren. Zum einen konnte ich zeigen, dass der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor Calmodulin in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  mit der BED von SLP-65 interagiert. Die für die Interaktion kritische Konzentration an Calciumionen liegt dabei in einem Bereich, der die cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von stimulierten Zellen widerspiegelt. Weiterhin konnte ich zeigen, dass SLP-65 Bestandteile der Plasmamembran, nämlich Phosphatidylinositolphosphate, *in vitro* binden kann. Diese Interaktion wird ebenfalls durch die BED von SLP-65 vermittelt. Den Verlust der Signalkompetenz von SLP-65  $\Delta$ BED konnte ich durch die Fusion mit dem intakten PIP-Bindemotiv des Adapterproteins TIRAP, nicht aber mit der inaktivierten Form, wieder herstellen.

Darüber hinaus konnte ich zur funktionellen Analyse der C-terminalen SH2-Domäne von SLP-65 beitragen, welche eine zweite Membranrekrutierungsdomäne darstellt. Ich konnte zeigen, dass beide für die Membranrekrutierung essentiellen Domänen, nämlich N-terminale BED und C-terminale SH2-Domäne, *in cis* kooperieren. Weiterhin zeigt die Analyse von unterschiedlichen Chimären, dass eine alleinige Assoziation des Proteins an

die Membran nicht den Verlust beider Membrananker ausgleichen kann, sondern vielmehr die SH2-Domäne nötig ist, um eine Lokalisation des Proteins in BCR-nahe Signalzentren in *lipid rafts* zu vermitteln.

Diese Studien haben neue Aspekte der SLP-65-Funktion enthüllt, die zum Verständnis der molekularen Mechanismen der Lokalisation dieses Proteins und damit der Signalinitiation in B-Zellen beitragen.

## **7.1 Die N-terminale, basische Effektor-domäne von SLP-65**

### **7.1.1 Eine Leucin-Zipper-Funktion innerhalb der BED von SLP-65 ist für die Membranrekrutierung nicht entscheidend.**

Köhler *et al.* beschrieben 2005 ein Leucin-Zipper-Motiv innerhalb der N-terminalen, basischen Region von SLP-65, welches für die Membranlokalisation des Proteins verantwortlich sein soll. In unstimulierten B-Zellen ist SLP-65 im Cytosol verteilt lokalisiert (Köhler *et al.* 2005). Durch *bleaching*-Experimente zeigten die Autoren, dass ein Teil von SLP-65 an der Membran lokalisiert ist und dieser *pool* an Membran-assoziiertem SLP-65 bei Deletion des N-Terminus verloren geht. Die funktionelle Relevanz wurde in primären B-Zellen der *slp-65*<sup>-/-</sup> Maus, welche einen partiellen Block in der B-Zell-Entwicklung im Stadium der Prä-B-Zellen aufweist, gezeigt (Jumaa *et al.* 1999; Flemming *et al.* 2003). Isoliert man diese Prä-B-Zellen und rekonstituiert sie mit wildtypischem SLP-65, wird der Block aufgehoben und die Expression des pre-BCR auf der Zelloberfläche wird herunterreguliert. Im Falle des N-terminal deletierten SLP-65 ist dies nicht der Fall, wie Köhler *et al.* zeigen. Ein Aminosäureaustausch des Isoleucin in Position 25 zu Glutamat konnte die Funktion und die Membranlokalisation von SLP-65 stark inhibieren. Die Autoren führten dies auf den Verlust des hydrophoben Isoleucins und damit der Zerstörung des Leucin-Zipper-Motivs zurück (Köhler *et al.* 2005).

Ich konnte im DT40 B-Zellsystem bestätigen, dass der beschriebene Aminosäureaustausch I25E die Funktion von SLP-65 in der Initiation der Signalleitung beeinflusst, denn er führt zu einer starken Reduktion der Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung nach BCR Stimulation (Abb. 6.1). Ein Leucin-Zipper umfasst eine  $\alpha$ -helikale Struktur mit einer definierten Anordnung von Isoleucinen und Leucinen alle 7 Aminosäuren (Landschulz *et al.* 1988). Somit liegen diese Reste nach jeder zweiten Helixwindung dieser Struktur übereinander. Bei einer Nummerierung der Aminosäuren von a-g mit Position d für Leucine und Isoleucine, sind zusätzlich hydrophobe Aminosäuren in Position a stabilisierend für Zipper-Dimere, da diese die Positionen in der helikalen Struktur genau

zwischen den übereinander angeordneten Leucinen und Isoleucinen einnehmen. Die Positionen b, c und f zeichnen sich durch hydrophile Aminosäuren aus (Deppmann *et al.* 2006). Somit weist die  $\alpha$ -Helix eine hydrophile und eine hydrophobe Seite auf. Die hydrophobe Seite dient zur Dimer-Bildung, wobei die herausragenden Leucin- und Isoleucin-Reste wie ein Reißverschluss ineinander greifen. Die Stabilität solcher Dimere wird durch die hydrophoben Wechselwirkungen sicher gestellt und durch die Einführung von Ladungen zerstört. SLP-65 weist tatsächlich diese Anordnung von Aminosäuren, die einen Leucin-Zipper definieren, auf. Dennoch ist mit Glutamat in Position 29 eine geladene Aminosäure in einer a-Position zu finden, welche hydrophob sein sollte. Diese liegt genau mittig eines potentiellen Leucin-Zippers in der N-terminalen Region von SLP-65. Umgekehrt ist an dieser Stelle eine gewisse Variabilität erlaubt. Anders verhält es sich mit den d-Positionen, welche für die Stabilität von Leucin-Zippern als invariant gelten (Lupas *et al.* 1991; Vinson *et al.* 2002; Deppmann *et al.* 2006).

Ein Aminosäureaustausch in Position d zu Alanin, Lysin oder Glutamat sollte also eine Leucin-Zipper-Funktion zerstören. Tatsächlich konnte ich jedoch zeigen, dass sich der Austausch I25K oder I25A nur wenig auf die Funktionalität von SLP-65 auswirkt, denn in Zellen, welche diese Varianten exprimieren, war eine deutliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung nach Stimulation zu erkennen. Gerade im Falle von I25K handelt es sich um einen Austausch zu einer großen, unter physiologischen Bedingungen positiv geladenen Aminosäure, die keine hydrophoben Interaktionen zur Stabilisation eines Zipper-Dimers zulassen kann.

SLP-65	Köhler <i>et al.</i>	Eigene Daten ( $\text{Ca}^{2+}$ )
wt	+++	+++
$\Delta\text{LZ}$ bzw. $\Delta\text{BED}$	-	-
I25E	-	+/-
I25A	n.a.	++
I25K	n.a.	++

Tab. 7.1: Aminosäureaustausche in Position 25 von humanem SLP-65.

Die Relevanz der N-terminalen Region für die Funktion von SLP-65 in der BCR-Signalleitung konnte bestätigt werden. Auch der Aminosäureaustausch von I25E hat die schon erhobenen funktionellen Daten von Köhler *et al.* bestätigen können. Die Schlussfolgerung, dafür sei ein Leucin-Zipper-Motiv verantwortlich, welches mit einem Membranprotein dimerisiert, ist mit den von mir gezeigten Daten widerlegt (vgl. Tabelle 7.1). Es wäre möglich, dass der postulierte Leucin-Zipper bei in der Signalleitung

folgenden Ereignissen eine Rolle spielen könnte, jedoch schließe ich, aufgrund meiner Ergebnisse, an dieser Stelle eine Rolle für die diskutierte Membranlokalisation, welche Voraussetzung für eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung ist (Kurosaki und Tsukada 2000), aus. Weiterhin konnte für die SLP-65-Variante des Huhns, welche den Aminosäureaustausch von Isoleucin in Position 25 zu Lysin aufweist, eine stimulationsinduzierte Rekrutierung von SLP-65 an die Plasmamembran beobachtet werden (mündliche Mitteilung von Dr. Ingo Goldbeck und Dr. Michael Engelke).

Die untersuchten SLP-65-Varianten lassen vermuten, dass die Funktion des N-Terminus von SLP-65 auf die basische Eigenschaft dieser Region zurückzuführen ist. Dies würde auch erklären, warum der Aminosäureaustausch zu saurem Glutamat eine deutliche Einschränkung der SLP-65-Funktion hat. Somit wurde die allgemeinere Bezeichnung einer basischen Effektor-domäne (BED) für den SLP-65-N-Terminus gewählt. Für die Membranlokalisation von SLP-65 scheint die von mir *in vitro* gezeigte direkte Bindung der BED an Phosphatidylinositolphosphate, welche Bestandteile der Plasmamembran sind, verantwortlich zu sein. Neben den *in vitro* Studien konnte ich zeigen, dass ein bekanntes PIP-Bindemotiv diese Domäne funktionell ersetzen kann. Zusammen mit der hier erstmals beschriebenen Interaktion des N-Terminus von SLP-65 mit Calmodulin könnte es sich hier um eine PIP- $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Regulationseinheit handeln. Dies soll im Folgenden diskutiert werden.

### 7.1.2 Die BED interagiert $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig mit Calmodulin.

Dem Leucin-Zipper ähnlich sind Motive, welche für die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Interaktion von Proteinen mit Calmodulin beschrieben sind. Auch hier sind hydrophobe Aminosäurereste in definierten Abständen angesiedelt (Rhoads und Friedberg 1997). Zwischen diesen hydrophoben Resten sind vornehmlich basische Aminosäuren wie Arginin und Lysin zu finden, wie sie auch die BED von SLP-65 aufweist. Ich konnte im Rahmen dieser Arbeit eine direkte Interaktion von Calmodulin mit dieser Domäne von SLP-65 nachweisen. Diese ist  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig und die kritische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration liegt im Bereich von ca. 0,6-1,25  $\mu\text{M}$  (Abb. 6.6). Dies gibt einen Hinweis auf die funktionelle Relevanz der Interaktion nach BCR Stimulation, denn während in ruhenden B-Zellen die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei 10-100 nM liegt, steigt diese nach Stimulation an (Engelke *et al.* 2007). Es ist also zu vermuten, dass eine SLP-65-Calmodulin Interaktion über die BED von SLP-65 nur in stimulierten Zellen stattfindet.

Calmodulin ist ein ubiquitär exprimiertes, 148 Aminosäuren umfassendes Protein von 16 kDa (Zhang und Yuan 1998; Vetter und Leclerc 2003). Die Aminosäuresequenz ist zwischen den Spezies hochkonserviert. Calmodulin besitzt vier *helix-loop-helix* Motive, die

als EF-Hände bezeichnet werden, da die beiden  $\alpha$ -Helices wie Daumen und Zeigefinger einer Hand angeordnet sind. Über den 11-14 Aminosäuren umfassenden, verbindenden *loop* einer EF-Hand kann ein Calciumion gebunden werden. Insgesamt weist Calmodulin also vier  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestellen auf, wobei zwei N-terminal zu finden sind und zwei C-terminal. Die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an Calmodulin ist kooperativ. In der Abwesenheit von Calciumionen hat Calmodulin eine eher globuläre Struktur. Durch die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  wird die die beiden EF-Hand-Paare verbindende,  $\alpha$ -helikale Region gestreckt und weiterhin die Ausrichtung der EF-Hand-Helices verändert. Zuvor abgeschirmte hydrophobe Aminosäuren werden somit exponiert und können nun mit Zielstrukturen von Bindungspartnern interagieren.

Posttranslationale Modifikationen an Calmodulin selbst oder an dessen Bindungspartner können die Interaktion modulieren (McIlroy *et al.* 1991; Corti *et al.* 1999; Leclerc *et al.* 1999). Ich konnte zeigen, dass durch BCR-Stimulation induzierte mögliche Modifikationen an Calmodulin oder Phosphorylierungen an SLP-65 keinen Einfluss auf die hier gezeigte Interaktion dieser Proteine hatten (vgl. Abb. 6.7 und 6.8). Allein die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration war ausschlaggebend.

SLP-65 weist in der BED zwei modifizierte 1-8-14 Motive auf, welche die Aminosäuren 4-18 bzw. 25-48 umfassen, und für humanes und Maus SLP-65 ein striktes 1-5-10 Motiv innerhalb der Aminosäuren 32-41. Interaktionsstudien bezüglich dieser Motive sind in Tabelle 7.2 zusammengefasst.

Die Interaktion des Fusionsproteins aus GST und BED mit Calmodulin konnte durch Austausch der Aminosäure Isoleucin in Position 25 zu Lysin (innerhalb der BED) verhindert werden. Die Isolation des vollständigen SLP-65-Proteins aus B-Zelllysaten mittels Calmodulin-Agarose war jedoch trotz dieses Aminosäureaustausches möglich. Selbst die SLP-65-Variante, bei der zwei Aminosäureaustausche I25K und V41K vorlagen, konnte noch mit Calmodulin-Agarose aus B-Zelllysaten isoliert werden (Abb. 6.11). Somit scheint in dem vollständigen Protein ein anderes oder ein zusätzliches Calmodulin-bindendes Motiv zu existieren. Auch eine indirekte Bindung von Calmodulin und SLP-65 vermittelt durch ein endogenes Protein wäre denkbar. Ein zusätzliches direktes Interaktionsmotiv könnte das erste hypothetische Motiv innerhalb der BED von SLP-65 sein, denn dies ist bei den beschriebenen Aminosäureaustauschen noch intakt. Jedoch konnte dieses Motiv alleine als GST-Fusionsprotein kein Calmodulin aus Lysaten isolieren und schon ein einziger Aminosäureaustausch I25K im GST-Fusionsprotein GST-SLP-65[1-50] reichte aus, um die Interaktion zu unterbinden (Abb. 6.10). Dieser Widerspruch könnte zum einen auf der unterschiedlichen Herkunft der Proteine beruhen, so wurde das GST-Fusionsprotein in *E.coli* exprimiert und aus Bakterienlysaten aufgereinigt. Im Falle des vollständigen SLP-65-Proteins mit den beschriebenen

Aminosäureaustauschen wurde direkt eine Affinitätspräzipitation mit Calmodulin-Agarose aus Zelllysaten eukaryotischer Zellen, welche die Proteine exprimieren, durchgeführt. Möglich ist auch, dass im Falle des vollständigen Proteins dessen dreidimensionale Struktur die Interaktion zu Calmodulin zu Gunsten oder zu Ungunsten der unterschiedlichen Motive verändert. Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass noch eine weitere Calmodulinbindestelle im vollständigen SLP-65 außerhalb der BED zu finden ist, welche dominant gegenüber den beschriebenen ist. Die Untersuchung der Deletionsvarianten lässt zwar vermuten, dass die ersten 20 Aminosäuren (welche das erste beschriebene Motiv umfassen) essentiell sind, jedoch kann nur die gezielte Inaktivierung dieses Motivs Auskunft geben, ob weitere Bindestellen existieren. Gegen letzte Vermutung spricht zwar, dass im Falle der Deletionsvarianten dieses mögliche, zusätzliche Motiv noch vorhanden ist, doch könnte auch hier die Tertiärstruktur des Proteins durch die Deletion verändert und ein zusätzliches Motiv inaktiviert worden sein. Eine, durch ein weiteres Protein vermittelte, indirekte Interaktion von SLP-65 und Calmodulin *in vivo* ist ebenfalls möglich. Das vermittelnde Protein könnte mit einer Domäne von SLP-65 interagieren, welche im GST-Fusionsprotein nicht vorhanden ist, so dass hier die Interaktion außen vor bleibt und ein Aminosäureaustausch innerhalb der BED ausreichend ist, um die Calmodulinbindung zu verhindern. Derzeit sind Aminosäureaustausche von Alanin in Position 11 zu Lysin und Leucin in Position 18 zu Lysin allein und in unterschiedlichen Kombinationen mit schon hier vorgestellten Aminosäureaustauschen in Arbeit.



GST-SLP-65	hSLP-65	chSLP-65	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin- bindung
[1-50]			+
[1-32]			-
[28-50]			-
[1-50] I25K			-
[1-50] V41K			+
	wt		+
	I25K		+
	V41K		+
	I25K/V41K		+
	Δ48		-
		wt	+
		Δ20	-
		Δ27	-
		Δ31	-
		Δ45	-

**Tab. 7.2: Interaktionen von SLP-65-Varianten mit Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin.**

Die Tatsache, dass für die Interaktion von SLP-65 und Calmodulin ein gewisse Ca<sup>2+</sup>-Konzentration Voraussetzung ist und weiterhin Zellen, welche die untersuchten Deletionsvarianten von SLP-65 exprimieren, teilweise durchaus noch Ca<sup>2+</sup> mobilisieren können (Abb. 6.12), spricht für eine diesem Ereignis folgende Funktion.

Funktionen von Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin sind die Regulation von z.B. Ionenkanälen, entweder durch Ca<sup>2+</sup>-abhängige Bindung oder durch konstitutive Bindung mit struktureller Veränderung in der Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup> (Levitan 1999; van de Graaf *et al.* 2006). Weiterhin ist Calmodulin als Regulator von Enzymen beschrieben. Eine Reihe von Kinasen, aber auch Phosphatasen wie Calcineurin werden durch die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Bindung von Calmodulin aktiviert. Dabei bindet Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin innerhalb oder nahe einer autoinhibitorischen Domäne, wodurch die Enzymtasche freigelegt wird und das

Substrat Zugang erhalten kann (Klee *et al.* 1998; Hook und Means 2001). Auch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, wie der *epidermal growth factor* (EGF)-Rezeptor, können  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin binden. Ein frühes Modell der Regulation dieses Rezeptors basierte allerdings auf der strukturellen Änderung des Rezeptors durch Dimerisierung nach Ligandenbindung und der damit verbundenen Aktivierung der cytoplasmatischen Kinasedomänen. 2005 postulierten McLaughlin und Murray ein Modell, bei dem die Kinasedomänen durch proximale PIP-Bindedomänen an der Plasmamembran fixiert sind und somit nicht frei ins Cytosol ragen (McLaughlin und Murray 2005). Durch Bindung von Calmodulin in diesen postulierten PIP-Bindungsdomänen lösen sich dann die Kinasedomänen und können vollständig aktiv sein. Tatsächlich konnten die postulierten PIP-Bindedomänen dieses Jahr von Sengupta *et al.* bestätigt werden und Untersuchungen stützen das oben genannte Modell (Sengupta *et al.* 2009). McLaughlin und Murray postulierten diesen Mechanismus für den EGF-Rezeptor, aber auch für andere Rezeptoren, basierend auf Studien an MARCKS und verwandten Proteinen (McLaughlin *et al.* 2005; McLaughlin und Murray 2005). MARCKS weist einen N-terminalen Myristinanker auf. Weiterhin beinhaltet das Protein mehrere PIP-Bindedomänen. In Anwesenheit von Calciumionen kann  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin in diesen Domänen binden und löst somit diesen Bereich von der Plasmamembran. Dadurch kann auch der Myristinanker allein nicht mehr für die Membranassoziation sorgen, sondern es kommt zu einer Translokation von der Membran in das Cytoplasma (Kim *et al.* 1994).

### 7.1.3 Die BED als PIP-Bindedomäne.

PIP-Bindedomänen und die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Calmodulin-Bindemotive teilen sich grundlegende Eigenschaften. Es scheint sich hierbei um ein PIP- $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Modul zu handeln, welches für eine regulierte Membranassoziation, sei es für ganze Proteine oder nur für Proteindomänen, sorgt. In Kapitel 6.1.8 konnte ich in der Tat eine über die SLP-65-BED vermittelte Bindung von Phosphoinositolphosphaten *in vitro* zeigen. Dabei wurden Nitrocellulosemembranen mit darauf immobilisierten Lipiden (PIP-strips™) mit rekombinanten Proteinen inkubiert und diese anschließend auf der Membran nachgewiesen. Es konnten die drei Bisphosphate  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$ ,  $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$  und  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ , sowie das Trisphosphat  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$  als durch die BED vermittelte Bindungspartner identifiziert werden (Abb. 6.13 und 6.14). Ein Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin auf die hier beschriebenen PIP-Bindungen konnte mittels diesen Experiments nicht gezeigt werden. Dazu wurden die PIP-strips™ mit rekombinanten Proteinen mit und ohne Calmodulin inkubiert und kein Unterschied in der Bindung der PIP festgestellt. Dennoch heißt dies nicht, dass eine solche Konkurrenz nicht *in vivo* stattfinden könnte. Tatsächlich haben

auch Sengupta *et al.* für den EGF-Rezeptor beschrieben, dass  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin nicht mit der Bindung von PIP konkurrieren kann, extrapoliert man die Bindungskonstanten aus Untersuchungen an artifiziellen Vesikeln auf eine *in vivo* Situation (Sengupta *et al.* 2009). Es sei jedoch eine strukturelle Spannung denkbar, welche die Bindungskonstanten verändere, wird von den Autoren diskutiert. Weiterhin scheint die Anwesenheit von basischen Peptiden an den Vesikelmembranen die Bindungskonstanten zu beeinflussen. Tatsächlich geht mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung in B-Zellen nach Stimulation einher, dass SLP-65 mit mehreren Bindungspartnern in Interaktion tritt. Dies kann durchaus zu strukturellen Veränderungen führen, die eine PIP-Bindung schwächen und somit die Interaktion mit Calmodulin erlauben. Auch die Konkurrenz mit den ebenfalls PIP-bindenden Proteinen PLC- $\gamma$ 2 und Btk könnte Einfluss nehmen (Rameh *et al.* 1997; Bolland *et al.* 1998; Falasca *et al.* 1998). Letztendlich handelt es sich bei diesem Experiment um eine *in vitro* Studie, bei der jegliche andere Komponenten außen vor verbleiben; angefangen bei weiteren Interaktionspartnern von SLP-65 bis hin zur Umgebung der Phosphoinositolphosphate, welche hier auf einer Nitrocellulosemembran und nicht eingebettet in einer Lipiddoppelschicht vorliegen. Weiterhin sind andere Membrankomponenten und die Komposition von Plasmamembranen und deren Mikrostrukturen wie *lipid rafts* nicht berücksichtigt.

Interaktionsstudien von Proteinen mit in Lipiddoppelschichten-eingebetteten Phospholipiden erfolgt unter Verwendung definierter Vesikel. Diese können mit beliebigen Lipiden und Phospholipiden ausgestattet werden. Ein solcher Ansatz wird derzeit verfolgt.

Neben diesen *in vitro* Studien konnte ich zeigen, dass ein bekanntes PIP-Bindemotiv, nämlich das des Adapterproteins TIRAP, die Funktion der BED von SLP-65 *in vivo* ersetzen kann. Wird diese Domäne durch 4 definierte Aminosäureaustausche inaktiviert (Kagan und Medzhitov 2006), so kann dieses Motiv die Funktion der BED nicht wieder herstellen. Eine Übersicht ist in Tabelle 7.3 gezeigt.

	<i>slp-65</i> <sup>-/-</sup>	hSLP-65 wt	hSLP-65 ΔBED	hTIRAP- SLP-65	hTIRAP* SLP-65
Phosphorylierung der SLP-65- Variante		+++	+	+++	+
Phosphorylierung von PLC-γ2	-	+++	-	+++	-
Ca <sup>2+</sup> - Mobilisierung	-	+++	-	+++	-
Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin- bindung		+++	-	+++	-

**Tab. 7.3: Substitution der BED von SLP-65 durch ein PIP-Bindemotiv.**

Phosphatidylinositolphosphate sind aufgebaut aus der gesättigten Stearinsäure und der ungesättigten Arachidonsäure, welche mit zwei Alkoholgruppen von Glycerol verestert sind (zur Übersicht siehe auch (Payrastra *et al.* 2001)). Sie bilden den hydrophoben, in die Lipidmembran ragenden Teil. Die dritte Alkoholgruppe von Glycerol ist über eine Phosphodiesterbrücke mit Inositol verbunden, was die hydrophile Kopfgruppe bildet. Je nach Phosphorylierungsstatus und Position entsprechender Phosphatreste werden die unterschiedlichen Mono-, Bis- und Trisphosphate unterschieden. PIP machen nur einen geringen Anteil der Plasmamembranlipide aus (zur Übersicht siehe auch (van Meer *et al.* 2008)). Zwar unterscheiden sich die Zusammensetzungen der Plasmamembran unterschiedlicher Zellen nach Zelltyp und Spezies, doch sind die Hauptbestandteile der eukaryotischen Zellmembran das Steroid Cholesterol, Sphingomyelin und die Phosphoglyceride Phosphatidylcholin, -ethanolamin und -serin. In Erythrocyten macht PI(4,5)P<sub>2</sub> z.B. nur 1 % aller Phospholipide der Plasmamembran aus (Ferrell und Huestis 1984), obwohl es das häufigste Phosphatidylinositolphosphat in eukaryotischen Plasmamembranen ist. Eine Reihe von Kinasen und Phosphatasen halten ein dynamisches Gleichgewicht zwischen den unterschiedlichen PIP in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle aufrecht.

Interaktionen von Proteinen mit PIP beruhen meist auf unspezifischen elektrostatischen Wechselwirkungen der negativ geladenen Kopfgruppen der Lipide mit basischen Regionen in Proteinen (McLaughlin *et al.* 2002; Hurley 2006). Dennoch sind auch Proteindomänen bekannt, deren Struktur nur spezifische PIP-Bindungen zulassen, wie z.B. die PH Domänen von PLC-δ1 (spezifisch für PI(4,5)P<sub>2</sub>) oder Btk (spezifisch für PI(3,4,5)P<sub>3</sub>), FYVE Domänen (spezifisch für PI(3)P), etc. (Garcia *et al.* 1995; Lemmon *et*

*al.* 1995; Rameh *et al.* 1997; Halet 2005). Gekoppelt an GFP sind diese Domänen aufgrund ihrer hohen Affinität und Spezifität geeignet für das Studium des PIP-Metabolismus.

Für die Funktion von TIRAP wurde die Interaktion des Bindemotivs mit PI(4,5)P<sub>2</sub> als relevant identifiziert (Kagan und Medzhitov 2006). Dabei wurde gezeigt, dass im Falle der Substitution des Motivs durch die PH Domäne von PLC-δ1 die Funktion beibehalten wird, während dies nicht der Fall ist bei anderen spezifischen PIP Bindedomänen. Unterstützt wird diese Aussage durch Studien mit PI-Kinase-Inhibitoren und Phosphatasen, welche unterschiedliche PIP spezifisch dephosphorylieren können. Ein ähnlicher Ansatz mit der Phosphatase SopB, welche PIP in Position 4 und 5 dephosphoryliert (Terebiznik *et al.* 2002), erfolgte in DT40 B-Zellen durch Dr. Michael Engelke. Die Expression der Phosphatase resultierte in Effekten, die sich für einen Großteil der Zellen als letal erwiesen. Dies erschwert, zusammen mit der reduzierten Expression von SLP-65 selbst, eine Beurteilung der beobachteten SLP-65-Rekrutierung. Die Expression einer Inositolpolyphosphat-4-Phosphatase, welche die Dephosphorylierung von PI(3,4)P<sub>2</sub> zu PI(3)P katalysiert (Ivetac *et al.* 2005), scheint die stimulationsinduzierte Rekrutierung von SLP-65 nicht zu hemmen (mündliche Mitteilung von Dr. Michael Engelke, unveröffentlicht). Wortmannin ist ein potenter PI3K (*phosphatidylinositol-3-kinase*)-Inhibitor (Arcaro und Wymann 1993). PI3K phosphorylieren PIP in Position 3. Die stimulationsinduzierte Rekrutierung von SLP-65 an die Plasmamembran ist unabhängig von einer Behandlung der Zellen mit Wortmannin (mündliche Mitteilung von Dr. Michael Engelke, unveröffentlicht), womit eine Phosphorylierung in Position 3 also nicht nötig scheint. Dies spricht gegen eine Rekrutierung von SLP-65 durch spezifische Bindung an PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, einem PIP, welches nach BCR-Stimulation gebildet wird (Gold und Aebersold 1994). Die Substitution der SLP-65-BED durch die PH-Domäne von PLC-δ1 ermöglicht ebenfalls eine intakte Signalleitung (Dr. Ingo Goldbeck, unveröffentlicht). Zusammenfassend und unter Berücksichtigung der Tatsache, dass PI(4,5)P<sub>2</sub> der häufigsten Vertreter der Phosphatidylinositolphosphate in der Plasmamembran ist, scheint PI(4,5)P<sub>2</sub> ein geeigneter Kandidat für eine Interaktion mit der BED von SLP-65 *in vivo*. Eine genaue Charakterisierung, welche PIP nun *in vivo* relevant sind für die SLP-65-Funktion, wird derzeit weiter verfolgt.

Tatsächlich werden nicht nur die funktionellen Eigenschaften von SLP-65 durch die TIRAP-Chimäre exakt imitiert, wie Ca<sup>2+</sup>-Messungen und Phosphorylierungsanalysen gezeigt haben (Abb. 6.17 und 6.18), sondern darüber hinaus teilt die Chimäre die Eigenschaft der Calmodulinbindung in Anwesenheit von Calciumionen (Abb. 6.19). Weiterhin zeigen die Studien, welche die Kooperation von BED und SH2-Domäne von SLP-65 näher charakterisieren (Kapitel 6.2.3), dass auch bezüglich des Zusammenspiels

dieser beiden Domänen die TIRAP-Chimäre die Eigenschaften von wildtypischem SLP-65 in fast allen Punkten teilt. Umgekehrt ist jedoch die Lokalisation der Proteine in unstimulierten Zellen unterschiedlich. TIRAP-SLP-65 ist größtenteils schon in unstimulierten Zellen an der Membran lokalisiert, während SLP-65 selber vorwiegend im Cytosol verteilt ist und nur ein kleiner Anteil an der Membran vorlokalisiert ist. (Abb. 6.27). Dies könnte auf eine geringere Affinität der BED von SLP-65 zurückzuführen sein, so dass nur ein Teil der SLP-65-Moleküle in unstimulierten Zellen an der Membran assoziiert sind, was auch mit bisherigen Studien übereinstimmt (Köhler *et al.* 2005).

Das von Köhler *et al.* vorgestellte Modell beschreibt eine Membranlokalisation von SLP-65 durch Interaktion von dessen N-Terminus mit einem Leucin-Zipper-beinhaltenen Membranprotein (Köhler *et al.* 2005). Die von mir gezeigten Daten sprechen jedoch dafür, dass der N-Terminus von SLP-65 ein PIP-Bindemodul darstellt und somit über die direkte Interaktion mit Lipidkomponenten der Plasmamembran an dieser assoziiert ist. Die von mir ebenfalls nachgewiesene Interaktion dieser BED von SLP-65 mit Calmodulin unterstützt diese Theorie, denn für viele Proteine ist die Regulation von PIP-Bindedomänen durch die Interaktion mit Calmodulin beschrieben. Zusätzlich stützen auch die von Köhler *et al.* erzielten Ergebnisse genau meine Theorie, denn der N-Terminus wird als Membrananker beschrieben.

#### **7.1.4 BED – eine PIP-Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Regulationseinheit?**

Welche Konsequenzen die Interaktion von SLP-65 und Calmodulin mit sich bringt, bleibt zu klären. Die Bindung von Calmodulin könnte strukturelle Voraussetzungen schaffen, um die Interaktion mit Bindungspartner von SLP-65 zu stabilisieren oder zu destabilisieren. Somit könnte eine Umorganisation des SLP-65-Signalkomplexes erfolgen und so dessen Funktion reguliert werden.

Weiterhin denkbar wäre aber auch eine Funktion in der Organisation von Plasmamembranankern. So werden PIP aufgrund der mehrfach ungesättigten Arachidonsäure für sich als nicht stabil in *lipid rafts* angenommen (Payraastre *et al.* 2001; Niu und Litman 2002; Filippov *et al.* 2007). Dennoch ist die Präsenz von PI(4,5)P<sub>2</sub> in *lipid rafts* beschrieben (Hope und Pike 1996; Xavier *et al.* 1998). SLP-65 könnte einen aktiven Transport von PIP in *lipid rafts* vermitteln. Die Stabilisation von PIP in *rafts* durch Proteine, welche über einen zweiten Membrananker mit *rafts* assoziiert sind, wird am Beispiel GAP-43 diskutiert (Tong *et al.* 2008). Wie gezeigt, ist auch im Falle von SLP-65 ein zweiter Membrananker, nämlich die SH2-Domäne, für eine Lokalisation des Proteins in *lipid rafts* verantwortlich. Durch eine kompetitive Bindung von Calmodulin an die N-terminale BED von SLP-65 könnten dann PIP in *lipid rafts* freigesetzt werden und so als Bindestellen für

andere PIP-Interaktionspartner oder als Substrate für Lipasen, Phosphatasen oder Kinasen zur Verfügung stehen. Die Rekrutierung von PIP durch die PH-Domäne von Dynamin und damit eine Rolle als „pipmodulin“ wurde kürzlich zur Diskussion gestellt (Bethoney *et al.* 2009).

Ein ebenfalls interessanter Ansatzpunkt ist die Rolle von SLP-65 im *trafficking* des BCR. Nach Stimulation erfolgt die Internalisierung des BCR innerhalb von Minuten. Der BCR wird in Lamp<sup>+</sup> späte Endosomen transloziert, welche reich an MHCII sind (Clark *et al.* 2003; Gupta und DeFranco 2007). In der murinen B-Zelllinie A20IIA1.6 studierten Siemansko *et al.* das *trafficking* von chimären Rezeptoren abhängig von Aminosäureaustauschen in der Ig- $\alpha$ -Signaluntereinheit. Die Internalisierung von Rezeptoren mit Ig- $\alpha$ Y204F selber war nicht beeinflusst, jedoch erfolgte keine Translokation in späte Endosomen. Durch direkte Fusion von SLP-65 an diesen Rezeptor konnte wieder eine intakte Prozessierung erfolgen (Siemasko *et al.* 2002). Eine Blockade der Fusion von BCR-beinhaltenen frühen Endosomen mit späten Endosomen wird von den Autoren angenommen. 2006 zeigen Patterson *et al.* jedoch eine intakte T-Zellaktivierung durch primäre B-Zellen aus transgenen Mäusen, welche Ig- $\alpha$ Y204F exprimieren (Patterson *et al.* 2006). Die Diskrepanzen könnten auf die unterschiedlichen B-Zellsysteme zurückzuführen sein. Weiterhin ist pY<sup>204</sup> von Ig- $\alpha$  nicht der einzige Faktor zur Rekrutierung von SLP-65 zum BCR, wie später noch diskutiert wird. Die Translokation des BCR in Autophagosomen wird auch in Zusammenhang mit der Zusammenkunft mit kostimulatorischen Segmenten diskutiert (Watanabe und Tsubata 2009).

Am Beispiel von Synaptobrevin wird für die Freisetzung für Neurotransmitter ein Calmodulin-regulierter Wechsel von PIP-Bindungen unterschiedlicher Kompartimente zur Einleitung von Membranfusionen diskutiert (Quetglas *et al.* 2002). PIP-Bindemotiv und Calmodulinbindedomäne sind in diesem Protein eins. Das vorgestellte Modell beschreibt den Ablauf wie folgt. Die PIP-Bindedomäne von Synaptobrevin ist durch *cis* Interaktion mit Lipiden an der Außenseite von Vesikeln abgeschirmt. Ca<sup>2+</sup>-induzierte Bindung von t-SNARE begünstigt die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Loslösung von den Vesikel-Lipiden durch Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Bindung innerhalb der gleichen Domäne. Diese Synaptobrevin-Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Bindung wiederum wird durch die *trans* Interaktion mit Lipiden an der Innenseite der Plasmamembran abgelöst und es kommt zur Fusion der Membranen. Ob ein ähnlicher Mechanismus verantwortlich für eine Translokation des BCR in späte Endosomen ist, wäre ein interessanter Ansatzpunkt, um die Rolle von SLP-65 in Zusammenhang mit PIP-Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin genauer zu charakterisieren. Dazu könnte die Internalisierung und Sortierung von chimären Rezeptoren, welche Ig- $\alpha$ -Y204F fusioniert an SLP-65  $\Delta$ BED aufweisen, und deren Eintritt in späte Endosomen untersucht werden.

Auch das *trafficking* des BCR in Zellen, welche die weiter unten diskutierte Chimäre Syk-SLP-65 exprimieren, könnte erste Hinweise auf eine solche Funktion liefern.

## 7.2 Die Rolle der SH2-Domäne von SLP-65 bei der Rekrutierung des Ca<sup>2+</sup>-Initiationskomplexes

Die SH2-Domäne von SLP-65 ist ebenfalls für dessen Rekrutierung an die Plasmamembran essentiell (Abudula *et al.* 2007; Goldbeck 2007). Die Inaktivierung oder Deletion dieser Domäne führt zu einer reduzierten Phosphorylierung von SLP-65 und, wie ich zeigen konnte, zu einem Verlust der PLC- $\gamma$ 2 Phosphorylierung, was wiederum fehlende Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung zur Folge hat (Kapitel 6.2.1). Für die Rekrutierung wichtige Interaktionspartner der SLP-65-SH2-Domäne können nicht allein durch Lyn ausreichend phosphoryliert werden und sind wahrscheinlich Substrate von Syk oder Syk-nachgeschalteten Kinasen. Die Diskussion bekannter und noch nicht bekannter Interaktionspartner der SLP-65-SH2-Domäne erfolgt weiter unten.

### 7.2.1 BED und SH2-Domäne von SLP-65 kooperieren *in cis*.

Beide für die Membranrekrutierung essentiellen Domänen, nämlich die N-terminale BED und die C-terminale SH2-Domäne von SLP-65, kooperieren *in cis*. Eine Übersicht ist in Tabelle 7.4 gezeigt.

	<i>slp-65</i> <sup>-/-</sup>	SLP-65 wt	SLP-65 $\Delta$ BED	SLP-65 $\Delta$ SH2	SLP-65 $\Delta$ BED bei Ko- expression mit SLP-65 $\Delta$ SH2
Stimulationsinduzierte Membranrekrutierung		+++	-	-	-
Phosphorylierung der SLP-65-Variante		+++	+	+	+
PLC- $\gamma$ 2 Phosphorylierung	-	+++	-	-	n.a.
Ca <sup>2+</sup> - Mobilisierung	-	+++	-	-	-

Tab. 7.4: Kooperation von BED und SH2-Domäne von SLP-65.



Das Prinzip einer Membranassoziation über mehrere Domänen wurde schon beschrieben (McLaughlin *et al.* 2002). Oft ist nur eine Komponente nicht ausreichend, um eine Membranlokalisation des gesamten Proteins zu sichern, sondern durch mehrere Domänen wird die Lokalisation an der Membran stabilisiert, wie z. B. bei MARCKS. Umgekehrt weisen einige Proteine mehrere Membranassoziationsdomänen auf, obwohl eine allein schon die Membranlokalisation sichert. Beispiele sind die schon erwähnten Transmembranproteine EGF-Rezeptor und Synaptobrevin. Hier sollen die PIP-interagierenden Domänen die Kinasefunktion bzw. die Interaktion mit weiteren Membrankompartimenten regulieren (Quetglas *et al.* 2002; Sengupta *et al.* 2009).

Im Falle von SLP-65 kann keine der beiden Membranrekrutierungsdomänen allein das Protein an die Plasmamembran lokalisieren, denn der Verlust nur einer Domäne verhindert eine richtige Rekrutierung nach Stimulation. Weiterhin ist ein Fusionsprotein aus GFP und SLP-65-BED nicht an der Membran lokalisiert (Dr. Ingo Goldbeck, unveröffentlicht). Die *in cis* Kooperation dieser Domänen spricht für einen Mechanismus der Membranstabilisation durch mehrere Domänen auf ein und demselben Molekül. Das schließt eine zusätzliche regulatorische Funktion natürlich nicht aus. Vielmehr scheint eine solche wahrscheinlich, berücksichtigt man die Komplexität der Koordination unterschiedlicher Moleküle durch SLP-65 und im speziellen die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Bindung von Calmodulin.

### **7.2.2 Die SH2-Domäne vermittelt die Lokalisation von SLP-65 in BCR-nahe Signalmikrodomänen.**

Das Zusammenspiel der beiden Membrananker konnte durch die Analyse unterschiedlicher Chimäre genauer charakterisiert werden (zur Übersicht siehe Tabelle 7.5). Die Lokalisation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes an die Plasmamembran durch SLP-65 ist die Voraussetzung für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung in den Zellen. Im letzten Abschnitt dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine einfache Membranlokalisation die Funktion beider Membrananker, d.h. BED und SH2-Domäne, nicht ersetzen kann. Im Falle der Chimäre TIRAP-SLP-65 R468L kann keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung beobachtet werden, obwohl dieses Protein bereits in unstimulierten Zellen an der Plasmamembran lokalisiert ist (Abb. 6.27). Nur wenn eine zusätzliche Kolo-kalisation mit dem BCR ermöglicht wird, wie es bei Syk-SLP-65 wt oder Syk-SLP-65 R468L der Fall ist, kann auf die Funktion der SH2-Domäne verzichtet werden. Somit vermittelt die SH2-Domäne eine Lokalisation in die Nähe des BCR und somit in *lipid rafts*. Schon Johmura *et al.* beschrieben, dass SLP-65 auch für die *raft* Lokalisation von Vav verantwortlich ist

(Johmura *et al.* 2003). In den vorliegenden Studien konnte diese Aufgabe der SH2-Domäne von SLP-65 zugeordnet werden.

	Membranlokalisation	Stimulationsinduzierte Mikrodomänen	Ca <sup>2+</sup> -Mobilisierung
SLP-65 wt	BCR-induziert	+	+++
SLP-65 R468L	-	-	-
TIRAP- SLP-65 wt	permanent	+	+++
TIRAP- SLP-65 R468L	permanent	- / +	-
Lyn-SLP-65 wt	permanent	+	+++
Lyn-SLP-65 R468L	permanent	+	++
Syk-SLP-65 wt	BCR-induziert	+	+++
Syk-SLP-65 R468L	BCR-induziert	+	+++

**Tab. 7.5: Untersuchungen chimärer SLP-65-Varianten.**

Eine bekannter Interaktionspartner für die SH2-Domäne von SLP-65 ist Ig- $\alpha$  Untereinheit des BCR (Engels *et al.* 2001; Kabak *et al.* 2002). Chimäre, welche aus der extrazellulären Domäne von CD8 und der intrazellulären Signaleinheit von Ig- $\alpha$  bestehen, können nach Kreuzvernetzung die Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung in DT40 B-Zellen auslösen. Die Y204F-Variante, welche innerhalb der Ig- $\alpha$  Domäne einen Aminosäureaustausch des mit SLP-65 interagierenden Tyrosinrestes 204 zu Phenylalanin aufweist, wurde ebenfalls untersucht. Hier ist die Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung etwas reduziert, aber noch deutlich (Dr. Gökhan Yigit und Dr. Michael Engelke, unveröffentlichte Daten). Auch Kabak *et al.* konnten eine nur geringe Reduktion der Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung bei der Stimulation chimärer Rezeptoren mit Ig- $\alpha$  Y204F in der intrazellulären Signaleinheit feststellen (Kabak *et al.* 2002). Zwar wurde von Storch *et al.* ein nahezu vollständiger Verlust der Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung im Falle dieses Aminosäureaustausches beschrieben, jedoch handelt es sich hierbei um Studien der Pre-BCR-Signalleitung (Storch *et al.* 2007).

Ein weiterer Interaktionspartner für die SH2-Domäne von SLP-65 ist Syk (Abudula *et al.* 2007; Kulathu *et al.* 2008). In T-Zellen, welche keinen BCR und somit auch kein Ig- $\alpha$  exprimieren, kann SLP-65 die Funktion des Paralogs SLP-76 nur in Anwesenheit der Kinase Syk ersetzen. Hierbei erfüllt Syk eine Kinase-unabhängige Adapterfunktion

(Abudula *et al.* 2007). Syk selber bindet nach Stimulation an die phosphorylierten ITAM des BCR.

Der C-Terminus von Syk weist ein Motiv für die Bindung der SH2-Domäne von SLP-65 auf, nämlich YxDV. DT40-B-Zellen, welche eine C-terminal deletierte Variante von Syk exprimieren, zeigen nach BCR-Stimulation ein deutliches  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal, welches anhaltend ist. Sogenannte *add-back*-Messungen zeigen in wildtypischen DT40 eine geringe zweite  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort, welche den ER-unabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus den extrazellulären Quellen über die Plasmamembran widerspiegelt. Im Falle der Expression der deletierten Syk-Variante ist diese zweite Antwort verstärkt (hier nicht gezeigte eigene Daten). Weiterhin konnte ich zeigen, dass in T-Zellen, welche Syk mit einer inaktiven Tandem-SH2-Domäne exprimieren, keine Phosphorylierung des Proteins stattfindet. Obwohl dieses Protein nicht mehr an die ITAM von Ig- $\alpha$  binden kann, besteht weiterhin die Adapterfunktion (hier nicht gezeigt, (Abudula *et al.* 2007)). DT40-B-Zellen, welche die Syk Y630F Variante exprimieren, die keine Bindung der SH2-Domäne von SLP-65 ermöglicht (Kulathu *et al.* 2008), zeigen eine deutliche Rekrutierung von SLP-65 und  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung nach BCR-Stimulation. Die Reduktion von SLP-65-Rekrutierung und  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort nach Stimulation über CD8-Ig- $\alpha$  Y204F Chimäre ist gleich in Zellen, welche wildtypisches Syk oder Syk Y630F exprimieren (Dr. Michael Engelke, nicht veröffentlichte Daten). Zusammengefasst bedeutet dies, dass die Interaktion von SLP-65-SH2-Domäne und Syk pY<sup>630</sup> nicht an der SH2-Domäne-vermittelten Kolo-kalisation von SLP-65 und BCR beteiligt ist.

Auch HPK1 kann mit der SH2-Domäne von SLP-65 interagieren. HPK1 ist Membran-assoziiert und wird nach BCR-Stimulation phosphoryliert (Sauer *et al.* 2001; Tsuji *et al.* 2001). Bisher ist jedoch nur die Aktivierung der Kinasefunktion von HPK1 durch die Bindung mit der SH2-Domäne von SLP-65 diskutiert.

Mit einem Fusionsprotein aus GST und der SH2-Domäne von SLP-65 konnte ich mittels Affinitätspräzipitation ein phosphoryliertes, ca. 26 kDa Protein aus Zelllysaten PV-stimulierter Ramos Zellen isolieren (hier nicht gezeigte, eigene Daten). Nach BCR-Stimulation konnte dieses Protein allerdings nicht mit den verwendeten Antikörpern gegen pTyr (4G10) nachgewiesen werden. Eine Identifizierung und Charakterisierung des Proteins soll erfolgen.

Ig- $\alpha$  ist ein bekannter Interaktionspartner der SH2-Domäne von SLP-65, welcher als Untereinheit des BCR nach Stimulation in *lipid rafts* transloziert und somit die Anforderungen erfüllt (Cheng *et al.* 1999; Aman und Ravichandran 2000; Dillon *et al.* 2000; Petrie *et al.* 2000; Engels *et al.* 2001; Kabak *et al.* 2002). Dennoch kann Ig- $\alpha$  allein SLP-65 nicht in die *lipid rafts* rekrutieren. Ein oder mehrere weitere Bindungspartner, welche direkt oder indirekt mit *lipid rafts* assoziiert sind, bleiben zu identifizieren.

### **7.3 Modell zum Mechanismus der Membranrekrutierung von SLP-65 in B-Zellen**

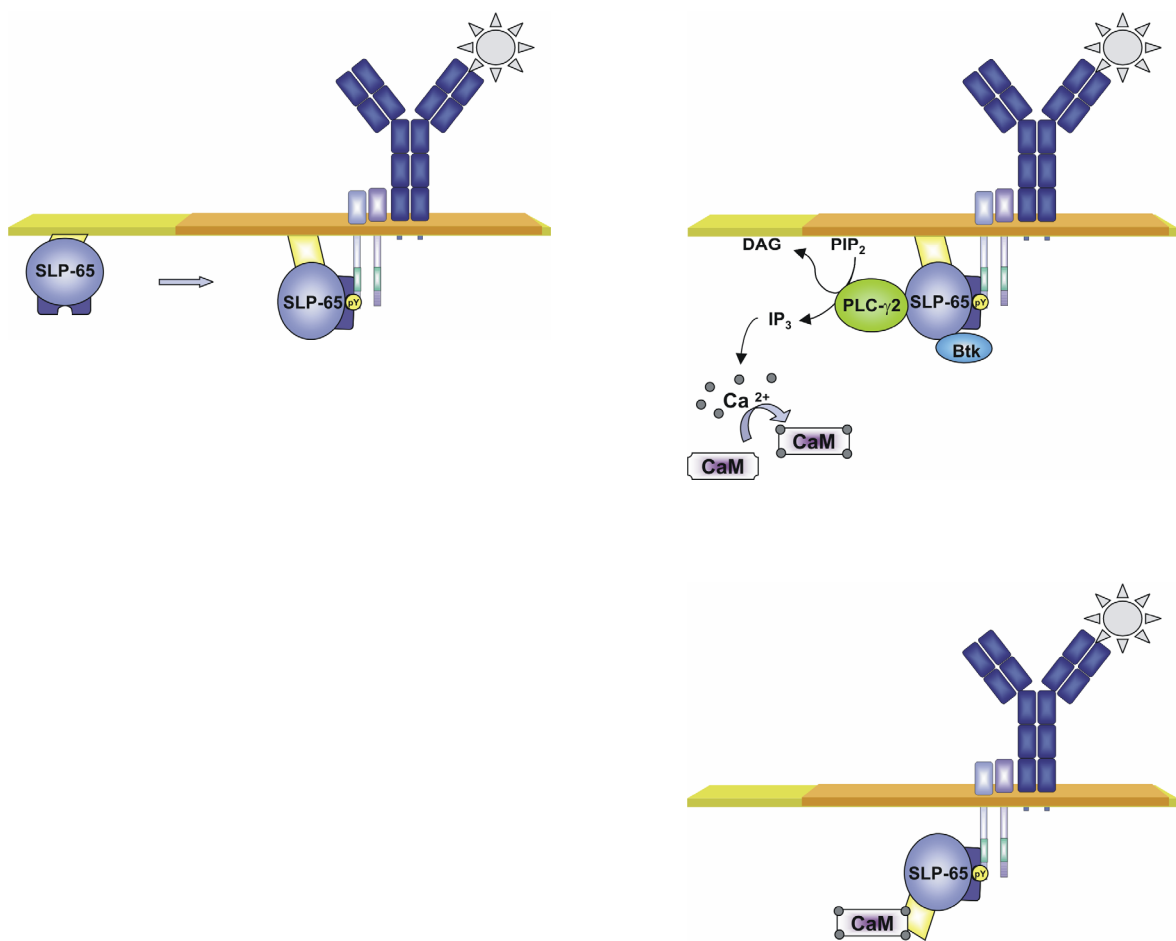
Die Rekrutierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationkomplexes an die Plasmamembran ist ein Schlüsselement der BCR-Signalleitung. Sie wird durch das Adapterprotein SLP-65 vermittelt, wobei die molekularen Mechanismen nicht völlig geklärt sind. Die hier vorgestellte Arbeit trägt substantiell zum Verständnis dieser Prozesse bei und macht erneut deutlich, dass sich die Mechanismen in B- und T-Zellen deutlich unterscheiden. In T-Zellen erfolgt die Rekrutierung des SLP-65-Paralogs SLP-76 nach TCR-Stimulation durch indirekte Bindung über Gads an das Transmembranprotein LAT (Liu *et al.* 1999). Dieses ist selber *lipid raft*-assoziiert (Brdicka *et al.* 1998; Zhang *et al.* 1998). Obwohl die Transmembranregion ausreichend ist, um LAT in der Plasmamembran zu verankern, ist die Palmitoylierung an zwei Cysteinresten essentiell, um die Signalfunktion von LAT zu gewährleisten. Diese Palmitoylierungen vermitteln die *raft*-Assoziation. In SLP-65-defizienten Zellen kann SLP-76 nur zusammen mit LAT die Signalkaskade wieder herstellen und somit SLP-65 funktionell ersetzen (Wong *et al.* 2000). In B-Zellen ist die Kolokalisation von SLP-65 und BCR in *lipid rafts* ebenfalls essentiell, wie die vorliegenden Studien zeigen. Dies unterliegt jedoch einem völlig anderen Mechanismus. Während in T-Zellen SLP-76 über die Prolin-reiche Region mit Gads interagiert und darüber an den *raft*-assoziierten Membranadapter LAT rekrutiert wird, legen die hier vorgestellten Arbeiten nahe, dass im Falle von SLP-65 in B-Zellen die *raft*-Assoziation durch die SH2-Domäne vermittelt wird. Ähnlich wie für LAT beschrieben, reicht auch im Falle von SLP-65 die einfache Membranlokalisation nicht aus.

In unstimulierten B-Zellen ist ein Teil von SLP-65-Molekülen an der Plasmamembran assoziiert (Kohler *et al.* 2005). Diese durch die SLP-65-BED vermittelte, direkte Interaktion mit PIP ist für die stimulationsinduzierte Rekrutierung von SLP-65 essentiell.

SLP-65 umfasst also zwei Komponenten, die für die Membranrekrutierung wichtig sind und lässt somit eine duale Membranassoziation vermuten. Die hier vorgestellten Studien zeigen, dass über eine einfache Stabilisation von SLP-65 an der Membran hinaus eine definierte Direktion zu Kompartimenten innerhalb der Membran, nämlich den *lipid rafts*, durch die SH2-Domäne erfolgt. Dies erklärt auch, warum beide Domänen *in cis* kooperieren müssen. Während die BED durch direkte Bindung an PIP eine initiale Lokalisation an der Membran vermittelt, sorgt die SH2-Domäne für die Translokation in die Signalmikrodomänen, wo der  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplex stabilisiert wird. Dies erfolgt teilweise über die Interaktion der SH2-Domäne mit der Ig- $\alpha$ -Untereinheit des BCR. Darüber hinaus scheint ein weiterer *lipid raft*-assoziiertes Bindungspartner für die SH2-Domäne zu existieren.

Die Rekrutierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes an die Membran resultiert in einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, was zu einer Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin an die N-terminale BED von SLP-65 führen kann. Eine Loslösung der BED von den PIP durch diese Interaktion ist denkbar. Dabei könnte die SH2-Domäne die Kollokalisierung mit dem BCR in *lipid rafts* sichern. Ob dies zur Freigabe von PIP als Bindungspartner oder Substrate für weitere Proteine führt, oder ob strukturelle Veränderungen an SLP-65 Interaktionen mit anderen Partnern regulieren wird eine der nächsten Herausforderungen im Verständnis der BCR-Signalleitung sein.

Ein Modell ist in Abbildung 7.1 vorgestellt.



**Abb. 7.1: Modell der Membranrekrutierung von SLP-65.** In unstimulierten Zellen ist SLP-65 teilweise an der Plasmamembran vorlokalisiert. Dies erfolgt über die N-terminale, basische Effektor-domäne, die mit den PIP-Bestandteilen der Plasmamembran direkt interagiert. Nach Stimulation kommt es zur Kollokalisierung mit dem BCR in *lipid rafts* (braun). Dies wird durch die SH2-Domäne von SLP-65 vermittelt. Eine Möglichkeit ist die Interaktion mit Ig- $\alpha$  über dessen  $\text{pY}^{204}$  (gelber Kreis). So erfolgt eine Stabilisation von SLP-65 und damit des  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes in *lipid rafts*, PLC- $\gamma$ 2 kann aktiviert werden und die *second messenger*  $\text{IP}_3$  und DAG generieren.  $\text{IP}_3$  initiiert die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ . Calciumionen binden an Calmodulin (CaM), welches dann wieder mit der BED von SLP-65 interagieren und diese von der Membran lösen kann.

Die hier vorgestellten Studien tragen substantiell zur Charakterisierung der Membranrekrutierung von SLP-65 bei, denn sie schließen den im basischen N-Terminus identifizierten Leucin-Zipper für die Funktion der Membranlokalisation aus. Stattdessen liefern sie Hinweise für eine direkte Interaktion dieser basischen Effektor-domäne mit der Plasmamembran durch die Bindung an Phosphatidylinositolphosphate. Dennoch kann die BED alleine nicht die Membranlokalisation von SLP-65 bestimmen, sondern kooperiert mit der SH2-Domäne zur korrekten Translokation. Damit SLP-65 seine Funktion ausüben kann, reicht eine einfache Verknüpfung mit der Plasmamembran nicht aus. Für eine intakte Signalweiterleitung ist vielmehr die Navigation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationkomplexes in BCR-nahe Signalmikrodomänen innerhalb der Plasmamembran erforderlich. Wie die beschriebenen Ergebnisse zeigen, erfolgt diese spezifische Direktion durch die SH2-Domäne von SLP-65.

Die subzelluläre Organisation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes durch das Adapterprotein SLP-65 unterliegt offensichtlich komplexen Mechanismen und erfordert das Zusammenspiel unterschiedlicher Domänen. Um diese vollständig zu verstehen, wäre die Aufklärung der Proteinstruktur von SLP-65 wichtig. Bisher konnte das Protein jedoch nicht kristallisiert werden, so dass eine Röntgenstrukturanalyse nicht möglich war. In einer Kooperation soll nun die Strukturanalyse mittels NMR erfolgen. Die Entschlüsselung der Proteinstruktur würde erheblich zum Verständnis der Adapterfunktion von SLP-65 und dessen Rolle als Tumorsuppressor beitragen. Darüber hinaus könnten Zielstrukturen für mögliche pharmakologische Substanzen offenbart werden, um die SLP-65-Funktion gezielt zu regulieren.

## 8 Literatur

- Abudula, A., A. Grabbe, M. Brechmann, C. Polaschegg, N. Herrmann, I. Goldbeck, K. Dittmann and J. Wienands (2007). "SLP-65 signal transduction requires Src homology 2 domain-mediated membrane anchoring and a kinase-independent adaptor function of Syk." J Biol Chem **282**(39): 29059-66.
- Aiba, Y., M. Oh-hora, S. Kiyonaka, Y. Kimura, A. Hijikata, Y. Mori and T. Kurosaki (2004). "Activation of RasGRP3 by phosphorylation of Thr-133 is required for B cell receptor-mediated Ras activation." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(47): 16612-7.
- Aman, M. J. and K. S. Ravichandran (2000). "A requirement for lipid rafts in B cell receptor induced Ca(2+) flux." Curr Biol **10**(7): 393-6.
- Arcaro, A. and M. P. Wymann (1993). "Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses." Biochem J **296** (Pt 2): 297-301.
- Baba, T. W. and E. H. Humphries (1984). "Differential response to avian leukosis virus infection exhibited by two chicken lines." Virology **135**(1): 181-8.
- Baba, Y., S. Hashimoto, M. Matsushita, D. Watanabe, T. Kishimoto, T. Kurosaki and S. Tsukada (2001). "BLNK mediates Syk-dependent Btk activation." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(5): 2582-6.
- Baba, Y., K. Hayashi, Y. Fujii, A. Mizushima, H. Watarai, M. Wakamori, T. Numaga, Y. Mori, M. Iino, M. Hikida and T. Kurosaki (2006). "Coupling of STIM1 to store-operated Ca<sup>2+</sup> entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(45): 16704-9.
- Balla, T. (2005). "Inositol-lipid binding motifs: signal integrators through protein-lipid and protein-protein interactions." J Cell Sci **118**(Pt 10): 2093-104.
- Beaulieu, N., B. Zahedi, R. E. Goulding, G. Tazmini, K. V. Anthony, S. L. Omeis, D. R. de Jong and R. J. Kay (2007). "Regulation of RasGRP1 by B cell antigen receptor requires cooperativity between three domains controlling translocation to the plasma membrane." Mol Biol Cell **18**(8): 3156-68.
- Benguria, A., O. Hernandez-Perera, M. T. Martinez-Pastor, D. B. Sacks and A. Villalobo (1994). "Phosphorylation of calmodulin by the epidermal-growth-factor-receptor tyrosine kinase." Eur J Biochem **224**(3): 909-16.
- Bethoney, K. A., M. C. King, J. E. Hinshaw, E. M. Ostap and M. A. Lemmon (2009). "A possible effector role for the pleckstrin homology (PH) domain of dynamin." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(32): 13359-64.
- Bolland, S., R. N. Pearce, T. Kurosaki and J. V. Ravetch (1998). "SHIP modulates immune receptor responses by regulating membrane association of Btk." Immunity **8**(4): 509-16.
- Bonilla, F. A., R. M. Fujita, V. I. Pivniouk, A. C. Chan and R. S. Geha (2000). "Adapter proteins SLP-76 and BLNK both are expressed by murine macrophages and are linked to signaling via Fcγ receptors I and II/III." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(4): 1725-30.

- Bradl, H. and H. M. Jack (2001). "Surrogate light chain-mediated interaction of a soluble pre-B cell receptor with adherent cell lines." J Immunol **167**(11): 6403-11.
- Brdicka, T., J. Cerny and V. Horejsi (1998). "T cell receptor signalling results in rapid tyrosine phosphorylation of the linker protein LAT present in detergent-resistant membrane microdomains." Biochem Biophys Res Commun **248**(2): 356-60.
- Brdicka, T., M. Imrich, P. Angelisova, N. Brdickova, O. Horvath, J. Spicka, I. Hilgert, P. Luskova, P. Draber, P. Novak, N. Engels, J. Wienands, L. Simeoni, J. Osterreicher, E. Aguado, M. Malissen, B. Schraven and V. Horejsi (2002). "Non-T cell activation linker (NTAL): A transmembrane adaptor protein involved in immunoreceptor signaling." Journal of Experimental Medicine **196**(12): 1617-1626.
- Bubeck Wardenburg, J., C. Fu, J. K. Jackman, H. Flotow, S. E. Wilkinson, D. H. Williams, R. Johnson, G. Kong, A. C. Chan and P. R. Findell (1996). "Phosphorylation of SLP-76 by the ZAP-70 protein-tyrosine kinase is required for T-cell receptor function." J Biol Chem **271**(33): 19641-4.
- Bunnell, S. C., M. Diehn, M. B. Yaffe, P. R. Findell, L. C. Cantley and L. J. Berg (2000). "Biochemical interactions integrating Itk with the T cell receptor-initiated signaling cascade." J Biol Chem **275**(3): 2219-30.
- Burkhardt, A. L., M. Brunswick, J. B. Bolen and J. J. Mond (1991). "Anti-immunoglobulin stimulation of B lymphocytes activates src-related protein-tyrosine kinases." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(16): 7410-4.
- Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." Anal Biochem **112**(2): 195-203.
- Campbell, K. S. and J. C. Cambier (1990). "B lymphocyte antigen receptors (mlg) are non-covalently associated with a disulfide linked, inducibly phosphorylated glycoprotein complex." Embo J **9**(2): 441-8.
- Cao, M. Y., D. Davidson, J. Yu, S. Latour and A. Veillette (1999). "Clnk, a novel SLP-76-related adaptor molecule expressed in cytokine-stimulated hemopoietic cells." J Exp Med **190**(10): 1527-34.
- Cheng, P. C., M. L. Dykstra, R. N. Mitchell and S. K. Pierce (1999). "A role for lipid rafts in B cell antigen receptor signaling and antigen targeting." J Exp Med **190**(11): 1549-60.
- Chiu, C. W., M. Dalton, M. Ishiai, T. Kurosaki and A. C. Chan (2002). "BLNK: molecular scaffolding through 'cis'-mediated organization of signaling proteins." Embo J **21**(23): 6461-72.
- Choi, M. S., R. D. Brines, M. J. Holman and G. G. Klaus (1994). "Induction of NF-AT in normal B lymphocytes by anti-immunoglobulin or CD40 ligand in conjunction with IL-4." Immunity **1**(3): 179-87.
- Clark, M. R., D. Massenburg, M. Zhang and K. Siemasko (2003). "Molecular mechanisms of B cell antigen receptor trafficking." Ann N Y Acad Sci **987**: 26-37.
- Cornall, R. J., C. C. Goodnow and J. G. Cyster (1995). "The regulation of self-reactive B cells." Curr Opin Immunol **7**(6): 804-11.



- Corti, C., E. Leclerc L'Hostis, M. Quadroni, H. Schmid, I. Durussel, J. Cox, P. Dainese Hatt, P. James and E. Carafoli (1999). "Tyrosine phosphorylation modulates the interaction of calmodulin with its target proteins." Eur J Biochem **262**(3): 790-802.
- Deppmann, C. D., R. S. Alvania and E. J. Taparowsky (2006). "Cross-species annotation of basic leucine zipper factor interactions: Insight into the evolution of closed interaction networks." Mol Biol Evol **23**(8): 1480-92.
- Dillon, S. R., M. Mancini, A. Rosen and M. S. Schlissel (2000). "Annexin V binds to viable B cells and colocalizes with a marker of lipid rafts upon B cell receptor activation." J Immunol **164**(3): 1322-32.
- Dong, B., C. A. Valencia and R. Liu (2007). "Ca(2+)/calmodulin directly interacts with the pleckstrin homology domain of AKT1." J Biol Chem **282**(34): 25131-40.
- Engelke, M., N. Engels, K. Dittmann, B. Stork and J. Wienands (2007). "Ca(2+) signaling in antigen receptor-activated B lymphocytes." Immunol Rev **218**: 235-46.
- Engels, N., B. Wollscheid and J. Wienands (2001). "Association of SLP-65/BLNK with the B cell antigen receptor through a non-ITAM tyrosine of Ig-alpha." Eur J Immunol **31**(7): 2126-34.
- Falasca, M., S. K. Logan, V. P. Lehto, G. Baccante, M. A. Lemmon and J. Schlessinger (1998). "Activation of phospholipase C gamma by PI 3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting." Embo J **17**(2): 414-22.
- Ferguson, K. M., M. A. Lemmon, J. Schlessinger and P. B. Sigler (1995). "Structure of the high affinity complex of inositol trisphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain." Cell **83**(6): 1037-46.
- Ferrell, J. E., Jr. and W. H. Huestis (1984). "Phosphoinositide metabolism and the morphology of human erythrocytes." J Cell Biol **98**(6): 1992-8.
- Filippov, A., G. Oradd and G. Lindblom (2007). "Domain formation in model membranes studied by pulsed-field gradient-NMR: the role of lipid polyunsaturation." Biophys J **93**(9): 3182-90.
- Flaswinkel, H. and M. Reth (1994). "Dual role of the tyrosine activation motif of the Ig-alpha protein during signal transduction via the B cell antigen receptor." Embo J **13**(1): 83-9.
- Flemming, A., T. Brummer, M. Reth and H. Jumaa (2003). "The adaptor protein SLP-65 acts as a tumor suppressor that limits pre-B cell expansion." Nat Immunol **4**(1): 38-43.
- Ford, M. G., I. G. Mills, B. J. Peter, Y. Vallis, G. J. Praefcke, P. R. Evans and H. T. McMahon (2002). "Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin." Nature **419**(6905): 361-6.
- Fu, C. and A. C. Chan (1997). "Identification of two tyrosine phosphoproteins, pp70 and pp68, which interact with phospholipase Cgamma, Grb2, and Vav after B cell antigen receptor activation." J Biol Chem **272**(43): 27362-8.
- Fu, C., C. W. Turck, T. Kurosaki and A. C. Chan (1998). "BLNK: a central linker protein in B cell activation." Immunity **9**(1): 93-103.

- Fukuda, M., T. Kojima, H. Kabayama and K. Mikoshiba (1996). "Mutation of the pleckstrin homology domain of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficiency impaired inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate binding capacity." J Biol Chem **271**(48): 30303-6.
- Futterer, K., J. Wong, R. A. Grucza, A. C. Chan and G. Waksman (1998). "Structural basis for Syk tyrosine kinase ubiquity in signal transduction pathways revealed by the crystal structure of its regulatory SH2 domains bound to a dually phosphorylated ITAM peptide." J Mol Biol **281**(3): 523-37.
- Garcia, P., R. Gupta, S. Shah, A. J. Morris, S. A. Rudge, S. Scarlata, V. Petrova, S. McLaughlin and M. J. Rebecchi (1995). "The pleckstrin homology domain of phospholipase C-delta 1 binds with high affinity to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in bilayer membranes." Biochemistry **34**(49): 16228-34.
- Gauthier, L., B. Rossi, F. Roux, E. Termine and C. Schiff (2002). "Galectin-1 is a stromal cell ligand of the pre-B cell receptor (BCR) implicated in synapse formation between pre-B and stromal cells and in pre-BCR triggering." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(20): 13014-9.
- Goitsuka, R., Y. Fujimura, H. Mamada, A. Umeda, T. Morimura, K. Uetsuka, K. Doi, S. Tsuji and D. Kitamura (1998). "BASH, a novel signaling molecule preferentially expressed in B cells of the bursa of Fabricius." J Immunol **161**(11): 5804-8.
- Goitsuka, R., H. Kanazashi, H. Sasanuma, Y. Fujimura, Y. Hidaka, A. Tatsuno, C. Ra, K. Hayashi and D. Kitamura (2000). "A BASH/SLP-76-related adaptor protein MIST/Clnk involved in IgE receptor-mediated mast cell degranulation." Int Immunol **12**(4): 573-80.
- Gold, M. R. and R. Aebersold (1994). "Both phosphatidylinositol 3-kinase and phosphatidylinositol 4-kinase products are increased by antigen receptor signaling in B cells." J Immunol **152**(1): 42-50.
- Goldbeck, I. (2007). Studien zur subzellulären Navigation von Signalmolekülen der Ca<sup>2+</sup>-Antwort in aktivierten B-Lymphocyten. Fakultät für Chemie. Bielefeld, Universität Bielefeld. **Dr. rer. nat.:** 131.
- Grabbe, A. (2005). Studien zur molekularen Kommunikation des Adapterproteins SLP-65 mit anderen Signalmolekülen in B-Lymphocyten. Fakultät für Chemie. Bielefeld, Universität Bielefeld. **Dr. rer. nat.:** 135.
- Grabbe, A. and J. Wienands (2006). "Human SLP-65 isoforms contribute differently to activation and apoptosis of B lymphocytes." Blood **108**(12): 3761-8.
- Guo, B., R. M. Kato, M. Garcia-Lloret, M. I. Wahl and D. J. Rawlings (2000). "Engagement of the human pre-B cell receptor generates a lipid raft-dependent calcium signaling complex." Immunity **13**(2): 243-53.
- Gupta, N. and A. L. DeFranco (2003). "Visualizing lipid raft dynamics and early signaling events during antigen receptor-mediated B-lymphocyte activation." Mol Biol Cell **14**(2): 432-44.
- Gupta, N. and A. L. DeFranco (2007). "Lipid rafts and B cell signaling." Semin Cell Dev Biol **18**(5): 616-26.

- Halet, G. (2005). "Imaging phosphoinositide dynamics using GFP-tagged protein domains." Biol Cell **97**(7): 501-18.
- Hashimoto, S., A. Iwamatsu, M. Ishiai, K. Okawa, T. Yamadori, M. Matsushita, Y. Baba, T. Kishimoto, T. Kurosaki and S. Tsukada (1999). "Identification of the SH2 domain binding protein of Bruton's tyrosine kinase as BLNK--functional significance of Btk-SH2 domain in B-cell antigen receptor-coupled calcium signaling." Blood **94**(7): 2357-64.
- Hayashi, K., R. Nittono, N. Okamoto, S. Tsuji, Y. Hara, R. Goitsuka and D. Kitamura (2000). "The B cell-restricted adaptor BASH is required for normal development and antigen receptor-mediated activation of B cells." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(6): 2755-60.
- Hombach, J., F. Sablitzky, K. Rajewsky and M. Reth (1988). "Transfected plasmacytoma cells do not transport the membrane form of IgM to the cell surface." J Exp Med **167**(2): 652-7.
- Hombach, J., T. Tsubata, L. Leclercq, H. Stappert and M. Reth (1990). "Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class." Nature **343**(6260): 760-2.
- Hook, S. S. and A. R. Means (2001). "Ca(2+)/CaM-dependent kinases: from activation to function." Annu Rev Pharmacol Toxicol **41**: 471-505.
- Hope, H. R. and L. J. Pike (1996). "Phosphoinositides and phosphoinositide-utilizing enzymes in detergent-insoluble lipid domains." Mol Biol Cell **7**(6): 843-51.
- Hurley, J. H. (2006). "Membrane binding domains." Biochim Biophys Acta **1761**(8): 805-11.
- Ishiai, M., M. Kurosaki, R. Pappu, K. Okawa, I. Ronko, C. Fu, M. Shibata, A. Iwamatsu, A. C. Chan and T. Kurosaki (1999). "BLNK required for coupling Syk to PLC gamma 2 and Rac1-JNK in B cells." Immunity **10**(1): 117-25.
- Ishiai, M., H. Sugawara, M. Kurosaki and T. Kurosaki (1999). "Cutting edge: association of phospholipase C-gamma 2 Src homology 2 domains with BLNK is critical for B cell antigen receptor signaling." J Immunol **163**(4): 1746-9.
- Ivetac, I., A. D. Munday, M. V. Kisseleva, X. M. Zhang, S. Luff, T. Tiganis, J. C. Whisstock, T. Rowe, P. W. Majerus and C. A. Mitchell (2005). "The type I alpha inositol polyphosphate 4-phosphatase generates and terminates phosphoinositide 3-kinase signals on endosomes and the plasma membrane." Mol Biol Cell **16**(5): 2218-33.
- Jackman, J. K., D. G. Motto, Q. Sun, M. Tanemoto, C. W. Turck, G. A. Peltz, G. A. Koretzky and P. R. Findell (1995). "Molecular cloning of SLP-76, a 76-kDa tyrosine phosphoprotein associated with Grb2 in T cells." J Biol Chem **270**(13): 7029-32.
- Johmura, S., M. Oh-hora, K. Inabe, Y. Nishikawa, K. Hayashi, E. Vigorito, D. Kitamura, M. Turner, K. Shingu, M. Hikida and T. Kurosaki (2003). "Regulation of Vav localization in membrane rafts by adaptor molecules Grb2 and BLNK." Immunity **18**(6): 777-87.

- Johnson, J. E., R. E. Goulding, Z. Ding, A. Partovi, K. V. Anthony, N. Beaulieu, G. Tazmini, R. B. Cornell and R. J. Kay (2007). "Differential membrane binding and diacylglycerol recognition by C1 domains of RasGRPs." Biochem J **406**(2): 223-36.
- Johnson, S. A., C. M. Pleiman, L. Pao, J. Schneringer, K. Hippen and J. C. Cambier (1995). "Phosphorylated immunoreceptor signaling motifs (ITAMs) exhibit unique abilities to bind and activate Lyn and Syk tyrosine kinases." J Immunol **155**(10): 4596-603.
- Joyal, J. L., D. L. Crimmins, R. S. Thoma and D. B. Sacks (1996). "Identification of insulin-stimulated phosphorylation sites on calmodulin." Biochemistry **35**(20): 6267-75.
- Joyal, J. L. and D. B. Sacks (1994). "Insulin-dependent phosphorylation of calmodulin in rat hepatocytes." J Biol Chem **269**(47): 30039-48.
- Jumaa, H., L. Bossaller, K. Portugal, B. Storch, M. Lotz, A. Flemming, M. Schrappe, V. Postila, P. Rikonen, J. Pelkonen, C. M. Niemeyer and M. Reth (2003). "Deficiency of the adaptor SLP-65 in pre-B-cell acute lymphoblastic leukaemia." Nature **423**(6938): 452-6.
- Jumaa, H., B. Wollscheid, M. Mitterer, J. Wienands, M. Reth and P. J. Nielsen (1999). "Abnormal development and function of B lymphocytes in mice deficient for the signaling adaptor protein SLP-65." Immunity **11**(5): 547-54.
- Kabak, S., B. J. Skaggs, M. R. Gold, M. Affolter, K. L. West, M. S. Foster, K. Siemasko, A. C. Chan, R. Aebersold and M. R. Clark (2002). "The direct recruitment of BLNK to immunoglobulin alpha couples the B-cell antigen receptor to distal signaling pathways." Mol Cell Biol **22**(8): 2524-35.
- Kagan, J. C. and R. Medzhitov (2006). "Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling." Cell **125**(5): 943-55.
- Kersseboom, R., S. Middendorp, G. M. Dingjan, K. Dahlenborg, M. Reth, H. Jumaa and R. W. Hendriks (2003). "Bruton's tyrosine kinase cooperates with the B cell linker protein SLP-65 as a tumor suppressor in Pre-B cells." J Exp Med **198**(1): 91-8.
- Khan, W. N., F. W. Alt, R. M. Gerstein, B. A. Malynn, I. Larsson, G. Rathbun, L. Davidson, S. Muller, A. B. Kantor, L. A. Herzenberg and et al. (1995). "Defective B cell development and function in Btk-deficient mice." Immunity **3**(3): 283-99.
- Kim, J., T. Shishido, X. Jiang, A. Aderem and S. McLaughlin (1994). "Phosphorylation, high ionic strength, and calmodulin reverse the binding of MARCKS to phospholipid vesicles." J Biol Chem **269**(45): 28214-9.
- Kim, Y. J., F. Sekiya, B. Poulin, Y. S. Bae and S. G. Rhee (2004). "Mechanism of B-cell receptor-induced phosphorylation and activation of phospholipase C-gamma2." Mol Cell Biol **24**(22): 9986-99.
- Kimura, T., H. Sakamoto, E. Appella and R. P. Siraganian (1996). "Conformational changes induced in the protein tyrosine kinase p72syk by tyrosine phosphorylation or by binding of phosphorylated immunoreceptor tyrosine-based activation motif peptides." Mol Cell Biol **16**(4): 1471-8.
- Klee, C. B., H. Ren and X. Wang (1998). "Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin." J Biol Chem **273**(22): 13367-70.

- Klein, G., B. Giovanella, A. Westman, J. S. Stehlin and D. Mumford (1975). "An EBV-genome-negative cell line established from an American Burkitt lymphoma; receptor characteristics. EBV infectibility and permanent conversion into EBV-positive sublines by in vitro infection." Intervirology **5**(6): 319-34.
- Kohler, F., B. Storch, Y. Kulathu, S. Herzog, S. Kuppig, M. Reth and H. Jumaa (2005). "A leucine zipper in the N terminus confers membrane association to SLP-65." Nat Immunol **6**(2): 204-10.
- Koretzky, G. A., F. Abtahian and M. A. Silverman (2006). "SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond." Nat Rev Immunol **6**(1): 67-78.
- Kovarova, M., P. Tolar, R. Arudchandran, L. Draberova, J. Rivera and P. Draber (2001). "Structure-function analysis of Lyn kinase association with lipid rafts and initiation of early signaling events after Fcepsilon receptor I aggregation." Mol Cell Biol **21**(24): 8318-28.
- Kulathu, Y., E. Hobeika, G. Turchinovich and M. Reth (2008). "The kinase Syk as an adaptor controlling sustained calcium signalling and B-cell development." Embo J **27**(9): 1333-44.
- Kurosaki, T., S. A. Johnson, L. Pao, K. Sada, H. Yamamura and J. C. Cambier (1995). "Role of the Syk autophosphorylation site and SH2 domains in B cell antigen receptor signaling." J Exp Med **182**(6): 1815-23.
- Kurosaki, T. and M. Kurosaki (1997). "Transphosphorylation of Bruton's tyrosine kinase on tyrosine 551 is critical for B cell antigen receptor function." J Biol Chem **272**(25): 15595-8.
- Kurosaki, T., A. Maeda, M. Ishiai, A. Hashimoto, K. Inabe and M. Takata (2000). "Regulation of the phospholipase C-gamma2 pathway in B cells." Immunol Rev **176**: 19-29.
- Kurosaki, T., M. Takata, Y. Yamanashi, T. Inazu, T. Taniguchi, T. Yamamoto and H. Yamamura (1994). "Syk activation by the Src-family tyrosine kinase in the B cell receptor signaling." J Exp Med **179**(5): 1725-9.
- Kurosaki, T. and S. Tsukada (2000). "BLNK: connecting Syk and Btk to calcium signals." Immunity **12**(1): 1-5.
- Kutateladze, T. G., K. D. Ogburn, W. T. Watson, T. de Beer, S. D. Emr, C. G. Burd and M. Overduin (1999). "Phosphatidylinositol 3-phosphate recognition by the FYVE domain." Mol Cell **3**(6): 805-11.
- Kwon, Y., T. Hofmann and C. Montell (2007). "Integration of phosphoinositide- and calmodulin-mediated regulation of TRPC6." Mol Cell **25**(4): 491-503.
- Landschulz, W. H., P. F. Johnson and S. L. McKnight (1988). "The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins." Science **240**(4860): 1759-64.
- Leclerc, E., C. Corti, H. Schmid, S. Vetter, P. James and E. Carafoli (1999). "Serine/threonine phosphorylation of calmodulin modulates its interaction with the binding domains of target enzymes." Biochem J **344 Pt 2**: 403-11.
- Lemmon, M. A. (2003). "Phosphoinositide recognition domains." Traffic **4**(4): 201-13.

- Lemmon, M. A., K. M. Ferguson, R. O'Brien, P. B. Sigler and J. Schlessinger (1995). "Specific and high-affinity binding of inositol phosphates to an isolated pleckstrin homology domain." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(23): 10472-6.
- Leo, A., J. Wienands, G. Baier, V. Horejsi and B. Schraven (2002). "Adapters in lymphocyte signaling." J Clin Invest **109**(3): 301-9.
- Levitan, I. B. (1999). "It is calmodulin after all! Mediator of the calcium modulation of multiple ion channels." Neuron **22**(4): 645-8.
- Liu, Q., D. Berry, P. Nash, T. Pawson, C. J. McGlade and S. S. Li (2003). "Structural basis for specific binding of the Gads SH3 domain to an RxxK motif-containing SLP-76 peptide: a novel mode of peptide recognition." Mol Cell **11**(2): 471-81.
- Liu, S. K., N. Fang, G. A. Koretzky and C. J. McGlade (1999). "The hematopoietic-specific adaptor protein gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors." Curr Biol **9**(2): 67-75.
- Liu, S. K., N. Fang, G. A. Koretzky and C. J. McGlade (1999). "The hematopoietic-specific adaptor protein Gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors." Current Biology **9**(2): 67-75.
- Lupas, A., M. Van Dyke and J. Stock (1991). "Predicting coiled coils from protein sequences." Science **252**(5009): 1162-1164.
- Matsuoka, Y., C. A. Hughes and V. Bennett (1996). "Adducin regulation. Definition of the calmodulin-binding domain and sites of phosphorylation by protein kinases A and C." J Biol Chem **271**(41): 25157-66.
- McIlroy, B. K., J. D. Walters, P. J. Blackshear and J. D. Johnson (1991). "Phosphorylation-dependent binding of a synthetic MARCKS peptide to calmodulin." J Biol Chem **266**(8): 4959-64.
- McLaughlin, S., G. Hangyas-Mihalyne, I. Zaitseva and U. Golebiewska (2005). "Reversible - through calmodulin - electrostatic interactions between basic residues on proteins and acidic lipids in the plasma membrane." Biochem Soc Symp(72): 189-98.
- McLaughlin, S. and D. Murray (2005). "Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics." Nature **438**(7068): 605-11.
- McLaughlin, S., J. Wang, A. Gambhir and D. Murray (2002). "PIP(2) and proteins: interactions, organization, and information flow." Annu Rev Biophys Biomol Struct **31**: 151-75.
- Minegishi, Y., J. Rohrer, E. Coustan-Smith, H. M. Lederman, R. Pappu, D. Campana, A. C. Chan and M. E. Conley (1999). "An essential role for BLNK in human B cell development." Science **286**(5446): 1954-7.
- Misra, S. and J. H. Hurley (1999). "Crystal structure of a phosphatidylinositol 3-phosphate-specific membrane-targeting motif, the FYVE domain of Vps27p." Cell **97**(5): 657-66.
- Morita, S., T. Kojima and T. Kitamura (2000). "Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses." Gene Ther **7**(12): 1063-6.

- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich (1992). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986." Biotechnology **24**: 17-27.
- Neuberger, M. S., K. J. Patel, P. Dariavach, K. Nelms, C. J. Peaker and G. T. Williams (1993). "The mouse B-cell antigen receptor: definition and assembly of the core receptor of the five immunoglobulin isotypes." Immunol Rev **132**: 147-61.
- Newton, A. C. (1995). "Protein kinase C: structure, function, and regulation." J Biol Chem **270**(48): 28495-8.
- Niu, S. L. and B. J. Litman (2002). "Determination of membrane cholesterol partition coefficient using a lipid vesicle-cyclodextrin binary system: effect of phospholipid acyl chain unsaturation and headgroup composition." Biophys J **83**(6): 3408-15.
- Oellerich, T., M. Gronborg, K. Neumann, H. H. Hsiao, H. Urlaub and J. Wienands (2009). "SLP-65 phosphorylation dynamics reveals a functional basis for signal integration by receptor-proximal adaptor proteins." Mol Cell Proteomics.
- Oh-Hora, M., S. Johmura, A. Hashimoto, M. Hikida and T. Kurosaki (2003). "Requirement for Ras guanine nucleotide releasing protein 3 in coupling phospholipase C-gamma 2 to Ras in B cell receptor signaling." Journal of Experimental Medicine **198**(12): 1841-1851.
- Pappu, R., A. M. Cheng, B. Li, Q. Gong, C. Chiu, N. Griffin, M. White, B. P. Sleckman and A. C. Chan (1999). "Requirement for B cell linker protein (BLNK) in B cell development." Science **286**(5446): 1949-54.
- Patterson, H. C., M. Kraus, Y. M. Kim, H. Ploegh and K. Rajewsky (2006). "The B cell receptor promotes B cell activation and proliferation through a non-ITAM tyrosine in the Igalpha cytoplasmic domain." Immunity **25**(1): 55-65.
- Patterson, R. L., D. Boehning and S. H. Snyder (2004). "Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors as signal integrators." Annu Rev Biochem **73**: 437-65.
- Payraastre, B., K. Missy, S. Giuriato, S. Bodin, M. Plantavid and M. Gratacap (2001). "Phosphoinositides: key players in cell signalling, in time and space." Cell Signal **13**(6): 377-87.
- Petrie, R. J., P. P. Schnetkamp, K. D. Patel, M. Awasthi-Kalia and J. P. Deans (2000). "Transient translocation of the B cell receptor and Src homology 2 domain-containing inositol phosphatase to lipid rafts: evidence toward a role in calcium regulation." J Immunol **165**(3): 1220-7.
- Pike, L. J. (2006). "Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function." J Lipid Res **47**(7): 1597-8.
- Quetglas, S., C. Iborra, N. Sasakawa, L. De Haro, K. Kumakura, K. Sato, C. Leveque and M. Seagar (2002). "Calmodulin and lipid binding to synaptobrevin regulates calcium-dependent exocytosis." Embo J **21**(15): 3970-9.
- Quetglas, S., C. Leveque, R. Miquelis, K. Sato and M. Seagar (2000). "Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of synaptic SNARE complex assembly via a calmodulin- and phospholipid-binding domain of synaptobrevin." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(17): 9695-700.

- Rameh, L. E., A. Arvidsson, K. L. Carraway, 3rd, A. D. Couvillon, G. Rathbun, A. Crompton, B. VanRenterghem, M. P. Czech, K. S. Ravichandran, S. J. Burakoff, D. S. Wang, C. S. Chen and L. C. Cantley (1997). "A comparative analysis of the phosphoinositide binding specificity of pleckstrin homology domains." J Biol Chem **272**(35): 22059-66.
- Rawlings, D. J., A. M. Scharenberg, H. Park, M. I. Wahl, S. Lin, R. M. Kato, A. C. Fluckiger, O. N. Witte and J. P. Kinet (1996). "Activation of BTK by a phosphorylation mechanism initiated by SRC family kinases." Science **271**(5250): 822-5.
- Reichlin, A., Y. Hu, E. Meffre, H. Nagaoka, S. Gong, M. Kraus, K. Rajewsky and M. C. Nussenzweig (2001). "B cell development is arrested at the immature B cell stage in mice carrying a mutation in the cytoplasmic domain of immunoglobulin beta." J Exp Med **193**(1): 13-23.
- Reth, M. (1992). "Antigen receptors on B lymphocytes." Annu Rev Immunol **10**: 97-121.
- Reth, M., J. Hombach, J. Wienands, K. S. Campbell, N. Chien, L. B. Justement and J. C. Cambier (1991). "The B-cell antigen receptor complex." Immunol Today **12**(6): 196-201.
- Reth, M. and J. Wienands (1997). "Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor." Annu Rev Immunol **15**: 453-79.
- Rhoads, A. R. and F. Friedberg (1997). "Sequence motifs for calmodulin recognition." Faseb J **11**(5): 331-40.
- Rolink, A. G., E. ten Boekel, T. Yamagami, R. Ceredig, J. Andersson and F. Melchers (1999). "B cell development in the mouse from early progenitors to mature B cells." Immunol Lett **68**(1): 89-93.
- Rolink, A. G., T. Winkler, F. Melchers and J. Andersson (2000). "Precursor B cell receptor-dependent B cell proliferation and differentiation does not require the bone marrow or fetal liver environment." J Exp Med **191**(1): 23-32.
- Sacks, D. B., H. W. Davis, D. L. Crimmins and J. M. McDonald (1992). "Insulin-stimulated phosphorylation of calmodulin." Biochem J **286** (Pt 1): 211-6.
- Saijo, K., I. Mecklenbrauker, A. Santana, M. Leitger, C. Schmedt and A. Tarakhovsky (2002). "Protein kinase C beta controls nuclear factor kappaB activation in B cells through selective regulation of the I kappaB kinase alpha." J Exp Med **195**(12): 1647-52.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-91.
- Sanchez, M., Z. Misulovin, A. L. Burkhardt, S. Mahajan, T. Costa, R. Franke, J. B. Bolen and M. Nussenzweig (1993). "Signal transduction by immunoglobulin is mediated through Ig alpha and Ig beta." J Exp Med **178**(3): 1049-55.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.



- Sauer, K., J. Liou, S. B. Singh, D. Yablonski, A. Weiss and R. M. Perlmutter (2001). "Hematopoietic progenitor kinase 1 associates physically and functionally with the adaptor proteins B cell linker protein and SLP-76 in lymphocytes." J Biol Chem **276**(48): 45207-16.
- Schatz, D. G., M. A. Oettinger and M. S. Schlissel (1992). "V(D)J recombination: molecular biology and regulation." Annu Rev Immunol **10**: 359-83.
- Sefton, B. M. and M. A. Campbell (1991). "The role of tyrosine protein phosphorylation in lymphocyte activation." Annu Rev Cell Biol **7**: 257-74.
- Sengupta, P., E. Bosis, E. Nachliel, M. Gutman, S. O. Smith, G. Mihalyne, I. Zaitseva and S. McLaughlin (2009). "EGFR juxtamembrane domain, membranes, and calmodulin: kinetics of their interaction." Biophys J **96**(12): 4887-95.
- Shinohara, H., T. Yasuda, Y. Aiba, H. Sanjo, M. Hamadate, H. Watarai, H. Sakurai and T. Kurosaki (2005). "PKC beta regulates BCR-mediated IKK activation by facilitating the interaction between TAK1 and CARMA1." J Exp Med **202**(10): 1423-31.
- Shohat, G., G. Shani, M. Eisenstein and A. Kimchi (2002). "The DAP-kinase family of proteins: study of a novel group of calcium-regulated death-promoting kinases." Biochim Biophys Acta **1600**(1-2): 45-50.
- Sideras, P., S. Muller, H. Shiels, H. Jin, W. N. Khan, L. Nilsson, E. Parkinson, J. D. Thomas, L. Branden, I. Larsson and et al. (1994). "Genomic organization of mouse and human Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase (Btk) loci." J Immunol **153**(12): 5607-17.
- Siemasko, K., B. J. Skaggs, S. Kabak, E. Williamson, B. K. Brown, W. Song and M. R. Clark (2002). "Receptor-facilitated antigen presentation requires the recruitment of B cell linker protein to Igalpha." J Immunol **168**(5): 2127-38.
- Songyang, Z., S. E. Shoelson, M. Chaudhuri, G. Gish, T. Pawson, W. G. Haser, F. King, T. Roberts, S. Ratnofsky, R. J. Lechleider and et al. (1993). "SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences." Cell **72**(5): 767-78.
- Stahelin, R. V., A. Burian, K. S. Bruzik, D. Murray and W. Cho (2003). "Membrane binding mechanisms of the PX domains of NADPH oxidase p40phox and p47phox." J Biol Chem **278**(16): 14469-79.
- Stahelin, R. V., F. Long, B. J. Peter, D. Murray, P. De Camilli, H. T. McMahon and W. Cho (2003). "Contrasting membrane interaction mechanisms of AP180 N-terminal homology (ANTH) and epsin N-terminal homology (ENTH) domains." J Biol Chem **278**(31): 28993-9.
- Stenmark, H., R. Aasland and P. C. Driscoll (2002). "The phosphatidylinositol 3-phosphate-binding FYVE finger." FEBS Lett **513**(1): 77-84.
- Storch, B., S. Meixlsperger and H. Jumaa (2007). "The Ig-alpha ITAM is required for efficient differentiation but not proliferation of pre-B cells." Eur J Immunol **37**(1): 252-60.
- Stork, B., M. Engelke, J. Frey, V. Horejsi, A. Hamm-Baarke, B. Schraven, T. Kurosaki and J. Wienands (2004). "Grb2 and the non-T cell activation linker NTAL constitute a Ca(2+)-regulating signal circuit in B lymphocytes." Immunity **21**(5): 681-91.

- Stork, B., K. Neumann, I. Goldbeck, S. Alers, T. Kahne, M. Naumann, M. Engelke and J. Wienands (2007). "Subcellular localization of Grb2 by the adaptor protein Dok-3 restricts the intensity of Ca<sup>2+</sup> signaling in B cells." Embo J **26**(4): 1140-9.
- Su, Y. W. and H. Jumaa (2003). "LAT links the pre-BCR to calcium signaling." Immunity **19**(2): 295-305.
- Su, Y. W., Y. Zhang, J. Schweikert, G. A. Koretzky, M. Reth and J. Wienands (1999). "Interaction of SLP adaptors with the SH2 domain of Tec family kinases." Eur J Immunol **29**(11): 3702-11.
- Suzuki, H., S. Matsuda, Y. Terauchi, M. Fujiwara, T. Ohteki, T. Asano, T. W. Behrens, T. Kouro, K. Takatsu, T. Kadowaki and S. Koyasu (2003). "PI3K and Btk differentially regulate B cell antigen receptor-mediated signal transduction." Nat Immunol **4**(3): 280-6.
- Swierczynski, S. L. and P. J. Blakeshear (1995). "Membrane association of the myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) protein. Mutational analysis provides evidence for complex interactions." J Biol Chem **270**(22): 13436-45.
- Taddie, J. A., T. R. Hurley, B. S. Hardwick and B. M. Sefton (1994). "Activation of B- and T-cells by the cytoplasmic domains of the B-cell antigen receptor proteins Ig-alpha and Ig-beta." J Biol Chem **269**(18): 13529-35.
- Taddie, J. A., T. R. Hurley and B. M. Sefton (1994). "B-cell activation by wild type and mutant Ig-beta cytoplasmic domains." Adv Exp Med Biol **365**: 23-34.
- Takata, M. and T. Kurosaki (1996). "A role for Bruton's tyrosine kinase in B cell antigen receptor-mediated activation of phospholipase C-gamma 2." J Exp Med **184**(1): 31-40.
- Takata, M., H. Sabe, A. Hata, T. Inazu, Y. Homma, T. Nukada, H. Yamamura and T. Kurosaki (1994). "Tyrosine Kinases Lyn and Syk Regulate B-Cell Receptor-Coupled Ca<sup>2+</sup> Mobilization through Distinct Pathways." Embo Journal **13**(6): 1341-1349.
- Takata, M., H. Sabe, A. Hata, T. Inazu, Y. Homma, T. Nukada, H. Yamamura and T. Kurosaki (1994). "Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor-coupled Ca<sup>2+</sup> mobilization through distinct pathways." Embo J **13**(6): 1341-9.
- Terebiznik, M. R., O. V. Vieira, S. L. Marcus, A. Slade, C. M. Yip, W. S. Trimble, T. Meyer, B. B. Finlay and S. Grinstein (2002). "Elimination of host cell PtdIns(4,5)P(2) by bacterial SigD promotes membrane fission during invasion by Salmonella." Nat Cell Biol **4**(10): 766-73.
- Timmerman, L. A., J. I. Healy, S. N. Ho, L. Chen, C. C. Goodnow and G. R. Crabtree (1997). "Redundant expression but selective utilization of nuclear factor of activated T cells family members." J Immunol **159**(6): 2735-40.
- Togonon, C. E., H. E. Kirk, L. A. Passmore, I. P. Whitehead, C. J. Der and R. J. Kay (1998). "Regulation of RasGRP via a phorbol ester-responsive C1 domain." Mol Cell Biol **18**(12): 6995-7008.

- Tong, J., L. Nguyen, A. Vidal, S. A. Simon, J. H. Skene and T. J. McIntosh (2008). "Role of GAP-43 in sequestering phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate to Raft bilayers." Biophys J **94**(1): 125-33.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.
- Tsuji, S., M. Okamoto, K. Yamada, N. Okamoto, R. Goitsuka, R. Arnold, F. Kiefer and D. Kitamura (2001). "B cell adaptor containing src homology 2 domain (BASH) links B cell receptor signaling to the activation of hematopoietic progenitor kinase 1." J Exp Med **194**(4): 529-39.
- van de Graaf, S. F., J. G. Hoenderop and R. J. Bindels (2006). "Regulation of TRPV5 and TRPV6 by associated proteins." Am J Physiol Renal Physiol **290**(6): F1295-302.
- van Meer, G., D. R. Voelker and G. W. Feigenson (2008). "Membrane lipids: where they are and how they behave." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(2): 112-24.
- Venkataraman, L., D. A. Francis, Z. Wang, J. Liu, T. L. Rothstein and R. Sen (1994). "Cyclosporin-A sensitive induction of NF-AT in murine B cells." Immunity **1**(3): 189-96.
- Vetter, S. W. and E. Leclerc (2003). "Novel aspects of calmodulin target recognition and activation." Eur J Biochem **270**(3): 404-14.
- Vinson, C., M. Myakishev, A. Acharya, A. A. Mir, J. R. Moll and M. Bonovich (2002). "Classification of human B-ZIP proteins based on dimerization properties." Mol Cell Biol **22**(18): 6321-35.
- Wagner, S. D. and M. S. Neuberger (1996). "Somatic hypermutation of immunoglobulin genes." Annu Rev Immunol **14**: 441-57.
- Waksman, G., D. Kominos, S. C. Robertson, N. Pant, D. Baltimore, R. B. Birge, D. Cowburn, H. Hanafusa, B. J. Mayer, M. Overduin and et al. (1992). "Crystal structure of the phosphotyrosine recognition domain SH2 of v-src complexed with tyrosine-phosphorylated peptides." Nature **358**(6388): 646-53.
- Wang, L., E. Devarajan, J. He, S. P. Reddy and J. L. Dai (2005). "Transcription repressor activity of spleen tyrosine kinase mediates breast tumor suppression." Cancer Res **65**(22): 10289-97.
- Wang, Y., O. Horvath, A. Hamm-Baarke, M. Richelme, C. Gregoire, R. Guinamard, V. Horejsi, P. Angelisova, J. Spicka, B. Schraven, B. Malissen and M. Malissen (2005). "Single and combined deletions of the NTAL/LAB and LAT adaptors minimally affect B-cell development and function." Mol Cell Biol **25**(11): 4455-65.
- Watanabe, D., S. Hashimoto, M. Ishiai, M. Matsushita, Y. Baba, T. Kishimoto, T. Kurosaki and S. Tsukada (2001). "Four tyrosine residues in phospholipase C-gamma 2, identified as Btk-dependent phosphorylation sites, are required for B cell antigen receptor-coupled calcium signaling." J Biol Chem **276**(42): 38595-601.
- Watanabe, K. and T. Tsubata (2009). "Autophagy connects antigen receptor signaling to costimulatory signaling in B lymphocytes." Autophagy **5**(1): 108-10.

- Wienands, J., F. Freuler and G. Baumann (1995). "Tyrosine-phosphorylated forms of Ig beta, CD22, TCR zeta and HOSS are major ligands for tandem SH2 domains of Syk." Int Immunol **7**(11): 1701-8.
- Wienands, J., J. Hombach, A. Radbruch, C. Riesterer and M. Reth (1990). "Molecular components of the B cell antigen receptor complex of class IgD differ partly from those of IgM." Embo J **9**(2): 449-55.
- Wienands, J., J. Schweikert, B. Wollscheid, H. Jumaa, P. J. Nielsen and M. Reth (1998). "SLP-65: a new signaling component in B lymphocytes which requires expression of the antigen receptor for phosphorylation." J Exp Med **188**(4): 791-5.
- Williams, R. T., S. S. Manji, N. J. Parker, M. S. Hancock, L. Van Stekelenburg, J. P. Eid, P. V. Senior, J. S. Kazenwadel, T. Shandala, R. Saint, P. J. Smith and M. A. Dziadek (2001). "Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins." Biochem J **357**(Pt 3): 673-85.
- Wong, J., M. Ishiai, T. Kurosaki and A. C. Chan (2000). "Functional complementation of BLNK by SLP-76 and LAT linker proteins." J Biol Chem **275**(42): 33116-22.
- Wu, J. N. and G. A. Koretzky (2004). "The SLP-76 family of adapter proteins." Semin Immunol **16**(6): 379-93.
- Xavier, R., T. Brennan, Q. Li, C. McCormack and B. Seed (1998). "Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation." Immunity **8**(6): 723-32.
- Yamanashi, Y., T. Kakiuchi, J. Mizuguchi, T. Yamamoto and K. Toyoshima (1991). "Association of B cell antigen receptor with protein tyrosine kinase Lyn." Science **251**(4990): 192-4.
- Yasuda, T. and T. Yamamoto (2004). "Analysis of B-cell signaling using DT40 B-cell line." Methods Mol Biol **271**: 261-70.
- Zhang, M. and T. Yuan (1998). "Molecular mechanisms of calmodulin's functional versatility." Biochem Cell Biol **76**(2-3): 313-23.
- Zhang, S. L., Y. Yu, J. Roos, J. A. Kozak, T. J. Deerinck, M. H. Ellisman, K. A. Stauderman and M. D. Cahalan (2005). "STIM1 is a Ca<sup>2+</sup> sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca<sup>2+</sup> store to the plasma membrane." Nature **437**(7060): 902-5.
- Zhang, W., R. P. Tribble and L. E. Samelson (1998). "LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation." Immunity **9**(2): 239-46.
- Zhang, W., R. P. Tribble, M. Zhu, S. K. Liu, C. J. McGlade and L. E. Samelson (2000). "Association of Grb2, Gads, and phospholipase C-gamma 1 with phosphorylated LAT tyrosine residues. Effect of LAT tyrosine mutations on T cell antigen receptor-mediated signaling." J Biol Chem **275**(30): 23355-61.

## 9 Anhang

### 9.1 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 2.1 Initiation der BCR-Signalleitung modifiziert nach (Engelke *et al.* 2007).
- Abb. 2.2 SLP-65 – Domänenstruktur und Bindungspartner.
- Abb. 2.3 Postuliertes Leucin-Zipper-Motiv von SLP-65 nach (Kohler *et al.* 2005).
- Abb. 6.1 Aminosäureaustausche von Isoleucin in Position 25 zu Lysin, Alanin oder Glutamat wirken sich unterschiedlich auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung nach BCR-Stimulation in DT40 Zellen aus.
- Abb. 6.2 SLP-65-BED bindet Calmodulin in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ .
- Abb. 6.3 Die basische Effektor-domäne von SLP-65 bindet Calmodulin direkt.
- Abb. 6.4 Wildtypisches SLP-65 bindet Calmodulin in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ .
- Abb. 6.5 Nur wildtypisches SLP-65 kann aus Zelllysaten mit Calmodulin-Agarose aufgereinigt werden.
- Abb. 6.6 Die für die SLP-65-Calmodulin-Interaktion kritische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration liegt zwischen 0,63  $\mu\text{M}$  und 1,25  $\mu\text{M}$ .
- Abb. 6.7 Stimulationsabhängige bekannte oder mögliche Modifikationen der Interaktionspartner SLP-65 und Calmodulin beeinflussen die Bindung nicht.
- Abb. 6.8 Aminosäureaustausche von Serin in Position 30 und Threonin in Position 54 zu jeweils Alanin in SLP-65 beeinflussen die SLP-65-Calmodulin-Interaktion nicht.
- Abb. 6.9 Die BED von SLP-65 beinhaltet drei mögliche Calmodulinbindemotive.
- Abb. 6.10 Die Interaktion der BED von SLP-65 mit Calmodulin ist von Isoleucin in Position 25 abhängig.
- Abb. 6.11 Die Interaktion von SLP-65 und Calmodulin wird nicht durch Aminosäureaustausche von Isoleucin in Position 25 und Valin in Position 41 beeinflusst.
- Abb. 6.12 Ein Verlust der Calmodulinbindung schließt eine moderate  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung nicht aus.
- Abb. 6.13 Die BED von SLP-65 bindet unterschiedliche Phospholipide *in vitro*.
- Abb. 6.14 Deletion der BED resultiert in einer reduzierten Interaktion von SLP-65 mit  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$ ,  $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$ ,  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  und  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$  *in vitro*.
- Abb. 6.15 Calmodulin hat keinen Einfluss auf die *in vitro* Interaktion der rekombinanten Proteine mit Lipiden auf PIP-strips™.
- Abb. 6.16 Die Expression der SLP-65-Varianten in den hergestellten DT40 B-Zelllinien ist vergleichbar.
- Abb. 6.17 Das Phosphorylierungsniveau von intaktem hTIRAP-SLP-65 ist vergleichbar mit dem des wildtypischen SLP-65-Proteins.
- Abb. 6.18 Das intakte PIP-Bindemotiv von TIRAP kann die Signalkompetenz von N-terminal deletiertem SLP-65 wieder herstellen.
- Abb. 6.19 Die Chimäre hTIRAP-SLP-65 kann ebenfalls mit Calmodulin-Agarose aus Lysaten isoliert werden.
- Abb. 6.20 Ist die SH2-Domäne von SLP-65 inaktiv oder nicht mehr vorhanden, kann PLC- $\gamma$ 2 nach BCR-Stimulation nicht mehr phosphoryliert werden.

- Abb. 6.21 Stimmulationsinduzierte SLP-65-Membranrekrutierung und -Phosphorylierung, sowie die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierungskompetenz sind nicht gegeben in DT40 Zellen, welche eine Kinase-inaktive Form von Syk exprimieren.
- Abb. 6.22 Aminosäuresequenzen des N-Terminus von SLP-65 für Mensch, Maus und Huhn.
- Abb. 6.23 Es erfolgt keine stimulationsinduzierte Membranrekrutierung von SLP-65  $\Delta\text{BED}$ , unabhängig von der Koexpression von SLP-65  $\Delta\text{SH2}$ .
- Abb. 6.24 Die reduzierte Phosphorylierung von SLP-65  $\Delta\text{BED}$  ist unabhängig von der Koexpression von SLP-65  $\Delta\text{SH2}$ .
- Abb. 6.25 Unabhängig von der Koexpression von SLP-65  $\Delta\text{SH2}$  besitzt die SLP-65  $\Delta\text{BED}$  keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierungskompetenz.
- Abb. 6.26 Schematische Darstellung der Proteine SLP-65 wt, SLP-65 R468L, TIRAP-SLP-65 wt, TIRAP-SLP-65 R468L, Lyn-SLP-65 wt und Lyn-SLP-65 R468L, die im folgenden in DT40 Zellen untersucht wurden.
- Abb. 6.27 Lokalisationsstudien unterschiedlicher SLP-65-Chimären.
- Abb. 6.28 TIRAP-SLP-65 benötigt eine funktionale SH2-Domäne von SLP-65 für eine intakte  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort, Lyn-SLP-65 dagegen nur bedingt.
- Abb. 6.29 Schematische Darstellung der Proteine SLP-65 wt, SLP-65 R468L, Syk-SLP-65 wt und Syk-SLP-65 R468L, die im folgenden in DT40 Zellen untersucht wurden.
- Abb. 6.30 Substitution der BED von SLP-65 durch die Tandem-SH2-Domäne von Syk führt zu einem funktionellen Protein unabhängig von der SH2-Domäne von SLP-65.
- Abb. 7.1 Modell der Membranrekrutierung von SLP-65.

## 9.2 Tabellenverzeichnis

- Tab. 4.1 Primärantikörper und ihre Verwendung
- Tab. 4.2 Sekundärantikörper
- Tab. 4.3 Bakterienstämme
- Tab. 4.4 Vektoren
- Tab. 4.5 Oligonukleotide
- Tab. 4.6 Konstrukte
- Tab. 5.1 Ansatz für Reverse Transkription
- Tab. 5.2 Ansatz für Standard-PCR
- Tab. 5.3 Programm für Standard-PCR
- Tab. 5.4 Programm für Mutagenese-PCR
- Tab. 7.1 Aminosäureaustausche in Position 25 von humanem SLP-65.
- Tab. 7.2 Interaktionen von SLP-65-Varianten mit  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin.
- Tab. 7.3 Substitution der BED von SLP-65 durch ein PIP-Bindemotiv.
- Tab. 7.4 Kooperation von BED und SH2-Domäne von SLP-65.
- Tab. 7.5 Untersuchungen chimärer SLP-65 –Varianten.



## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unzulässige Hilfe dritter unter ausschließlicher Nutzung der aufgeführten Materialien, Methoden und Literaturquellen an der Universität Bielefeld und Georg-August-Universität Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. Jürgen Wienands angefertigt zu haben.

Bielefeld, den 16.11.2009

Nadine Herrmann



