

**Integration der Adapterproteine
mAbp1 und HS1 in signalleitende Prozesse von
B-Lymphocyten und dendritischen Zellen**

Dissertation

zur Erlangung des

naturwissenschaftlichen Doktorgrades

der Fakultät für Chemie

der Universität Bielefeld

vorgelegt von

Alexander Hennemann

März 2010

Danksagung

Für die Betreuung und Unterstützung in den vergangenen Jahren möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Jürgen Wienands großen Dank aussprechen. Ich danke ihm auch für die vertrauensvolle und freundliche Arbeitsatmosphäre sowie seine Diskussions- und Hilfsbereitschaft, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

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

Herrn Prof. Dr. M. Gunzer und Dr. P. Reichardt danke ich für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung bei der Durchführung der DC-vermittelten T-Zell-Proliferationstests.

Bei Herrn Prof. Dr. T. Watanabe und Dr. Klemens Rottner möchte ich mich für die Bereitstellung HS1-defizienter Mäuse bedanken.

Mein Dank gilt auch den Tierpflegerinnen und -pflegern des MPI für Experimentelle Medizin in Göttingen und der tierexperimentellen Einrichtung der Universität Bielefeld für die exzellente Kooperation.

Allen aktuellen bzw. ehemaligen Kollegen in Göttingen und Bielefeld danke ich für die gute Zusammenarbeit, das tolle Arbeitsklima und die zahlreichen schönen und lustigen Momente im Laboralltag und darüber hinaus.

Mein besonderer Dank gilt Kai, Gabi, Nadine, Michael, Marion, Birgit und Ines. Eure praktischen und theoretischen Kenntnisse sowie die moralische Unterstützung haben entscheidend zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen.

Der größte Dank gilt meiner Familie, die mich stets motiviert und an mich geglaubt hat. Ihr habt mich zu jeder Zeit unterstützt und mir Mut gemacht. Euch ist diese Arbeit gewidmet.

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 2005 bis Oktober 2009 an der Universität Göttingen in der Abteilung Zelluläre und Molekulare Immunologie unter der wissenschaftlichen Leitung von Herrn Prof. Dr. J. Wienands angefertigt. Die Arbeit wurde durch den Sonderforschungsbereich „*protein and membrane transport between cellular compartments*“ (SFB523) der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
1.1 Summary.....	2
2 Einleitung	3
2.1 Die B-Zell-Antigenrezeptor-vermittelte Signalweiterleitung.....	3
2.2 Die Entstehung von Gedächtnis-B-Zellen.....	4
2.3 Internalisierung, Prozessierung und Präsentation von Antigenen.....	5
2.3.1 Struktur von MHC-Molekülen.....	6
2.3.2 Internalisierung von Antigenen durch APC.....	7
2.3.3 Prozessierung und Präsentation von Antigenen auf MHC II-Molekülen.....	9
2.3.4 Assemblierung, Beladung und Transport von MHC II-Molekülen.....	9
2.4 Kreuzpräsentation von extrazellulären Antigenen auf MHC I-Molekülen.....	10
2.5 Die Adapterproteine mAbp1 und HS1.....	11
2.5.1 Das Adapterprotein mAbp1.....	12
2.5.1.1 Die Funktion von mAbp1 in dynamischen Prozessen der Aktin-Cytoskelett-Reorganisation.....	13
2.5.1.2 Einfluss von mAbp1 auf die Antigenrezeptor-induzierte Signalweiterleitung.....	15
2.5.2 Das Adapterprotein HS1.....	16
2.5.2.1 Einfluss von HS1 auf die Antigenrezeptor-induzierte Signalweiterleitung.....	17
2.5.2.2 Die Funktion von HS1 in dynamischen Prozessen der Aktin-Cytoskelett-Reorganisation.....	19
3 Ziele der Arbeit	22
4 Material und Methoden	23
4.1 Material.....	23
4.1.1 Materialien, Chemikalien und Reagenzien.....	23
4.1.2 Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	23
4.1.3 Geräte.....	25
4.1.4 Software.....	26
4.1.5 Verwendete Puffer.....	26
4.1.6 Antikörper.....	28
4.1.6.1 Verwendete Primär-Antikörper.....	28

4.1.6.2 Sekundäre Antikörper.....	29
4.1.7 Enzyme.....	29
4.1.8 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	29
4.1.9 Sonstige Materialien.....	30
4.1.10 Verwendete Oligonukleotide.....	31
4.1.11 Vektoren und cDNA	32
4.1.11.1 Vektoren	32
4.1.11.2 cDNA-Konstrukte.....	32
4.1.12 Bakterienstämme	33
4.1.13 Verwendete Zelllinien	33
4.1.13.1 Ramos (ATCC-Nummer: CRL-1596).....	33
4.1.13.2 DT40 (ATCC-Nummer: CRL-2111).....	33
4.1.13.3 Plat-E	33
4.1.14 Mauslinien.....	34
4.1.14.1 Balb/c.....	34
4.1.14.2 <i>mabp1^{-/-}</i> Balb/c	34
4.1.14.3 C57BL/6	34
4.1.14.4 <i>hs1^{-/-}</i> C57BL/6	34
4.1.14.5 Do11.10	34
4.1.14.6 OT-I	34
4.2 Methoden	35
4.2.1 Arbeiten mit Versuchstieren	35
4.2.1.1 Haltungsbedingungen und Züchtung von Labormäusen	35
4.2.1.2 Rückkreuzung.....	35
4.2.1.3 Ohrlochung und Schwanzbiopsie.....	35
4.2.1.4 Blutentnahme und Serumgewinnung bei Mäusen	35
4.2.1.5 Sektion von Mäusen	36
4.2.1.6 Immunisierung von Mäusen	36
4.2.2 Zellbiologische Methoden.....	37
4.2.2.1 Isolierung von Knochenmarkzellen.....	37
4.2.2.2 Generierung dendritischer Zellen (DC) aus Knochenmarkzellen	37
4.2.2.3 Isolierung von Milzzellen.....	38
4.2.2.4 Aufreinigung von B-Lymphocyten aus der Milz mittels autoMACS™	38

4.2.2.5	Aufreinigung transgener T-Lymphocyten aus der Milz	38
4.2.2.6	Erythrocyten-Lyse	39
4.2.2.7	Zellzählung	39
4.2.2.8	Vorbereitung von primären Zellen für durchflusszytometrische Analysen .	39
4.2.2.9	Bestimmung der Endocytoserate von DC	40
4.2.2.10	Beladung von T-Lymphocyten mit Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFSE)	40
4.2.2.11	Kokultivierung von DC und T-Zellen	40
4.2.2.12	Durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Proliferation	41
4.2.2.13	Kultivierungsbedingungen für Zelllinien	41
4.2.2.14	Einfrieren eukaryotischer Zellen	42
4.2.2.15	Auftauen eukaryotischer Zellen.....	42
4.2.2.16	Transfektion eukaryotischer Suspensionszellen.....	42
4.2.2.17	Transduktion von DT40-Zellen durch pseudotypisierte, rekombinante Retroviren.....	43
4.2.2.18	Transfektion von Plat-E-Zellen mit FuGENE® zur Herstellung rekombinanter Viren.....	43
4.2.2.19	Infektion von DT40-Zellen mit replikationsinkompetenten Retroviren	44
4.2.2.20	Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von IgM auf DT40-Zellen	44
4.2.2.21	BCR-Stimulation von DT40-, Ramos- bzw. primären B-Zellen.....	44
4.2.2.22	Analyse der Ca ²⁺ -Mobilisierung.....	45
4.2.3	Molekularbiologische Methoden	46
4.2.3.1	Restriktionsspaltung von DNA.....	46
4.2.3.2	Agarose-Gelelektrophorese	46
4.2.3.3	DNA-Isolierung aus Agarosegelen.....	47
4.2.3.4	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	47
4.2.3.5	5'-Dephosphorylierung von Vektor-DNA	47
4.2.3.6	Ligation von DNA-Fragmenten	47
4.2.4	Herstellung transformationskompetenter E.coli-Bakterien.....	48
4.2.5	Transformation kompetenter Bakterien	48
4.2.6	Langzeitaufbewahrung von Bakterienstämmen	48
4.2.7	Analytische Plasmidisolierung (Miniprep)	49

4.2.8 Präparative Plasmidisolierung (Midiprep)	49
4.2.9 Isolierung genomischer DNA aus DT40 B-Zellen.....	49
4.2.10 DNA-Isolierung aus Schwanzbiopsien	49
4.2.11 Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR)	49
4.2.12 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	50
4.2.13 DNA-Sequenzierung	52
4.2.14 Proteinbiochemische Methoden	52
4.2.14.1 Phycoerythrin (PE)-Kopplung an 4-OH-3-Iodo-5-Nitrophenylacetyl (NIP)- BSA	52
4.2.14.2 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	52
4.2.14.3 GST-basierte Affinitätsaufreinigung	53
4.2.14.4 Immunpräzipitation (IP)	54
4.2.14.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	54
4.2.14.6 Western-Blot-Analyse	55
5 Ergebnisse	56
5.1 Interaktion von mAbp1 und HS1 in Maus-B-Lymphocyten	56
5.2 Generierung mAbp1/HS1-defizienter Mäuse	57
5.3 Durchflusszytometrische Analyse der Zusammensetzung des B-Zell-Kompartiments in wildtypischen, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten Milzen der Maus	58
5.4 Durchflusszytometrische Analyse der Verteilung von CD4 ⁺ bzw. CD8 ⁺ T-Zellen in wildtypischen, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten Milzen der Maus	60
5.5 Protein-Tyrosin-Phosphorylierung in wildtypischen, mAbp1-, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten B-Lymphocyten aus der Maus.....	62
5.6 Ca ²⁺ -Mobilisierung in B-Lymphocyten aus HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten Mäusen.....	64
5.7 SHIP Tyrosin-Phosphorylierung in wildtypischen, mAbp1-, HS1- bzw. mAbp1/HS1- defizienten B-Lymphocyten aus der Maus	70
5.8 SLP-65 Tyrosin-Phosphorylierung in wildtypischen, mAbp1-, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten B-Lymphocyten aus der Maus.....	73
5.9 Interaktion von HS1 mit regulatorischen Elementen der BCR-Signaltransduktion ..	75
5.10 Inaktivierung von <i>chabp1</i> in DT40-Zellen durch zielgerichtete Mutagenese	80
5.11 Ca ²⁺ -Mobilisierung in <i>chabp1</i> ^{-/-} DT40-Zellen.....	83
5.12 Durchflusszytometrische Charakterisierung IgG-positiver B-Zellen	84

5.13 Durchflusszytometrische Charakterisierung B220 ^{low/-} /CD19 ^{low/-} /IgG ⁺ B-Lymphocyten in wildtypischen bzw. mAbp1-defizienten Mäusen nach Immunisierung mit Hapten-Protein-Konjugaten.....	87
5.14 Durchflusszytometrische Analyse der Reifung und Endocytoserate mAbp1-defizienter dendritischer Zellen (DC)	90
5.15 Durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Proliferation nach Aktivierung durch wildtypische bzw. mAbp1-defiziente DC.....	92
6 Diskussion	97
6.1 Funktion der Adapterproteine mAbp1 und HS1 in B-Lymphocyten.....	97
6.1.1 Funktionelle Relevanz der Interaktion von mAbp1 und HS1 in B-Lymphocyten	97
6.1.2 Bedeutung von mAbp1 und HS1 für die Antigen-unabhängige Entwicklung von B- und T-Lymphocyten.....	98
6.1.3 Einfluss von mAbp1 und HS1 auf die BCR-initiierte Signalweiterleitung in primären B-Lymphocyten	99
6.2 Einfluss von mAbp1 und HS1 auf die Antigen-vermittelte Differenzierung IgG-positiver B-Zell-Populationen.....	105
6.3 Regulatorische Funktion von mAbp1 in DC	108
6.3.1 Beeinflussung der Aktivierung von DC durch mAbp1	108
6.3.2 Beeinflussung der Antigenaufnahme von DC durch mAbp1	109
6.3.3 Regulation der Aktivierung von CD4 ⁺ bzw. CD8 ⁺ T-Zellen durch dendritische Zellen in Abhängigkeit von mAbp1	111
7 Literatur	114
8 Anhang.....	139
8.1 Abbildungsverzeichnis.....	139
8.2 Tabellenverzeichnis	140
8.3 Aminosäuresequenzen	141

I Abkürzungen

ADF-H	<i>actin-depolymerizing factor homology</i>
ALV	<i>avian leucosis virus</i>
AP	Adapter-Protein
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
Arf	<i>ADP-ribosylation factor</i>
Arp	<i>actin-related protein</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BASH	<i>B cell adaptor containing SH2 domain</i>
BCR	B-Zell-Antigenrezeptor
BLNK	<i>B cell linker protein</i>
BSA	Rinderserumalbumin
Btk	<i>Bruton`s tyrosine kinase</i>
bzw.	beziehungsweise
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CCP	<i>clathrin-coated pits</i>
CCV	<i>clathrin-coated vesicles</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester
CGG	<i>chicken gamma globulin</i>
CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i>
CLIP	<i>class-II-associated invariant chain peptide</i>
CRAC	<i>calcium release-activated Ca²⁺ channel</i>
CS	<i>chicken serum</i>
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DC	dendritische Zelle
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
DMEM	<i>Dulbeccos Minimal Essential Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNP	2,4-Dinitrophenol

dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemical luminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-β-aminoethyl-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatischen Retikulum
ESCRT	<i>endosomal complex required for transport</i>
F	Farad
F(ab)	Fragmente mit spezifischer Antigenbindung
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorter</i>
Fc	<i>fragment cristallizable</i>
FCS	Fötale Kälberserum
Fgd1	<i>faciogenital dysplasia protein 1</i>
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i>
Fyb	<i>Fyn-binding protein</i>
g	Erdbeschleunigung
GEF	<i>guanine-nucleotide exchange factor</i>
GFP	grünes fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulocyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HEL	<i>hen egg lysozyme</i>
Hip1R	<i>huntingtin-interacting protein 1-related</i>
Hip-55	<i>hematopoietic progenitor kinase 1-interacting protein of 55 kDa</i>
HisD	Histidinol
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HPK1	<i>hematopoietic progenitor kinase 1</i>
HRPO	Meerrettichperoxidase
HS1	<i>hematopoietic lineage cell-specific protein 1</i>
HS1BP3	HS1-bindendes Protein 3
HTH	<i>helix-turn-helix</i>

i. p.	<i>intra peritoneal</i>
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
Ig	Immunglobulin
Ii	<i>invariant chain</i>
IL	Interleukin
IOD	integrierte optische Dichte
IP	Immunpräzipitation
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
IS	Immunologische Synapse
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
k	Kilo
kb	Kilobasen
KLH	<i>keyhole limpet hemocyanin</i>
LBP	LPS-bindendes Protein
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
LFA	<i>leukocyte function-associated antigen</i>
Liar	<i>Lyn-interacting ankyrin repeat</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LTR	<i>5' long terminal repeat</i>
mAbp1	<i>mammalian actin-binding protein 1</i>
MACS	<i>magnetic activated cell sorting/magnetic cell separation</i>
MARCH	<i>membrane-associated ring finger-CH 1</i>
MESV	<i>murine embryonic stem cell virus</i>
μg	Mikrogramm
μM	Mikromolar
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
Min	Minute
mL	Milliliter
MMLV	<i>moloney murine leukemia virus</i>
MØ	Makrophage
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure

MR	Mannose-Rezeptor
mRNA	<i>messenger</i> -RNA
MVB	multi-vesikuläre Strukturen
MZ	Marginal Zonen
Nck	<i>non-catalytic region of tyrosine kinase</i>
Neo	Neomycin
ng	Nanogramm
NIP	4-Hydroxy-3-Iodo-5-Nitrophenylacetat
NK	Natürliche Killer
nm	Nanometer
NP	4-Hydroxy-3-Nitrophenylacetat
NP-40	Nonidet P40
NPF	<i>nucleation-promoting factors</i>
NTA	N-terminale acide Region
N-WASP	<i>neural</i> -WASP
OD	optische Dichte
OVA	Ovalbumin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PH	<i>pleckstrin homology</i>
Phe	Phenylalanin
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PLC- γ 2	Phospholipase-C- γ 2
PMCA	<i>plasma membrane Ca²⁺ ATPasen</i>
PTK	Protein-Tyrosin-Kinase
Rho	<i>Ras homology</i>
RNA	Ribonucleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur/Reverse Transkription
s	Sekunde

SCAR	<i>suppressor of cyclic AMP repressor</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SERCA	<i>sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase</i>
SH2	<i>Src homology 2</i>
SH3P7	<i>SH3 domain-containing protein 7</i>
SHIP	<i>SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase</i>
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SLP-65	<i>SH2-containing leukocyte protein of 65 kDa</i>
SOC	<i>store operated Ca²⁺ channel</i>
SPF	spezifiziert Pathogen-freien
SR	<i>scavenger receptors</i>
Src	<i>Rous sarcoma oncogene</i>
SSC	<i>side scatter</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
STIM	<i>stromal-interacting molecule</i>
Syk	<i>spleen tyrosine kinase</i>
t	Zeit
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCR	T-Zell-Antigenrezeptor
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
TLR	<i>toll-like receptor</i>
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
Tyr	Tyrosin
U	<i>Unit</i>
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V/v	<i>Volt/volume</i>
VSV	<i>vesicular stomatitis virus</i>
w	<i>weight</i>
WASP	<i>Wiskott Aldrich syndrome protein</i>
WAVE	<i>WASP-family verprolin-homologous protein</i>

WH2	WASP <i>homology 2</i>
wt	Wildtyp
ZAP-70	<i>zeta-chain-associated protein kinase 70</i>

II Abkürzungen für Aminosäuren

Aminosäure	Abkürzung	Buchstabensymbol
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

III Abkürzungen für Nukleotide

Nukleotid	Abkürzung
Desoxyadenin	A
Desoxycytosin	C
Desoxyguanin	G
Desoxythymidin	T

1 Zusammenfassung

B-Lymphocyten und dendritische Zellen (DC) internalisieren, prozessieren und präsentieren Antigene als Peptid:MHC-Komplexe T-Lymphocyten. Im Falle der B-Lymphocyten erfolgt die Antigenerkennung spezifisch über den B-Zell-Antigenrezeptor (BCR). Gleichzeitig können BCR-vermittelte Signalkaskaden unter der Beteiligung verschiedener Effektor- bzw. Adapterproteine initiiert werden. Zwei Adapterproteine, die diese Signalweiterleitung vermitteln, sind mAbp1 und HS1.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich erstmalig mittels Immunpräzipitationen zeigen, dass mAbp1 und HS1 in B-Lymphocyten der Maus miteinander interagieren. Durch die Charakterisierung mAbp1-, HS1- und mAbp1/HS1-defizienter primärer B-Zellen konnte eine verstärkte BCR-vermittelte Gesamt-Protein-Tyrosin-Phosphorylierung im Vergleich zur Wildtyp (wt) -Kontrolle gezeigt werden. Zusätzlich wurde in den oben genannten Zellen eine verringerte Ca^{2+} -Mobilisierung aus Speichern des Endoplasmatischen Retikulums und ein erhöhter Ca^{2+} -Flux über die Plasmamembran im Vergleich zur wt-Kontrolle detektiert. Tatsächlich zeigten GST-basierte Affinitätsaufreinigungen eine Interaktion von HS1 mit der SH2-Domäne des Adapterproteins SLP-65, welches ein essentielles, positiv Ca^{2+} -regulatorisches Element der BCR-vermittelten Signalweiterleitung darstellt. Andererseits konnte ergänzend zu den oben genannten Ergebnissen eine Assoziation von HS1 mit der negativ-regulatorischen Inositol-Phosphatase SHIP nach BCR-Stimulation nachgewiesen werden.

Des Weiteren konnte durch Verwendung der mAbp1-defizienten Maus eine B220^{low}-/CD19^{low}-/IgG⁺-Zell-Population mit Gedächtnis-B-Zellcharakter durchflusszytometrisch detektiert werden. Die Population wies in mAbp1-defizienten Mäusen eine fünffach erhöhte IgG-Expression im Vergleich zur wt-Kontrolle auf. In mAbp1/HS1-doppelt-defizienten Tieren war diese Population nicht nachweisbar.

In mAbp1-defizienten DC konnte eine verringerte Antigenendocytoserate und reduzierte Expression kostimulatorischer Proteine gezeigt werden. Die Antigen-abhängige CD4⁺ T-Zell-Aktivierung *in vitro* war im Vergleich zur wt-Kontrolle drastisch verstärkt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass mAbp1 und HS1 die Kinetik der BCR-proximalen Signalweiterleitung über die Aktivierung sowohl positiv- als auch negativ-regulatorischer Moleküle steuern. Darüber hinaus prägen mAbp1 und HS1 die Antigen-abhängige Differenzierung und Zusammensetzung von B-Zell-Populationen mit Gedächtnischarakter. In DC besitzt das Adapterprotein mAbp1 eine positiv-regulatorische Funktion bei der Antigenendocytose bzw. Expression kostimulatorischer Moleküle und inhibiert die DC-vermittelte Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Adapterproteine mAbp1 und HS1 in B-Lymphocyten bzw. DC entscheidende Funktionen bei der Initiation und Aufrechterhaltung der humoralen Immunantwort wahrnehmen.

1.1 Summary

B lymphocytes and dendritic cells (DC) internalize, process, and present antigens as peptide:MHC complexes to T lymphocytes. In case of B lymphocytes the antigen recognition occurs specifically via the B cell antigen receptor (BCR). Concomitantly, BCR-mediated signaling cascades are initiated with the participation of different effector or adaptor proteins. Two adaptor proteins that provide this signaling are mAbp1 and HS1.

In the present work I could show for the first time a direct interaction of mAbp1 and HS1 in murine B lymphocytes via immune precipitation experiments. In comparison to wt cells, primary cells deficient in mAbp1 and/or HS1 exhibited a reinforced BCR-mediated overall protein tyrosine phosphorylation. Moreover, they showed reduced Ca^{2+} mobilization from stores of the endoplasmic reticulum and an increased Ca^{2+} flux across the plasma membrane.

The Ca^{2+} phenotype could be due to an interaction between mAbp1 or HS1 and proteins controlling Ca^{2+} mobilization. Indeed, I could show an association between HS1 and the SH2 domain of SLP-65, which is an essential, positive Ca^{2+} -regulatory element of BCR-mediated signaling. In addition, an interaction between HS1 and the negative-regulatory inositol phosphatase SHIP after BCR stimulation could be demonstrated.

Using mAbp1-deficient mice as detection tool a B220^{low/-}/CD19^{low/-}/IgG⁺ cell population with memory B cell character could be identified via flow cytometry. The population showed a fivefold increased IgG expression in comparison to wt control. In mAbp1/HS1-double-deficient animals this population was not detectable.

Analyzing mAbp1-deficient DC a reduced antigen endocytosis rate and diminished expression of co-stimulatory proteins could be shown. The DC-mediated activation of CD4⁺ T cells in vitro was drastically enhanced in comparison to wt control.

In summary, the results show that mAbp1 and HS1 orchestrate both positive- and negative-regulatory molecules and thereby controlling the kinetic of antigen-induced, BCR-proximal signaling. Furthermore the antigen-dependent differentiation and the composition of B cell populations with memory character are decisively influenced by mAbp1 and HS1. In DC the adaptor protein mAbp1 possesses a positive-regulatory function during antigen internalization and expression of co-stimulatory molecules and inhibits DC-mediated activation of CD4⁺ T cells. The present work demonstrates a pivotal role of the adaptor proteins mAbp1 and HS1 in the initiation and maintenance of the humoral immune response in B lymphocytes and DC.

2 Einleitung

Vertebraten entwickelten im Laufe der Evolution Strategien zur Abwehr von Pathogenen, die zusammengefasst als Immunsystem bezeichnet werden. Dieses System weist die Fähigkeit auf, körpereigene von körperfremden Strukturen unterscheiden zu können. Ein Teil dieses Systems bildet die adaptive Immunität. Bestandteile der erworbenen Immunabwehr stellen dendritische Zellen sowie B- und T-Lymphocyten dar. Die erworbene Immunabwehr kann im Gegensatz zur angeborenen Immunität hochspezifisch und selektiv Antigene erkennen und beseitigen. Die Spezifität des adaptiven Immunsystems wird durch die auf der Oberfläche von B- bzw. T-Zellen vorhandenen Antigenrezeptoren gewährleistet.

2.1 Die B-Zell-Antigenrezeptor-vermittelte Signalweiterleitung

Der B-Zell-Antigenrezeptor (BCR) vereinigt zwei Funktionen, die für die Initiation und Aufrechterhaltung der adaptiven Immunantwort entscheidend sind. Einerseits kann der BCR Antigene binden und endocytieren, die dann auf MHC-Molekülen präsentiert werden (siehe Abschnitt 2.3). Andererseits bewirkt die Bindung eines multivalenten Antigens die Zusammenlagerung mehrerer BCR, wodurch eine Signalweiterleitung ins Zellinnere initiiert wird. Dieser Prozess kann zur Differenzierung und Proliferation der B-Zellen führen (zur Übersicht: Engelke *et al.*, 2007; Reth und Wienands, 1997; Wienands, 2000). Startpunkt der intrazellulären Signaltransduktion bilden die *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs* (ITAMs) in den cytoplasmatischen Domänen von Ig- α bzw. Ig- β (Flaswinkel und Reth, 1992; Sanchez *et al.*, 1993; Taddie *et al.*, 1994). Nach Bindung eines Antigens translozieren die BCR-Komplexe in *lipid rafts*, was zur Aktivierung von Protein-Tyrosin-Kinasen der Src-Familie führt. Src-Kinasen phosphorylieren Tyrosinreste in den ITAMs von Ig- α bzw. Ig- β (Cheng *et al.*, 1999; zur Übersicht: Leo *et al.*, 2002; Sefton und Campbell, 1991), wodurch die Bindung der Protein-Tyrosin-Kinase (PTK) *spleen tyrosine kinase* (Syk) durch ihre zwei aufeinander folgenden *Src homology 2* (SH2)-Domänen initiiert wird (Futterer *et al.*, 1998; zur Übersicht: Wienands 2000). Rekrutiertes Syk unterliegt der Autophosphorylierung oder wird durch Src-Kinasen Tyrosinphosphoryliert (Kurosaki *et al.*, 1994; Kurosaki *et al.*, 1995; Rowley *et al.*, 1995; Kimura *et al.*, 1996). Die PTK Syk kann daraufhin die Proteine *SH2-containing leukocyte protein of 65 kDa* (SLP-65) und *Bruton's tyrosine kinase* (Btk) aktivieren (Baba *et al.*, 2001; Kimura *et al.*, 1996; zur Übersicht: Engelke *et al.*, 2007; Kurosaki, 2000). Die Rekrutierung und Aktivierung der Phospholipase-C- γ 2 (PLC- γ 2) durch Btk und Syk führt

zur Bildung des Ca^{2+} -Initiationskomplex bestehend aus SLP-65, Btk und PLC- γ 2 (zur Übersicht: Engelke *et al.*, 2007). Durch die Assemblierung dieser Proteine wird die Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) initiiert (zur Übersicht: Engelke *et al.*, 2007; Kurosaki und Tsukada, 2000). PLC- γ 2 katalysiert die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in die *second messenger* Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) (zur Übersicht: Engelke *et al.*, 2007; Patterson *et al.*, 2004). IP_3 bindet an den im ER lokalisierten IP_3 -Rezeptor und steuert die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern (zur Übersicht: Patterson *et al.*, 2004). Durch die Leerung dieser Speicher werden Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran, die sogenannten *store operated Ca^{2+} channels* (SOCs), geöffnet und modulieren einen Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum in das Zellinnere (zur Übersicht: Engelke *et al.*, 2007).

2.2 Die Entstehung von Gedächtnis-B-Zellen

Naïve, folliculäre B-Zellen, die über das Blut oder die Lymphe transportiert werden, zirkulieren zwischen sekundären lymphatischen Organen, wie Milz und Lymphknoten (zur Übersicht: Junt *et al.*, 2008; MacLennan, 2008). Treffen naïve B-Zellen auf ein Antigen, das durch den BCR erkannt wird, werden die B-Lymphocyten aktiviert und wandern in die T-Zell-Zone des Lymphknoten ein (Lanzavecchia und Bove, 1985; zur Übersicht: Roozendaal *et al.*, 2008). Neben der Aktivierung durch das prozessierte Antigen erhalten die B-Lymphocyten zusätzliche kostimulatorische Signale in Form von Cytokinen und Interleukinen durch aktivierte CD4^+ T-Zellen (Garside *et al.*, 1998; Jacob *et al.*, 1991; zur Übersicht: Elgueta *et al.*, 2009; Janeway, 1992; Noelle *et al.*, 1992). Durch die vollständige Aktivierung der B-Zellen setzt eine klonale Expansion ein (Burnet, 1959; zur Übersicht: Rajewsky, 1996). Die aktivierten B-Lymphocyten können in kurzlebige, vorwiegend IgM-sezernierende Plasmazellen mit einer Halbwertszeit von drei bis fünf Tagen differenzieren, die in die rote Pulpa der Milz oder in die Medulla der Lymphknoten wandern (Ho *et al.*, 1986; Jacob und Kelsoe, 1992). Ein Teil der B-Zellen bildet in primären Lymphfollikeln Keimzentren, in denen die Zellen Keimzentrumsreaktionen durchlaufen (zur Übersicht: Ahmed und Gray, 1996; McHeyzer-Williams und McHeyzer-Williams, 2005). Zu den Keimzentrumsreaktionen zählen die somatische Hypermutation von Genen, die die variablen Regionen des BCR kodieren und die durch Antigenkontakt beeinflusste spezifische Selektion von B-Lymphocyten (Berek *et al.*, 1991; Jacob *et al.*, 1991; McKean *et al.*, 1984; zur Übersicht: Allen *et al.*, 1987). Im Laufe einer Keimzentrumsreaktion kann

ein Isotypwechsel der konstanten Region der Immunglobuline vollzogen werden. Dadurch werden Antikörper vom IgG-, IgE- bzw. IgA-Isotyp sekretiert (zur Übersicht: Honjo *et al.*, 2002; Manis *et al.*, 2002). Autoreaktive Zentrocyten, oder Zellen, die keinen funktionellen Antigenrezeptor exprimieren, werden durch Apoptose eliminiert (zur Übersicht: Kelsoe, 1995; Melchers und Rolink, 2006). Positiv selektionierte B-Zellen differenzieren entweder zu langlebigen Plasmazellen oder zu Gedächtnis-B-Zellen (Smith *et al.*, 1997 zur Übersicht: Kelsoe, 1995; Hollowood und Goodlad, 1998). Die Entstehung von Gedächtnis-B-Zellen kann sowohl durch Thymus-unabhängige Antigene als auch unabhängig von einer Keimzentrumsreaktion erfolgen (Toyama *et al.*, 2002; zur Übersicht: Chappell und Jacob, 2007).

Neu entstandene Gedächtnis-B-Zellen weisen eine starke Expression von anti-apoptotischen Proteinen, auf und können im Menschen ein Leben lang in lymphatischen Nischen persistieren (Nuñez *et al.*, 1991; zur Übersicht: Lanzavecchia und Sallusto, 2009; Sprent und Tough, 1994). Wird ein Organismus ein zweites Mal mit dem gleichen Pathogen infiziert, so können Gedächtnis-B-Zellen dazu beitragen, eine schnelle sekundäre Immunantwort auszulösen. Gedächtnis-B-Zellen lassen sich im Vergleich zu naïven B-Zellen durch geringere Mengen Antigen reaktivieren, was u. a. in einer gesteigerten Differenzierung zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen resultiert (Bullock und Rittenberg, 1970; Good *et al.*, 2009; Tangye *et al.*, 2003; zur Übersicht: Radbruch *et al.*, 2006;).

Da die relative Anzahl von Gedächtnis-B-Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl der Milzzellen einer Maus sehr gering ist (Anderson *et al.*, 2007), und keine eindeutigen Marker zur Identifizierung dieser Subpopulation zur Verfügung stehen, ist die Charakterisierung dieser Zellen Gegenstand der aktuellen Forschung.

2.3 Internalisierung, Prozessierung und Präsentation von Antigenen

Die Aufnahme von extrazellulären Bestandteilen nimmt eine wichtige Funktion bei der Einleitung einer Abwehrreaktion des Organismus gegen Pathogene ein. Nahezu jeder Zelltyp kann extrazelluläre Antigene mit unterschiedlicher Effizienz aufnehmen, prozessieren und T-Zellen präsentieren (Malissen *et al.*, 1984). Die Gruppe der „professionellen“ Antigen-präsentierenden Zellen (APC), die Antigene mit hoher Effizienz T-Zellen präsentieren und diese durch Freisetzung von kostimulatorischen Molekülen aktivieren, umfasst drei Mitglieder: Dendritische Zellen (DC), Makrophagen (MØ) und

B-Lymphocyten (Robadey *et al.*, 1996, zur Übersicht: Mellman *et al.*, 1998; Schneider und Sercarz, 1997).

2.3.1 Struktur von MHC-Molekülen

Die in Klasse I und II unterteilten MHC-Moleküle interagieren mit intrazellulär prozessierten Antigen-Peptiden. Erstmals konnte Peter Gorer die nach Tumorübertragung bei Mäusen induzierte Abstoßungsreaktion mit der Anwesenheit bestimmter Antigene in Verbindung bringen (Gorer, 1936). Beim Menschen wurden ähnliche Transplantationsstudien von Snell durchgeführt, die akute bzw. chronische Abstoßungsreaktionen mit der Beteiligung von *minor* bzw. *major histocompatibility genes* assoziierte (Snell, 1948). Die Analysen waren wichtige Vorarbeiten für die Beschreibung der humanen MHC-Moleküle (Dausset, 1958; Payne *et al.*, 1964; van Rood und van Leeuwen, 1963; zur Übersicht: Dausset, 1981).

Die Kristallstruktur von MHC I- bzw. MHC II-Molekülen wurde 1987 bzw. 1993 erstmalig beschrieben (Bjorkman *et al.*, 1987; Brown *et al.*, 1993). MHC I-Moleküle bestehen aus einer 43 kDa α -Peptidkette, die eine Transmembranregion enthält, und einer 10 kDa β 2-Mikroglobulin-Einheit, die nicht kovalent mit der α -Kette assoziiert vorliegt (siehe Abb. 2.1). Die α -Kette besitzt 3 Domänen (α 1- α 3), die im MHC-Lokus auf Chromosom 6 des Menschen codiert sind (zur Übersicht: Le Bouteiller, 1994). Die Untereinheiten α 1 und α 2 bilden einen Spalt in der Oberfläche des MHC I-Moleküls, der Peptide von 8-10 Aminosäuren binden kann. Aufgrund der polymorphen Beschaffenheit des MHC I-Genlokus entstehen vielfältige Möglichkeiten, unterschiedlichste Peptide auf MHC I-Molekülen zu binden (Falk *et al.*, 1991; Madden *et al.*, 1992; zur Übersicht: Lehner und Cresswell, 1996; Rammensee, 1995)

MHC II-Moleküle sind aus einer α - bzw. β -Polypeptidkette aufgebaut, die jeweils aus zwei Untereinheiten (α 1, α 2 bzw. β 1, β 2) bestehen. Beide Ketten weisen Transmembranregionen auf und sind glykosyliert. Der aus α 1 und β 2 gebildete Spalt dient der Bindung von Peptiden, die mindestens 13 Aminosäuren umfassen. Ohne gebundenes Peptid, sind MHC II-Moleküle, genauso wie MHC I-Moleküle, instabil (Fremont *et al.*, 1996; Rudensky *et al.*, 1991; zur Übersicht: Madden, 1995; Rammensee, 1995).

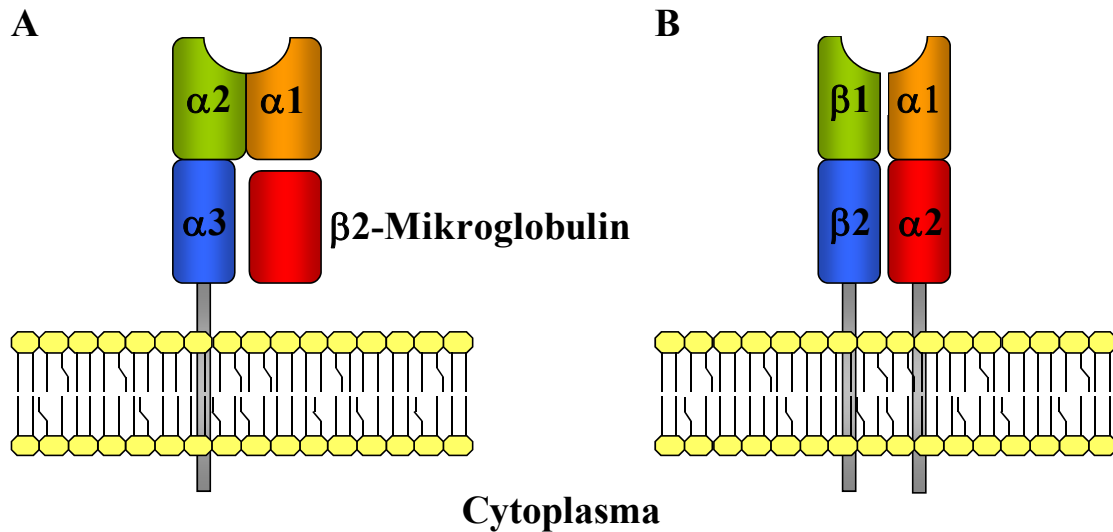


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der MHC I- bzw. MHC II-Moleküle

Schematisch dargestellt ist das MHC I-Molekül bestehend aus den Domänen $\alpha 1$ (orange), $\alpha 2$ (grün), $\alpha 3$ (blau) und dem $\beta 2$ -Mikroglobulin (rot). Das MHC I-Molekül wird über eine Transmembranregion in der Plasmamembran verankert. Der Peptid-bindende Spalt wird aus den Domänen $\alpha 1$ und $\alpha 2$ gebildet (A). Das durch eine Transmembranregion in der Plasmamembran verankerte MHC II-Molekül besteht aus einer α - und β -Polypeptid-Kette, die aus den Domänen $\alpha 1$ (rot) und $\alpha 2$ (orange) bzw. $\beta 1$ (grün) und $\beta 2$ (blau) aufgebaut sind. Die Peptid-Bindung erfolgt über die Domänen $\alpha 1$ und $\beta 2$ (B).

2.3.2 Internalisierung von Antigenen durch APC

Antigene werden durch APC internalisiert, prozessiert und als Peptide gemeinsam mit *major histocompatibility complex* (MHC)-Molekülen auf der Zelloberfläche von APC präsentiert (zur Übersicht: Jensen, 2007). Die zwei großen Klassen von MHC-Proteinen führen diese Aufgabe unterschiedlich aus. MHC I-Moleküle präsentieren Peptide von intrazellulären Pathogenen, wie Viren oder intrazellulären Bakterien, cytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen (zur Übersicht: Hansen und Bouvier, 2009). MHC II-Proteine sind für die Präsentation von extrazellulären Antigenen verantwortlich, die eine Aktivierung von $CD4^+$ T-Zellen bewirken können (zur Übersicht: Jensen, 2007).

APC verfügen über verschiedene Mechanismen, extrazelluläres Antigen zu internalisieren. Es lassen sich aufgrund der Größe des Antigens oder des Internalisierungsmechanismus generell vier Typen von Endocytose unterscheiden, die Makropinocytose, die Phagozytose, die Clathrin-abhängige Rezeptor-vermittelte und die Clathrin-unabhängige *Caveolae*-vermittelte Endocytose (zur Übersicht: Conner und Schmid, 2003; Mellman, 1996; Sandvig *et al.*, 2008).

Makropinocytose ist ein Prozess bei dem Membranausbuchtungen miteinander verschmelzen und die in der flüssigen Phase befindlichen Stoffe, wie z. B. Antigene, internalisieren (zur Übersicht: Norbury *et al.*, 2006). In unreifen DC bzw. möglicherweise MØ konnte in *ex vivo* Studien die Internalisierung von löslichem Antigen durch Makropinocytose beobachtet werden (Garrett *et al.*, 2000; Sallusto *et al.*, 1995; West *et al.*, 2000). In reifen DC ist der Makropinocytose-Mechanismus inhibiert (Garrett *et al.*, 2000). Makropinocytose von Antigenen *in vivo* durch unreife DC und MØ konnte bei der Injektion von löslichen Antigenen in Mäuse nachgewiesen werden (Delamarre *et al.*, 2005; zur Übersicht: Aderem und Underhill, 1999). Im Gegensatz dazu besitzen B-Lymphocyten eine geringere Makropinocytoserate. Injektionen geringer Dosen von Antigenen ließen keine Antigeninternalisierung bzw. Präsentation erkennen (Itano *et al.*, 2003). Erst die intravenöse Gabe hoher Konzentrationen von *hen egg lysozyme* (HEL) führte zu einer Präsentation von HEL-spezifischem Antigen (Zhong *et al.*, 1997).

Die Phagocytose ist ein Mechanismus zur Internalisierung großer, partikulärer Antigene. DC bzw. MØ können Antigene wie apoptotische Zellen oder Mikroben phagozytieren (Huang *et al.*, 2000; Inaba *et al.*, 1998; Reis e Sousa *et al.*, 1993; zur Übersicht: Carbone und Heath, 2003). Die Aufnahme von Bestandteilen apoptotischer Zellen deutet darauf hin, einen wichtigen Mechanismus zur Induktion immunologischer Toleranz darzustellen und ermöglicht es APC, Pathogene zu prozessieren, die nicht direkt APC infizieren (Fleeton *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2000; zur Übersicht Fonteneau *et al.*, 2002; Ravichandran, 2003).

Ein zusätzlicher Mechanismus zur Aquirierung von Antigenen stellen Oberflächenrezeptoren auf APC dar. Die Verwendung von Rezeptoren besitzt die Vorteile, dass die entsprechende APC geringe Mengen Antigen durch spezifische Rezeptor:Pathogen-Wechselwirkungen aufkonzentrieren und eine gezielte Aktivierung zellulärer Mechanismen zur Beseitigung des Antigens induzieren kann (zur Übersicht: Lanzavecchia, 1990). Beispiele von auf DC exprimierten Rezeptoren, die Antigene zur MHC-vermittelten Prozessierung internalisieren, stellen die auf MØ exprimierten *scavenger receptors* (SR) und die auf DC befindlichen Mannose-Rezeptoren (MR) dar. SR endocytieren modifiziertes *low-density lipoprotein* (LDL) (Kodama *et al.*, 1988; Kodama *et al.*, 1990), während MR lösliche Antigene, wie das Modellantigen Ovalbumin (OVA) binden und internalisieren können (Burgdorf *et al.*, 2007; Dasgupta *et al.*, 2007; He *et al.*, 2007; McKenzie *et al.*, 2007). Eine Prozessierung von extrazellulären MR-gebundenen Antigenen für die Präsentation auf MHC I-Molekülen wurde durch Burgdorf *et al.* nachgewiesen (Burgdorf *et al.*, 2007; Burgdorf *et al.*, 2008). Rezeptoren, die repetitive

Muster auf Pathogenen erkennen, stellen *toll-like receptors* (TLR) dar. Die Bindung von Antigenen durch TLR kann zur Präsentation auf MHC-Molekülen führen (Hayashi *et al.*, 2001).

2.3.3 Prozessierung und Präsentation von Antigenen auf MHC II-Molekülen

Von APC internalisierte Antigene werden dem „Endocytoseweg“ zugeführt. Dieser besteht aus verschiedenen, vom pH-Wert unterscheidbaren Organellen, den frühen Endosomen (pH 6,5-6,8), den späten Endosomen (pH 5,0-6,0) und den Lysosomen (pH \leq 4,5). Dadurch besitzt jede Organelle unterschiedliche Fähigkeiten, Proteinkomplexe aufzulösen und zu recyceln bzw. Proteine zu degradieren (zur Übersicht: Piper und Katzmann, 2007). Mit dem Absinken des pH-Werts werden Proteasen aktiviert, die die zu prozessierenden Proteine in Peptide spalten. Proteine die für eine Degradierung vorgesehen sind, werden ausgehend von späten Endosomen in intraluminale Vesikel sortiert. In den aus mehreren Vesikeln bestehenden multi-vesikulären Strukturen (MVB) ist der *endosomal complex required for transport* (ESCRT) für die Erkennung und Sortierung der Ubiquitin-markierten Proteine in MVB zuständig (Katzmann *et al.*, 2001; zur Übersicht: Piper und Katzmann, 2007). Der Mechanismus, welcher MVB und MHC II-Moleküle assoziiert, ist ungeklärt. Es konnte gezeigt werden, dass unbeladene MHC II-Moleküle als auch MHC II:Peptid-Komplexe in lysosomale, multivesikuläre Kompartimente geschleust werden, um bei der stattfindenden Proteolyse von Antigenen mit Peptiden beladen zu werden (Kleijmeer *et al.*, 1997; Kleijmeer *et al.*, 2001; Peters *et al.*, 1995; Romagnoli *et al.*, 1994).

2.3.4 Assemblierung, Beladung und Transport von MHC II-Molekülen

Die Assemblierung von MHC II-Molekülen, bestehend aus einer α - und β -Kette, findet im ER statt. Ein Chaperon-Protein, die *invariant chain* (Ii), dient als Stabilisator des $\alpha\beta$ -Heterodimers und verhindert die inkorrekte Bindung von Peptiden in der MHC II-Peptidbindefalte (Stockinger *et al.*, 1989). Der Komplex aus $(\alpha\beta:Ii)_3$ gelangt über den Golgi-Apparat und das trans-Golgi-Netzwerk (TGN) mittels des „Endocytosewegs“ in MVB (Bénaroch *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1998; Roche *et al.*, 1991; Warmerdam *et al.*, 1996). Eine alternative Route für neu synthetisiertes MHC II:Ii wurde in der Literatur beschrieben und führt über das TGN zur Plasmamembran. MHC II:Ii-Komplexe in der Membran werden internalisiert und gelangen in lysosomale MVB (Bremnes *et al.*, 1994; Ong *et al.*, 1999; Roche *et al.*, 1993). Zwei Leucin-basierte Sortierungsmotive im C-Terminus von Ii interagieren unabhängig voneinander mit den Adapter-Proteinen (AP)

-1 und AP-2 (Hofmann *et al.*, 1999; Radionov und Bakke, 1998). Generell dirigiert AP-1 Proteine vom TGN zu späten Endosomen bzw. Lysosomen, während AP-2 für den Transport zwischen Plasmamembran und frühen Endosomen verantwortlich ist (Dugast *et al.*, 2005; zur Übersicht: Sandoval und Bakke, 1994). Die Proteolyse von Ii in MVB durch Proteasen wie Cathepsin L bzw. S führt zur Entstehung des Peptids *class-II-associated invariant chain peptide* (CLIP) in der MHC II-Peptidbindefalte (Driessen *et al.*, 2001; Honey *et al.*, 2002; zur Übersicht: Honey und Rudensky, 2003; Hsing und Rudensky, 2005).

Der Mechanismus, der die Rekrutierung von MHC II:Peptid-Komplexen aus lysosomalen MVB an die Plasmamembran reguliert, ist weitgehend unbekannt. Die Komplexe werden ausgehend von MVB in tubuläre Vesikel geladen, die direkt mit der Plasmamembran fusionieren (Chow *et al.*, 2002). Poloso *et al.* konnten zeigen, dass MHC II-Moleküle in Cholesterin- bzw. Sphingolipid-reichen Plasmamembran-Mikrodomänen, den *lipid rafts*, vorliegen (Poloso *et al.*, 2004). Bei der Assoziation von APC mit T-Zellen werden *lipid rafts* und MHC II:Peptid-Komplexe zur Kontaktseite der Zellen verlagert (Hiltbold *et al.*, 2003; zur Übersicht: Vogt *et al.*, 2002).

MHC II:Peptid-Komplexe auf der Zelloberfläche von APC können durch die E3 Ubiquitin-Ligase *membrane-associated ring finger-CH* (MARCH) 1 sowohl in B-Lymphocyten als auch in DC ubiquitinyliert werden. Einige Studien deuten darauf hin, dass die Ubiquitinylierung die Endocytose von MHC II-Molekülen direkt reguliert (Matsuki *et al.*, 2007; Ohmura-Hoshino *et al.*, 2006; Shin *et al.*, 2006; van Niel *et al.*, 2006). Während die Internalisierung von MHC II:Ii-Komplexen auf der Zelloberfläche durch Clathrin und AP-2 vermittelt wird, werden Peptid-beladene MHC II-Moleküle durch einen Clathrin-unabhängigen Endocytosemechanismus gesteuert. An diesem Prozess sind die kleinen GTPasen *ADP-ribosylation factor* (Arf) 6 und Rab35 maßgeblich beteiligt und sind für das Recycling beladener MHC II-Moleküle in MVB verantwortlich (Walseng *et al.*, 2008; zur Übersicht: Somsel Rodman und Wandinger-Ness, 2000).

2.4 Kreuzpräsentation von extrazellulären Antigenen auf MHC I-Molekülen

Neben der klassischen Präsentation von extrazellulärem Antigen auf MHC II-Molekülen zur Induktion einer CD4⁺ T-Zell-Antwort existiert ein weiterer Weg, wie APC extrazelluläre Antigene T-Lymphocyten präsentieren können. Bevan prägte den Begriff des *cross priming* im Zusammenhang mit der Präsentation von *minor histocompatibility*-Antigenen von Spenderzellen auf APC eines Empfängers. Um den Unterschied zwischen

einer T-Zell-Aktivierung durch die Spenderzellen selbst und den Antigen-beladenen APC zu verdeutlichen, wurde der Begriff der Kreuzpräsentation eingeführt (Bevan, 1976a; Bevan, 1976b). In der aktuellen Literatur wird der Begriff der Kreuzpräsentation im Zusammenhang mit der Beladung von extrazellulären Antigenen auf MHC I-Molekülen von APC, die daraufhin cytotoxische T-Zellen aktivieren können, verwendet (Brossart und Bevan, 1997; Jondal *et al.*, 1996; Rock *et al.*, 1990; zur Übersicht: Villadangos *et al.*, 2007). Durch diesen Mechanismus gelingt es dem Immunsystem Pathogene, vorwiegend Viren, zu eliminieren, die nicht direkt APC infizieren (Sigal *et al.*, 1999; Rensing *et al.*, 1995). Die Kreuzpräsentation scheint auch für die Toleranzinduktion gegenüber körpereigenen Antigenen verantwortlich zu sein (Kurts *et al.*, 1996; Kurts *et al.*, 1997).

Kreuzpräsentation konnte in DC, MØ und B-Lymphocyten *in vitro* nachgewiesen werden (Ke und Kapp, 1996; Norbury *et al.*, 1995; Norbury *et al.*, 1997). Unterschiedliche Endocytoseprozesse spielen bei der Aufnahme von Antigenen zur Kreuzpräsentation eine Rolle. So wurde in verschiedenen Studien sowohl Makropinocytose bzw. Phagozytose als auch die Rezeptor-vermittelte Endocytose via *clathrin-coated vesicles* (CCV) als Mechanismus zur Aufnahme kreuzpräsentierten Antigens nachgewiesen (Bonifaz *et al.*, 2004; Delamarre *et al.*, 2003; Rodriguez *et al.*, 1999; zur Übersicht: Ackerman und Cresswell, 2004; Steinman *et al.*, 1999). MR, die auf DC exprimiert werden, konnten kürzlich in *In-vitro*-Studien mit dem Modellantigen bzw. Ligand OVA als Initiatoren für die Kreuzpräsentation identifiziert werden (Burgdorf *et al.*, 2006; Burgdorf *et al.*, 2008). OVA:MR-Komplexe wurden in frühe endosomale Strukturen transportiert. Eine Verbindung zum ER, in dem endogenes Antigen auf MHC I-Moleküle geladen wird, fand bei der MR-vermittelten Kreuzpräsentation nicht statt (Burgdorf *et al.*, 2008).

Als ein alternativer Mechanismus zur Beladung von MHC I-Molekülen mit extrazellulärem Antigen in frühen Endosomen wird in der Literatur der Transport von Antigenen ins Cytoplasma mit anschließender Degradation durch cytosolische Proteasen diskutiert. In einem nächsten Schritt gelangen die Peptide in das ER und werden von der MHC I-Maschinerie prozessiert und an der Oberfläche präsentiert (zur Übersicht: Koch und Tampé, 2006).

2.5 Die Adapterproteine mAbp1 und HS1

Damit APC die oben genannten Vorgänge zeitlich und räumlich koordinieren können, ist das Zusammenwirken einer ganzen Reihe von Effektorproteinen notwendig. Die

Verknüpfung dieser Effektoren wird durch den Einsatz von Adapterproteinen gewährleistet.

Zwei Adapterproteine, die mit einer Vielzahl von Bindepartnern an zellulären Vorgängen, wie der Reorganisation des Cytoskeletts, Endocytoseprozessen, als auch der Antigenrezeptor-initiierten Signalweiterleitung in Zellen hämatopoietischen Ursprungs teilnehmen, sind *mammalian actin-binding protein 1* (mAbp1) und *hematopoietic lineage cell-specific protein 1* (HS1) (Connert *et al.*, 2006; Gomez *et al.*, 2006; Hao *et al.*, 2005; Larbolette *et al.*, 1999; Kessels *et al.*, 2000; Kessels *et al.*, 2001; Onabajo *et al.*, 2008; Uruno *et al.*, 2003; Yamanashi *et al.*, 1993).

2.5.1 Das Adapterprotein mAbp1



▲ Tyrosin-Phosphorylierungsmotiv ∴ Caspase-Schnittstelle

Abb. 2.2: Schematische Darstellung des Adapterproteins mAbp1

Schematisch dargestellt sind die *actin-depolymerizing factor homology* (ADF-H)-Domäne (blau), die *coiled-coil*-Domäne (rot), die Prolin-reiche-Region (gelb) und die Src-homology 3 (SH3) -Domäne (Larbolette *et al.*, 1999; Kessels *et al.*, 2000).

Larbolette *et al.* charakterisierten 1999 das Adapterprotein mAbp1, das nach BCR-Stimulation Tyrosin-phosphoryliert wird und dessen cDNA erstmals 1996 als SH3 domain-containing protein 7 (sh3p7) identifiziert wurde (Larbolette *et al.*, 1999; Sparks *et al.*, 1996). Strukturelle Ähnlichkeit bestehen mit dem orthologen Protein Abp1p aus *Saccharomyces cerevisiae* bzw. dem durch Ensenat *et al.* beschriebenen humanen *hematopoietic progenitor kinase 1-interacting protein of 55 kDa* (Hip-55) (Drubin *et al.*, 1988; Ensenat *et al.*, 1999; zur Übersicht: Daly, 2004; Olazabal und Machesky, 2001). Das aus 433 Aminosäuren bestehende mAbp1 weist strukturell eine N-terminal befindliche *actin-depolymerizing factor homology* (ADF-H)- bzw. SCAD-Domäne, als Akronym für die in SH3P7, Coactosin, Abp1p und Drebrin vorkommende Struktur, auf (de Hostos *et al.*, 1993; Larbolette *et al.*, 1999; Quintero-Monzon *et al.*, 2005; Shirao *et al.*, 1988; Xu und Stamnes, 2006). mAbp1 wird zentral von einer *coiled-coil* Domäne gefolgt von einer Prolin-reichen Region mit putativen SH3-Domänen-Bindemotiven (PXXP) sowie zwei Tyrosin-Phosphorylierungsmotiven mit der Konsensussequenz YXXP an den Positionen

337 bzw. 347 aufgebaut (Larbolette *et al.*, 1999). An Position 361 ist eine Caspase-Schnittstelle mit der Sequenz EHID lokalisiert (Chen *et al.*, 2001) (siehe Abb. 2.2). C-terminal befindet sich eine SH3-Domäne, die starke Sequenzähnlichkeit mit den SH3-Domänen der Cytoskelett-assoziierten Proteine Cortactin bzw. HS1 aufweist (Kessels *et al.*, 2000; Kitamura *et al.*, 1989; Larbolette *et al.*, 1999; Schuurin *et al.*, 1992; Wu und Parsons; 1993; zur Übersicht: Weed und Parsons, 2001).

Expressionsanalysen von mAbp1 in verschiedenen Geweben deuten darauf hin, dass mAbp1 nahezu ubiquitär exprimiert wird (Ensenat *et al.*, 1999; Larbolette *et al.*, 1999; Kessels *et al.*, 2000). In der Maus bzw. Ratte konnten eine bzw. vier Isoformen des Proteins nachgewiesen werden (Kessels *et al.*, 2000; Yamazaki *et al.*, 2001).

2.5.1.1 Die Funktion von mAbp1 in dynamischen Prozessen der Aktin-Cytoskelett-Reorganisation

Dem Adapterprotein mAbp1 konnten seit seiner Erstcharakterisierung in B-Lymphocyten eine Reihe zellulärer Funktionen und unterschiedliche Interaktionspartner zugeordnet werden. So ist mAbp1 sowohl aufgrund der ADF-H- als auch der *coiled-coil*-Domäne in der Lage, filamentöses Aktin zu binden (Larbolette *et al.*, 1999; Kessels *et al.*, 2000). Die Reorganisation des Cytoskeletts wird von dem *actin-related protein 2/3*-Komplex durch die Bildung neuer F-Aktin-Verzweigungen reguliert (zur Übersicht: Goley und Welch, 2006). An dieser Regulation sind *nucleation promoting factors* (NPFs) der Klasse I bzw. II beteiligt. Zur Klasse I werden alle NPFs gezählt, die eine *Wiskott Aldrich syndrome protein* (WASP) *homology 2* (WH2)-Domäne besitzen und monomeres Aktin binden. Gleichzeitig enthalten diese Proteine der WASP- bzw. *suppressor of cyclic AMP repressor/WASP-family verprolin-homologous protein* (SCAR/WAVE)-Familien eine acide Region, die direkt mit dem *actin-related protein* (Arp) 2/3-Komplex interagiert. Die Klasse II NPFs besitzen wie die Klasse I NPFs eine Arp2/3-Bindestelle und binden im Gegensatz filamentöses Aktin. Zur Klasse II zählen die Proteine Cortactin, Abp1p und Pan1p (Duncan *et al.*, 2001; zur Übersicht: Goley und Welch, 2006). Da mAbp1 keine acide Region zur Assoziation mit dem Arp2/3-Komplex besitzt, kann es nicht direkt auf die Aktin-Polymerisierung Einfluss nehmen. In früheren Studien wurde eine indirekte Steuerung der F-Aktin-Dynamik durch mAbp1 aufgrund der Kollokalisierung beider Proteine postuliert. (Kessels *et al.*, 2000; Mise-Omata *et al.*, 2003). Diese Vermutung wurde durch den Nachweis der Interaktion der SH3-Domäne von mAbp1 mit dem Klasse I NPF *neural WASP* (N-WASP) bestätigt (Larbolette *et al.*, 1999; Pinyol *et al.*, 2007). Eine

indirekte Steuerung des Aktin-Cytoskeletts durch mAbp1 kann ebenso über die SH3-Domänen-abhängige Rekrutierung des *faciogenital dysplasia protein 1* (Fgd1) erfolgen, das einen *guanine nucleotide exchange*-Faktor (GEF) für die kleine GTPase Cdc42 darstellt (Hou *et al.*, 2003). Cdc42 kann über N-WASP die Arp2/3-vermittelte Aktin-Polymerisierung beeinflussen (Rohatgi *et al.*, 1999). Eine wichtige Funktion übernimmt Cdc42 bei der Steuerung des anterograden Proteintransports vom ER zum Golgi (Wu *et al.*, 2000). Fucini *et al.* konnten eine Involvierung von Cdc42 und mAbp1 in die Arf1-vermittelte Aktin-Polymerisierung am Golgi und den anterograden Transport von Membranvesikeln nachweisen (Fucini *et al.*, 2000, Fucini *et al.*, 2002). Einfluss auf den Vesikel-Transport besitzt mAbp1 ebenfalls in Neuronen, in denen es das synaptische Vesikel-Recycling steuert (Connert *et al.*, 2006).

Eine wichtige Funktion erfüllt mAbp1 bei der Initiierung von Endocytose-Ereignissen an der Plasmamembran (Connert *et al.*, 2006; Kessels *et al.*, 2001; Mise-Omata *et al.*, 2003; Onabajo *et al.*, 2008). Ein zellulärer Endocytose-Mechanismus stellt die Clathrin-vermittelte Endocytose dar (zur Übersicht: Traub, 2009). Durch die Interaktion von mAbp1 mit der schweren Kette von Clathrin konnte erstmals eine mögliche Involvierung von mAbp1 in diesen „Endocytoseweg“ beschrieben werden (Larbolette, 2000, Connert, 2003, Wienand, 2006). Anhand von Interaktionsstudien mit der SH3-Domäne von mAbp1 wurden mit der GTPase Dynamin und dem ebenfalls in diesen Prozess involvierten Adapterprotein *huntingtin-interacting protein 1-related* (Hip1R) zwei weitere Bindepartner identifiziert (Connert, 2003; Kessels *et al.*, 2001; Le Clainche *et al.*, 2007; zur Übersicht Hinshaw, 2000). Die Involvierung von mAbp1 in die Rezeptor-vermittelte Endocytose, speziell in die Internalisierung des Transferrin-Rezeptors und des BCR, untermauern, dass das Adapterprotein eine wichtige Funktion während dieser Ereignisse zukommt (Connert *et al.*, 2006; Kessels *et al.*, 2001; Mise-Omata *et al.*, 2003; Onabajo *et al.*, 2008). Kessels *et al.* zeigten, dass nach der Überexpression der SH3-Domäne von mAbp1 in Cos-Zellen die Transferrin-Internalisierung inhibiert wurde, während eine gleichzeitige Überexpression von Dynamin diesen Effekt neutralisierte (Kessels *et al.*, 2001). Eine Bedeutung von mAbp1 während Clathrin-unabhängiger Endocytose-Mechanismen wurde bisher nicht beobachtet. So wird zum Beispiel die Clathrin-unabhängige Internalisierung des *common γ -cytokine receptors* von mAbp1 nicht beeinflusst (Sauvonnet *et al.*, 2005).

Einen weiteren wichtigen Endocytose-Mechanismus, der neuesten Studien zufolge durch mAbp1 beeinflusst wird, stellt die β 2-Integrin-vermittelte Phagozytose von Serumopsonisierten *E.coli* in Neutrophilen dar (Schymeinsky *et al.*, 2009). Des Weiteren konnte

durch die Abwesenheit von mAbp1 gezeigt werden, dass das Adapterprotein die Neutrophilen-Adhäsion und Leukocyten-Extravasation steuert (Schymeinsky *et al.*, 2009). Die SH3-Domäne von mAbp1 wird durch die Caspase 3 katalysierte Spaltung vom Rest des Proteins isoliert (Chen *et al.*, 2001). Eine wichtige Funktion von Caspasen besteht in der Einleitung der Apoptose einer Zelle (zur Übersicht: Opferman, 2008; Tsubata, 2001). Die Abspaltung der SH3-Domäne von mAbp1 könnte dazu beitragen, die Aktin-Reorganisation bzw. Endocytose-Mechanismen während apoptotischer Prozesse zu regulieren bzw. terminieren.

2.5.1.2 Einfluss von mAbp1 auf die Antigenrezeptor-induzierte Signalweiterleitung

Wie erwähnt, wurde das Adapterprotein mAbp1 als Substrat von PTK nach BCR-Stimulation identifiziert und könnte aufgrund seiner Bindeeigenschaften mit Signaltransduktion-, Aktin- bzw. Endocytose-assoziierten Proteinen eine verknüpfende Funktion zwischen BCR-Signalweiterleitung und Cytoskelett-Reorganisation wahrnehmen (Connert *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2005; Kessels *et al.*, 2000; Kessels *et al.*, 2001; Larbolette *et al.*, 1999; Le Bras *et al.*, 2004; Onabajo *et al.*, 2008). PTK, die nachweislich mAbp1 Tyrosin-phosphorylieren können, stellen Syk, Lyn, Blk, Lck bzw. Fyn dar (Larbolette *et al.*, 1999; Larbolette, 2000). Auch in humanen T-Zellen konnte eine Tyrosin-Phosphorylierung durch die PTK *zeta-chain-associated protein kinase 70* (ZAP-70) nachgewiesen werden (Chan *et al.*, 1991; Han *et al.*, 2003). Eine mögliche Assoziation von mAbp1 und Fyn könnte über die in Makrophagen nachgewiesene Interaktion von mAbp1 mit *Fyn binding protein* (Fyb) erfolgen (da Silva *et al.*, 1997; Yuan *et al.*, 2005). In T-Zellen kann Fyb mit den Cytoskelett-assoziierten Proteinen Arp2/3, Vav1 bzw. WASP und den Adapterproteinen Nck bzw. SLP-76 einen Komplex nach Antigenrezeptor-Stimulation eingehen, der über mAbp1 möglicherweise in Bezug auf die Verknüpfung von Aktin-Reorganisation und Signalweiterleitung beeinflusst werden kann (Krause *et al.*, 2000; Peterson *et al.*, 2001; Veale *et al.*, 1999; Yuan *et al.*, 2005; zur Übersicht: Griffiths und Penninger, 2002). Die Auswirkungen einer mAbp1-Defizienz in T-Zellen der Maus äußern sich in einer inhibierten T-Zell-Proliferation, Cytokin-Produktion und einer reduzierten Expression kostimulatorischer Proteine nach TCR-Stimulation (Han *et al.*, 2005). Ein Defekt der TCR-vermittelten Signalweiterleitung über PLC- γ 1 konnte ebenfalls gezeigt werden (Han *et al.*, 2005). Die mAbp1-Defizienz führte zu Fehlsteuerungen während der Aktivierung der *hematopoietic progenitor kinase 1* (HPK1) bzw. *c-Jun N-terminal kinase* (JNK). Dadurch konnte gezeigt werden, dass die nachgewiesene

Interaktion der SH3-Domäne von mAbp1 mit HPK1 von Bedeutung für die Funktion der T-Zell-Signalweiterleitung ist (Ensenat *et al.*, 1999; Han *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2005). Da mAbp1 nach TCR-Stimulation in *lipid rafts* lokalisiert ist (Han *et al.*, 2003, Le Bras *et al.*, 2004), könnte möglicherweise der über mAbp1 und Aktin vermittelte Transport von signalleitenden Proteinen gestört sein.

2.5.2 Das Adapterprotein HS1



▲ Tyrosin-Phosphorylierungsmotiv

Abb. 2.3: Schematische Darstellung des Adapterproteins HS1

Dargestellt ist die N-terminale azide Region (NTA, blau), die aus 3,5 helix-turn-helix (HTH)-Motiven bestehende F-Aktin-bindende Region (orange), eine coiled-coil-Domäne (rot), ein Prolin-reicher Bereich (gelb) und eine C-terminal befindliche SH3-Domäne (grün). Zwei Tyrosin-Phosphorylierungsmotive (schwarze Dreiecke) sind zwischen der Prolin-reichen Domäne und der SH3-Domäne lokalisiert (Kitamura *et al.*, 1989; Kitamura *et al.*, 1995).

Die cDNA kodierend für HS1 aus der Maus wurde 1995 erstmalig kloniert und beschrieben (Kitamura *et al.*, 1995). Das *hs1*-Gen der Maus ist auf Chromosom 16 lokalisiert. Maus-HS1 weist eine 84 %ige Aminosäure-Sequenzhomologie zu seinem bereits 1989 bei einem cDNA *library screening* entdeckten humanen Ortholog auf (Kitamura *et al.*, 1989). HS1 aus der Maus besteht wie das humane Ortholog aus 486 Aminosäuren und wurde als 75 kDa-Protein identifiziert (Yamanashi *et al.*, 1993). Die Detektion von mRNA als auch der Nachweis der Proteinexpression beschränkte sich sowohl für humanes HS1 als auch für HS1 aus der Maus auf Zellen hämatopoietischen Ursprungs, wie myeloide und lymphoide Gewebe, periphere Lymphocyten aus dem Blut, Granulocyten und MØ (Kitamura *et al.*, 1989; Kitamura *et al.*, 1995). Neuere sensitive Analysen der mRNA zeigen eine Expression von *hs1* in Geweben nicht hämatopoietischen Ursprungs auf, wie in diversen humanen Tumorgeweben und in gesundem Lungengewebe (Fischer *et al.*, 2005).

Die Domänenstruktur von HS1 (siehe Abb. 2.3) weist N-terminal eine azide Region (NTA) auf, die über das konservierte Aminosäure-Motiv DDW mit dem Arp2/3-Komplex interagieren kann (Urano *et al.*, 2003). Durch *In-vitro*-Experimente konnte eine schwache Arp2/3-abhängige Induktion der Aktin-Polymerisierung durch humanes HS1 gezeigt

werden. Ferner konnte demonstriert werden, dass HS1 die durch den Arp2/3-Komplex gesteuerte Verzweigung von F-Aktin unterstützt (Uruno *et al.*, 2003).

An die azide Region von HS1 schließt sich eine F-Aktin-bindende Domäne an, die 3,5 *helix-turn-helix* (HTH) -Motive mit jeweils 37 Aminosäuren als kalkulierte Sekundärstruktur enthält. Zusammen mit der in unmittelbarer Nähe befindlichen *coiled-coil* Region wird über diese beiden Domänen die Arp2/3-Komplex-vermittelte F-Aktin-Polymerisierung gesteuert. Durch die Deletion des HTH-Bereichs wird die Bindung zum Arp2/3-Komplex und F-Aktin destabilisiert (Hao *et al.*, 2005). Im Anschluss an die F-Aktin-bindenden Domänen befindet sich eine Prolin-reiche Region, die mit der SH3-Domäne von Lck interagiert (Takemoto *et al.*, 1995). C-terminal ist eine SH3-Domäne lokalisiert, die direkt mit der α -Untereinheit der Protein-Kinase CK2, dem HS1-bindenden Protein 3 (HS1BP3) und dem Protein *Lyn-interacting ankyrin repeat* (Liar) interagiert (Ruzzene *et al.*, 1999; Takemoto *et al.*, 1999; Samuels *et al.*, 2009). Diese SH3-Domäne weist in ihrer Aminosäuresequenz Ähnlichkeit mit der SH3-Domäne von mAbp1 und Cortactin auf (Daly, 2004; Kessels *et al.*, 2000; Weed und Parsons, 2001; Wu und Parsons, 1993).

Humanes HS1 bzw. das Ortholog aus der Maus besitzen mehrere bekannte Tyrosin-Phosphorylierungsmotive an den Positionen Tyr²²², Tyr³⁷⁸, Tyr³⁹⁷ bzw. Tyr³⁸⁸ und Tyr⁴⁰⁵ (Ruzzene *et al.*, 1996; Takemoto *et al.*, 1995; Yamanashi *et al.*, 1997). Die Assoziation von phosphoryliertem HS1 mit Mitgliedern der SH2-Domäne von Tyrosin-Kinasen der Src-Familie konnte *in vitro* gezeigt werden (Baumann *et al.*, 1994; Yamamoto *et al.*, 1993).

Humanes HS1 und HS1 aus der Maus besitzen zwei Regionen mit putativen Caspase-Schnittstellen. Die Motive mit der Konsensussequenz D/EXXD befinden sich in den N-terminalen F-Aktin-bindenden Domänen sowie C-terminal zwischen Prolin-reicher Region und SH3-Domäne. Zwei Schnittstellen sind in unmittelbarer Nähe zu Tyr³⁷⁸/Tyr³⁹⁷ in humanem HS1 bzw. Tyr³⁸⁸/Tyr⁴⁰⁵ in HS1 aus der Maus lokalisiert (Chen *et al.*, 2001).

Ein weiteres Bindemotiv, das in der F-Aktin-bindenden Region dreimal in jeweils einem HTH-Motiv vorhanden ist, stellt die PIP₂-bindende Konsensussequenz R/K YG V E R D R/K dar (He *et al.*, 1998).

2.5.2.1 Einfluss von HS1 auf die Antigenrezeptor-induzierte Signalweiterleitung

HS1 stellt eines der am stärksten Tyrosin-phosphorylierten Substrate nach Antigenrezeptor-Stimulation sowohl in humanen als auch in Lymphocyten aus der Maus

dar (Baumann *et al.*, 1994; Fusaki *et al.*, 1996; Hutchcroft *et al.*, 1998; Takemoto *et al.*, 1995; Yamanashi *et al.*, 1993, Yamanashi *et al.*, 1997). Nach BCR-Stimulation in humanen B-Zellen konnte mittels Koimmunpräzipitationen eine Assoziation von HS1 mit Ig- α /Ig- β Heterodimeren nachgewiesen werden (Hata *et al.*, 1994). Biochemische Studien zeigen, dass die Protein-Tyrosin-Kinase Syk und Proteine der Src-Familie wie Lyn, Fgr, Fyn und Lck an der Tyrosin-Phosphorylierung von HS1 beteiligt sind (Brunati *et al.*, 1999; Ruzzene *et al.*, 1996; Yamanashi *et al.*, 1993). Eine direkte Bindung von HS1 mit Lck oder Lyn konnte in T- und B-Lymphocyten bzw. erythroiden Zellen nachgewiesen werden (Ingleby *et al.*, 2000; Takemoto *et al.*, 1995; Takemoto *et al.*, 1996). Zur kompletten Phosphorylierung von HS1 werden sequenziell Tyr³⁸⁸/Tyr⁴⁰⁵ in HS1 der Maus bzw. Tyr³⁷⁸/Tyr³⁹⁷ in humanem HS1 durch Syk phosphoryliert, gefolgt von einer Tyrosin-Phosphorylierung von HS1 durch Mitglieder der Src-Familie an Tyr²²² (Ruzzene *et al.*, 1996; Takemoto *et al.*, 1996). Die Syk-vermittelte Tyrosin-Phosphorylierung von HS1 scheint im Gegensatz zur Src-Kinasen-abhängigen Phosphorylierung großen Einfluss auf die Translokation in *lipid rafts* nach BCR-Stimulation zu besitzen. HS1 liegt nach BCR-vermittelter Aktivierung gemeinsam mit Arp2/3, WASP und dem BCR in diesen Mikrodomänen vor (Hao *et al.*, 2004).

Eine wichtige Funktion kommt HS1 bei der Antigenrezeptor-vermittelten Apoptose von Lymphocyten zu. HS1 konnte als direktes Substrat der an apoptotischen Prozessen beteiligten Caspase-3 nachgewiesen werden (Chen *et al.*, 2001). Analysen mit HS1-defizienten B- bzw. T-Zellen aus der Maus zeigten nach BCR-Stimulation keine Induktion der Apoptose. (Taniuchi *et al.*, 1995). Gleichzeitig war die Antigenrezeptor-induzierte Proliferation von Lymphocyten aus der Milz in Abwesenheit von HS1 gestört (Taniuchi *et al.*, 1995). Der Einfluss von HS1 auf BCR-vermittelte Apoptose-Ereignisse konnte auch in Zellkulturexperimenten mit Apoptose-unempfindlichen Maus-B-Zellen gezeigt werden. Durch die Expression von HS1 in diesen Zellen konnte die Antigenrezeptor-initiierte Apoptose rekonstituiert werden (Fukuda *et al.*, 1995). Essentielle Aminosäuren scheinen bei diesen Prozessen die Tyr³⁷⁸ bzw. Tyr³⁹⁷ darzustellen, da entsprechende Tyr/Phe-Punktmutationen in humanem HS1 zur Insensitivität gegenüber BCR-vermittelten Apoptose-Ereignissen führen (Yamanashi *et al.*, 1997).

Eine Krankheit, bei der eine Fehlregulation BCR-vermittelter Signale auf die Entstehung autoreaktiver B-Lymphocyten hindeutet, stellt der Systemische *Lupus Erythematoses* (SLE) dar (Liossis *et al.*, 1996; zur Übersicht: Hostmann *et al.*, 2008; Doyle *et al.*, 2001). Genetische Studien mit SLE-erkrankten Patienten zeigten, dass eine aufgrund einer Exon-

Deletion entstandene Variante von HS1 in SLE-Patienten exprimiert wird (Sawabe *et al.*, 2003). Periphere humane B-Lymphocyten bzw. Maus-B-Zellen, die diese um einen HTH-Bereich verkürzte HS1-Variante exprimierten, wiesen nach BCR-Stimulation eine erhöhte Zelltodrate auf (Sawabe *et al.*, 2003). Eine in HS1 identifizierte polymorphe Region, die Glutamat-Prolin-Wiederholungen enthält, sowie zwei Aminosäuresubstitutionen (A235T und E361K), stehen ebenfalls in Verbindung mit dem Auftreten von SLE (Otsuka *et al.*, 2004). Die polymorphe Region befindet sich in der Nähe der Tyr³⁷⁸ bzw. Tyr³⁹⁷, die an der BCR-induzierten Apoptose beteiligt sind (Yamanashi *et al.*, 1997).

Die Tyrosin-Phosphorylierung von HS1 scheint in Zusammenhang mit dem Auftreten und dem Verlauf von chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) beim Menschen zu stehen. Konstitutiv phosphoryliertes HS1 konnte in Patienten mit einer schlechten Prognose nachgewiesen werden, während im Vergleich Patienten mit einer längeren, prognostizierten Überlebenszeit weniger Tyrosin-phosphoryliertes HS1 aufwiesen (Scielzo *et al.*, 2005).

2.5.2.2 Die Funktion von HS1 in dynamischen Prozessen der Aktin-Cytoskelett-Reorganisation

HS1 wurde ursprünglich als möglicher Transkriptionsfaktor beschrieben, da die HTH-Motive Ähnlichkeiten mit putativen DNA-Bindemotiven aufweisen und eine Lokalisation von HS1 im Zellkern nachgewiesen wurde (Kitamura *et al.*, 1989; Takemoto *et al.*, 1995; Yamanashi *et al.*, 1997). Später konnten diese HTH-Motive mit der Eigenschaft, F-Aktin zu binden, in Verbindung gebracht werden (Urano *et al.*, 2003). Die HTH-Motive wurden erstmals im strukturell verwandten Protein Cortactin nachgewiesen. Cortactin besitzt 6,5 HTH-Motive mit je 37 Aminosäuren und weist eine Sequenzhomologie der HTH-Regionen von 69 % zu HS1 aus der Maus auf (zur Übersicht Daly, 2004). Vergleichende genetische Studien von HS1 bzw. Cortactin zeigten, dass beide Proteine während der Evolution aus einer Gen-Duplikation hervorgegangen sind, infolgedessen HS1 zwei HTH-Wiederholungen verlor und Cortactin ein HTH-Motiv erwarb (van Rossum *et al.*, 2005).

Für Cortactin wurde beschrieben, dass die HTH-Regionen F-Aktin *in vitro* mit einer Dissoziationskonstante K_d von 0,4 μM binden können. (Wu und Parsons, 1993). Speziell für die vom N-Terminus vierte HTH-Wiederholung konnte eine direkte Bindung mit F-Aktin nachgewiesen werden (Weed *et al.*, 2000). Da HS1 kein viertes HTH-Motiv besitzt, war eine F-Aktin-Bindung zunächst nicht nachweisbar (He *et al.*, 1998). Erst durch Studien von Urano *et al.* konnte HS1 als moderater Bindepartner von F-Aktin, mit einer

Dissoziationskonstante K_d von 400 nM, identifiziert werden (Urano *et al.*, 2003). Durch das in HS1 vorhandene DDW-Motiv kann das Protein, ähnlich wie Cortactin, direkt mit dem Arp2/3-Komplex interagieren und ist indirekt für die Polymerisierung und Verzweigung von F-Aktin verantwortlich (Urano *et al.*, 2001; Urano *et al.*, 2003). Ergänzende Studien von Hao *et al.* zeigten, dass zusätzlich zu den HTH-Motiven die *coiled-coil* Region eine F-Aktin-Interaktion vermitteln kann und gemeinsam mit den HTH-Motiven die Arp2/3-vermittelte F-Aktin-Polymerisierung steuert (Hao *et al.*, 2005).

In humanen Blutplättchen konnte gezeigt werden, dass HS1 nach der Inhibierung der Thrombin-vermittelten Aktin-Polymerisierung durch Cytochalasin D keiner Tyrosin-Phosphorylierung unterliegt (Brunati *et al.*, 2005). Diese Daten deuten darauf hin, dass HS1 für seine Aktivierung und Funktionsausübung auf das Aktin-Cytoskelett angewiesen ist.

HS1 nimmt durch seine Fähigkeit, mit Aktin und dem Arp2/3-Komplex zu interagieren (Urano *et al.*, 2003), an wichtigen Prozessen der humoralen Immunantwort teil. Während der Ausbildung von T-Zell:B-Zell-Kontakten konnte in HS1-defizienten T-Zellen eine defekte F-Aktin-Akkumulation in der Nähe der „Immunologischen Synapse“ (IS) beobachtet werden (Gomez *et al.*, 2006). Wurden diese T-Zellen über den TCR stimuliert, konnten Gomez *et al.* zusätzlich zeigen, dass eine Ausbildung von instabilen F-Aktin-Strukturen erfolgte (Gomez *et al.*, 2006). Ein nach T-Zell-Aktivierung wichtiges Protein zur Steuerung von Aktin-Strukturen durch die Regulierung der kleinen GTPasen Rac1 bzw. Cdc42 stellt der Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Vav1 dar (Zeng *et al.*, 2003; zur Übersicht: Turner und Billadeau, 2002). Die kleinen GTPasen Rac1 bzw. Cdc42 wiederum steuern während der Formierung von T-Zell:APC-Kontakten die Aktin-regulierenden Proteine WAVE2 bzw. WASP (Cannon *et al.*, 2001; Nolz *et al.*, 2006). Gomez *et al.* konnten eine direkte Interaktion mit den phosphorylierten Tyr³⁷⁸/Tyr³⁹⁷ in HS1 und der SH2-Domäne von Vav1 nachweisen. Durch die Abwesenheit von HS1 kann Vav1 nicht zur IS rekrutiert werden (Gomez *et al.*, 2006). Diese Beobachtungen deuten auf eine koordinierte Funktionsweise beider Proteine während der Aktin-Reorganisation nach T-Zell-Aktivierung hin.

Die Tyrosin-Phosphorylierung von HS1 hat auch in Natürlichen Killer (NK)-Zellen einen Einfluss auf die Dynamik des Aktin-Cytoskeletts. Butler *et al.* beschrieben, dass phosphoryliertes Tyr³⁹⁷ für die NK-Zellen-vermittelte Lyse von Zielzellen über die Integrin-Ligand-Interaktion LFA-1:ICAM-1 verantwortlich ist. Phosphoryliertes Tyr³⁷⁸ in humanem HS1 hat einen Einfluss auf die Chemotaxis von NK-Zellen (Butler *et al.*, 2008).

Die Adapterproteine mAbp1 und HS1 koordinieren eine Vielzahl von Prozessen in Zellen des hämatopoietischen Systems. Aufgrund der vielfältigen Interaktionsmöglichkeiten mit Proteinen verschiedener zellulärer Mechanismen sind längst nicht alle Funktionen von mAbp1 und HS1 bekannt. Insbesondere bei der Initiierung der adaptiven Immunantwort spielen Endocytose-Ereignisse und Cytoskelett-Reorganisation im Zusammenwirken mit signalleitenden Prozessen eine wichtige Rolle. Daher ist eine detaillierte Charakterisierung der Funktion beider Adapterproteine während der Einleitung der adaptiven Immunantwort ein wichtiger Beitrag für die Grundlagenforschung und zum Verständnis dieses äußerst komplexen Mechanismus.

3 Ziele der Arbeit

1. Durch die Generierung mAbp1/HS1-defizienter bzw. Analyse von mAbp1- bzw. HS1-defizienter Mäuse sollte die Funktion von mAbp1 bzw. HS1 auf die Antigen-abhängige, BCR-induzierte Signalweiterleitung untersucht werden. Die Identifizierung von neuen Bindungspartnern während dieses Prozesses sollte mittels biochemischer Verfahren durchgeführt werden.
2. Die Bedeutung von mAbp1 bzw. HS1 für die sowohl Antigen-unabhängige als auch -abhängige Differenzierung von Lymphocyten in mAbp1-, HS1- bzw. mAbp1/HS1 Mäusen sollte charakterisiert werden.
3. Der Einfluss von mAbp1 auf Prozesse der Antigeninternalisierung, -prozessierung bzw. -präsentation in Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen sollte *in vitro* mittels T-Zell-Stimulationstests analysiert werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Materialien, Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien wurden von den Firmen AppliChem, Invitrogen, J. T. Baker, Merck, PAA, Pierce, Roche Diagnostics, Roth und Sigma-Aldrich bezogen. Plastikwaren für Zellkulturarbeiten wurden von den Firmen Braun, Eppendorf, Greiner, Nunc und Sarstedt verwendet.

4.1.2 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid/Bisacrylamid

Agar Agar

Ampicillin

Ammoniumpersulfat (APS)

β -Mercaptoethanol

Bromphenolblau

Calciumchlorid-Dihydrat

Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE)

Chicken Serum

Coomassie Blue R 250

Essigsäure

Ethanol

Ethidiumbromid

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

Ethylenglykol-bis-(β -aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)

Deoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP)

Diammoniumsulfat

Dimethylsulfoxid (DMSO)

DMEM

1,4-Dithiothreitol (DTT)

Ethanol

Ethidiumbromid

Ficoll

Fötale Kälberserum (FCS)

Glutathion

Glycerin (87 %)
Histidinol
IGEPAL CA-630 (NP-40)
Isofluran
Isopropanol
Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG)
Lipopolysaccharide (LPS)
Luminol
Kaliumacetat
Magnesiumchlorid
Manganchlorid
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)
Natriumacetat
Natriumazid
Natriumchlorid
Natriumfluorid
Natriumdodecylsulfat (SDS)
Natriummolybdat
Natriumorthovanadat
Neomycin
Ovalbumin/Ovalbumin-Alexa488
Ovalbumin-Peptid (Aminosäuren 257-264 bzw. 323-339)
para-Hydroxycoumarinsäure
Penicillin/Streptomycin
Pluronic F-127
Polybrene (Hexadimethrinbromid)
Puromycin
Pepton
Rinderserumalbumin (BSA)
RPMI 1640 (+ GlutaMax™)
SeaKEM LE Agarose
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)
Triton X-100

Tween-20

Yeast Extract

Chemikalien wurden im Reinheitsgrad p. A. (*per analysis*) verwendet.

4.1.3 Geräte

Autoklaven	Webeco
autoMACS™	Miltenyi
Biophotometer	Eppendorf
Brutschrank HERAcell 150	Heraeus
Biophotometer	Eppendorf
Desinfektor-G 7736	Miele
Durchflusszytometer BD FACSCalibur	Becton Dickinson
Durchflusszytometer BD LSR II	Becton Dickinson
Electrophoresis Power Supply-EPS 301	Amersham Biosciences
Elektrophoresekammer (waagrecht, Agarose)	Peqlab Biotechnologie
Elektrophoresekammer (senkrecht, SDS-PAGE)	BioRad
<i>Gel Imager</i>	Intas
<i>Gene Pulser® II und Capacitance Extender</i>	BioRad
Inkubator Kelvitron®t	Heraeus
Inkubator Unitron	INFORS
Mikroskop	Leitz
PCR Mastercycler personal	Eppendorf
PCR Mastercycler eppgradient	Eppendorf
pH-Meter pH Level 1	inoLab®
Schüttler Duomax 1030	Heidolph
<i>Semi dry Transfer Unit</i>	Amersham Bioscience
Spannungsquellen	Amersham Bioscience
Sterilbank HERAsafe	Heraeus
Thermomixer comfort	Eppendorf
ThermoStat Plus	Eppendorf
Ultraschallhomogenisator Sonopuls HD 2070	Bandelin
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
UV-Wasseraufbereitungssystem arium 611	Sartorius
Waage TE612	Sartorius

Wasserbad W6/W12	Medigen
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus
Zentrifuge RC 3B Plus, RC 26 Plus	Sorvall®

4.1.4 Software

Adobe® Photoshop® CS2
 BD FACSDiva™
 Corel Draw
 CSX-1400M Camera Controller
 Endnote
 FlowJo
 Gel-Dokumentationssoftware, GDS
 Gel-Pro Analyzer
 Mac OS 9.2
 Microsoft Office 2007
 Windows XP

4.1.5 Verwendete Puffer

1 x PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH_2PO_4 ; 8,6 mM Na_2HPO_4 ; pH ~7,3
PBS-T	PBS, 0,1 % (v/v) Tween 20
Tris/HCl	0,5-1,5 M Tris; auf pH 6,8-8,8 eingestellt mit HCl
TE	10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0
Lysis-Puffer für eukaryotische Zellen	20 mM Tris/HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,5 mM EDTA, pH 8,0; 10 mM NaF; 10 μM Na_2MoO_4 ; 1 mM Na_3VO_4 ; 1x Protease-Inhibitor-Cocktail; 1 % (v/v) NP-40 bzw. Triton X-100
Laufpuffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS
Trenngelpuffer	375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 10 % Acrylamid; 0,1 % SDS; 0,25 mM EDTA; 0,1 % TEMED; 0,1 % APS
Sammelgelpuffer	125 mM Tris/HCl, pH 6,8; 4,8 % Acrylamid; 0,1 % SDS; 0,25 mM EDTA; 0,1 % TEMED; 0,1 % APS

TAE-Puffer	40 mM Tris/Essigsäure (HAc) pH 7,8; 1 mM EDTA pH 8,0
Transferpuffer	39 mM Glycin; 48 mM Tris; 0,0375% (w/v) SDS; 0,01% (w/v) NaN_3 ; 20% (v/v) Methanol
K-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 8.0; 50 mM KCl; 0,5 % Tween 20; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Proteinase K
Krebs-Ringer	140 mM NaCl; 4 mM KCl; 1 mM MgCl_2 ; 10 mM D-Glukose; 10 mM HEPES pH 7,4; alternativ 0,5 mM EGTA oder 1 mM CaCl_2 ; autoklaviert, 4°C
5 x Laemmli	156,25 mM Tris/HCl, pH 6,8; 15 % (w/v) SDS; 50 % (v/v) Glycerin; 50 mM DTT; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau
LB-Medium	10 g/l Peptone; 5 g/l Yeast Extract; 10 g/l NaCl; gelöst in ddH_2O ; autoklavieren; 4°C
MACS-Puffer	PBS, 2 % (v/v) FCS, 0,58 g/L EDTA
10 x modifizierter Gitschier Puffer	0,67 M Tris pH 8,8; 0,166 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Erythrocyten-Lysepuffer	Lösung A: 0,16 M NH_4Cl (sterilfiltriert) Lösung B: 0,17 M Tris-HCl, pH 7,65 (sterilfiltriert) Mischung Lösung A und B im Verhältnis 9:1
6 x DNA-Ladepuffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 15 % (w/v) Ficoll
TFB I-Puffer	50 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$; 100 mM KCl; 10 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 30 mM KOAc, pH 6,0; 15 % (v/v) Glycerin; pH mit HOAc auf 6,1; sterilfiltrieren; 4 °C
TFB II-Puffer	75 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 10 mM KCl; 10 mM MOPS; 15 % (v/v) Glycerin; pH mit KOH auf 7,0 einstellen; sterilfiltrieren; 4 °C
Elutionspuffer	50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 mM Glutathion
Detektionslösung	Lösung A: 0,1 M Tris/HCl, pH 8,6; 0,25g/L Luminol; 4 °C Lösung B: 1,1g/L para-Hydroxycoumarinsäure in DMSO

4.1.6 Antikörper

4.1.6.1 Verwendete Primär-Antikörper

Antikörper	Hersteller	Anwendung
Ratte-anti-Maus-CD4-Biot.	BD Pharmingen™	Durchflusszytometrie
Ratte-anti-Maus-CD4-PE	BD Pharmingen™	Durchflusszytometrie
Ratte-anti-Maus-CD8 α -PE	BD Pharmingen™	Durchflusszytometrie
Ratte-anti-Maus-CD8 α -APC	BD Pharmingen™	Durchflusszytometrie
Ziege-anti-Maus-IgG (H+L)-FITC	Southern Biotech.	Durchflusszytometrie
Ratte-anti-Maus-CD19-PE	BD Pharmingen™	Durchflusszytometrie
Ratte-anti-Maus-CD19-Biot.	BD Pharmingen™	Durchflusszytometrie
Ratte-anti-Maus-CD21-FITC	BD Pharmingen™	Durchflusszytometrie
Ratte-anti-Maus-CD24-PE	BD Pharmingen™	Durchflusszytometrie
Ratte-anti-Maus-CD45R/B220-PE-Cy7	BD Pharmingen™	Durchflusszytometrie
Kaninchen-anti-mAbp1	Prof. Dr. Wienands (Larbolette <i>et al.</i> , 1999)	<i>Western Blot</i>
Kaninchen-anti-chAbp1	Eigene Herstellung	<i>Western Blot</i>
F(ab') ₂ Fragment-anti-Maus-IgG+IgM (H+L)	Jackson ImmunoResearch	Zellstimulation
F(ab') ₂ Fragment-anti-Human-IgM	Jackson ImmunoResearch	Zellstimulation
Maus-anti-phospho-Tyrosin, (4G10)	Upstate	<i>Western Blot</i>
Kaninchen-anti-Aktin	Sigma-Aldrich	<i>Western Blot</i>
Kaninchen-anti-phospho-SHIP (Tyr ¹⁰²⁰)	Cell Signaling Technology	<i>Western Blot</i>
Maus-anti-GFP	Roche	<i>Western Blot</i>
Maus-anti-GST	Sigma	<i>Western Blot</i>
Maus-anti-Hühner-IgM (M4)	Southern Biotechnology	Zell-Stimulation DT40
Ziege-anti-Hühner-IgM-FITC	Bethyl Laboratories	Durchflusszytometrie
Kaninchen-anti-phospho-SLP-65 (Tyr ¹⁷⁸)	Dr. A. C. Chan (Chiu <i>et al.</i> , 2002)	<i>Western Blot</i>
Maus-anti-Human-HS1	BD Pharmingen™	<i>Western Blot</i>

Antikörper	Hersteller	Anwendung
Kaninchen-anti-Maus-HS1	Cell Signaling Technology	<i>Western Blot</i>
Hamster-anti-Maus-CD11c-APC	BD Pharmingen™	Durchflusszytometrie
Ratte-anti-Maus-MHC-II (I-A/I-E)-FITC	BD Pharmingen™	Durchflusszytometrie
Kaninchen-anti-Human-SHIP	Cell Signaling Technology	<i>Western Blot</i>

Zur Detektion biotinylierter Primärantikörper mittels Durchflusszytometrie wurden diese mit Streptavidin-FITC bzw. Streptavidin-PE-Cy5 markiert (BD Pharmingen™).

4.1.6.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	Anwendung
Ziege-anti-Maus-IgG1 HRPO-konj.	Santa Cruz Biotech.	<i>Western Blot</i>
Ziege-anti-Maus-IgG2b HRPO-konj.	Santa Cruz Biotech.	<i>Western Blot</i>
Ziege-anti-Maus-IgG HRPO-konj.	Pierce	<i>Western Blot</i>
Ziege-anti-Kaninchen-IgG HRPO-konj.	Pierce	<i>Western Blot</i>

4.1.7 Enzyme

Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
<i>calf intestinal phosphatase</i> (CIP)	New England Biolabs
T4 DNA Ligase	New England Biolabs
<i>Taq</i> DNA Polymerase	New England Biolabs
<i>Taq</i> PCR Master Mix Kit	Qiagen
LA- <i>Taq</i> DNA Polymerase	Takara
PrimeStar DNA Polymerase	Takara
MMLV-Reverse Transkriptase	Fermentas

4.1.8 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

<i>CD4⁺ T cell isolation kit, mouse</i>	Miltenyi
<i>CD8⁺ T cell isolation kit, mouse</i>	Miltenyi
<i>Wizard[®] SV Gel and PCR Clean Up System</i>	Promega

<i>Wizard[®] Plus SV Miniprep DNA Purification System</i>	Promega
<i>Pure Yield[™] Plasmid Midiprep System</i>	Promega
<i>PCR Master Mix Kit</i>	Qiagen
<i>B Cell Isolation Kit</i>	Miltenyi
<i>GST Gene Fusion Systems</i>	Amersham Bioscience
<i>RevertAid[™] H Minus First Strand cDNA-Synthesis Kit</i>	Fermentas
<i>R-Phycoerythrin Labeling Kit-SH</i>	Djindo Molecular Technologies

4.1.9 Sonstige Materialien

1 kb DNA-Größenstandard GeneRuler [™]	Fermentas
Alum	Thermo Scientific
<i>Bordetella pertussis</i> (hitzeinaktiviert)	Becton Dickinson
Elektroporationsküvetten (4 mm)	Peqlab
Kanüle 23G	Braun
<i>Western-Blot</i> -Filterpapier	Schleicher & Schell
Gewebesieb (100 µm, Nylon)	BD Falcon [™]
Glaskapillare	Roth
<i>Glutathion-Sepharose 4 Fast Flow</i>	Amersham Bioscience
Nitrocellulose Filter Hybond [™] ECL [™]	Amersham Bioscience
4-OH-3-Iodo-5-Nitrophenylacetyl (NIP)-BSA	Biosearch Technologies
NP(16)-KLH	Biosearch Technologies
Protein A/G-Agarose	Santa Cruz Biotech.
Protease-Inhibitor-Cocktail (P2714)	Sigma
Proteingrößenstandard <i>Broad Range (Prestained)</i>	New England Biolabs
10 mL Spritze	Braun
Sterilfilter	Roth
Transfektionsreagenz FuGENE	Roche
UV-Küvette	Eppendorf

4.1.10 Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5' →3'	Anwendung
WTgeno	CTGCTGTCTACCCTCAGGCTATG	Genotypisierung Mäuse (<i>mabp1</i>)
WTexon2	GCCAGCCACACGGATGTCATTGC	Genotypisierung Mäuse (<i>mabp1</i>)
KOgeno	GAAGAGCCTGGCATGACCTGTGC	Genotypisierung Mäuse (<i>mabp1</i>)
KOneo	GGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGA	Genotypisierung Mäuse (<i>mabp1</i>)
HS1-3'KO-S	GAGAGGAAAGGTAGACACCAG	Genotypisierung Mäuse (<i>hs1</i>)
HS1-KO-end-3'	GGCATGGATGGCTGCTGGAC	Genotypisierung Mäuse (<i>hs1</i>)
Lac-Z-3'	CATGCTTGGAACAACGAGCGC	Genotypisierung Mäuse (<i>hs1</i>)
DT40left.fwd	CCACCCTTCATTTTCAGAGGA	Klonierung Deletionsvektor (<i>chabp1</i>)
DT40Ins_left.rev	CAGGTGAAGGCGTCAACGATG	Klonierung Deletionsvektor (<i>chabp1</i>)
DT40Ins_right.fwd	CAAACCAACGGAAGAGCAAT	Klonierung Deletionsvektor (<i>chabp1</i>)
DT40right.rev	CTTCTTGGGGGTTTCCTCAT	Klonierung Deletionsvektor (<i>chabp1</i>)
chEx4.fwd	GAAGTCCTTCGACCGTTAC	Genotypisierung DT40 (<i>chabp1</i>)
chEx3.rev	GAGATGGTGGAGGAGCTGAA	Genotypisierung DT40 (<i>chabp1</i>)
HisD2	TGCCCTTCTTCGCTGGTACG AGGAG	Genotypisierung DT40 (<i>chabp1</i>)

Bezeichnung	Sequenz 5' →3'	Anwendung
Neo1	CGGACCGCTATCAGGACATAG CGTTG	Genotypisierung DT40 (<i>chabp1</i>)
abp1ko2screen	GTGAAGTCCCGTTCCTGCT	Genotypisierung DT40 (<i>chabp1</i>)
cSH3P7_uni	TGCCATGGCGCTGAACCTCAGC	Klonierung
chAbp1_HA.rev	TCACTCGAGCAGGGCGTAGTCTG GCACATCGTAGGGGTACTCCACG TAGTTGGCG	Klonierung
chHCLS1Bam.fwd	AGCTGGATCCCATGTGGAAGGCA GTTGTGGG	Klonierung
chHCLS1Not.rev	ACTGCGGCCGCTCACTGCAGGAG CTTCACGT	Klonierung

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG Biotech bzw. Operon bezogen.

4.1.11 Vektoren und cDNA

4.1.11.1 Vektoren

Vektor	Hersteller/Quelle	Anwendung
pMSCVpuro	BD Biosciences Clontech	Expression in DT40
pGEX-4T-1	Amersham Bioscience	Expression in Bakterien
pBluescript SK II (-)	Stratagene	Zielgerichtete Mutagenese
pNeo	T. Kurosaki	Resistenzkassette für Deletionsvektor
pHisD	T. Kurosaki	Resistenzkassette für Deletionsvektor
pHCMV-VSV-G	M. Jücker	Expression von VSV-G

4.1.11.2 cDNA-Konstrukte

Konstrukt	Eigenschaften	Vektor
chAbp1-HA	N-terminal HA-markiertes chAbp1	pMSCVpuro
chHS1[SH3]	SH3-Domäne von chHS1	pGEX-4T-1
SLP-65[SH2]	SH2-Domäne von SLP-65	pGEX-4T-1
CIT-SLP-65	Citrin-markiertes SLP-65	pMSCVpuro

Die cDNA für chAbp1 wurde mittels RT-PCR aus DT40wt Zellen amplifiziert.

Die cDNA für chHS1 wurde von Dr. J. Buerstedde bezogen (Caldwell *et al.*, 2005).

4.1.12 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Verwendung
BL21 (D3) F	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻)</i> λ(DE3)	Expression von GST-Fusionsproteinen
TOP10F'	F ⁻ [<i>lacI^q Tn10 (Tet^R)</i>] <i>mcrA Δ(mrr-hsd RMSmcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG</i>	Plasmidamplifikation
XL1 blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F ⁻ <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^R)</i>]	Plasmidamplifikation

4.1.13 Verwendete Zelllinien

4.1.13.1 Ramos (ATCC-Nummer: CRL-1596)

Bei Ramos handelt es sich um eine reife humane B-Zelllinie, die auf ihrer Zelloberfläche IgM exprimiert. Ursprünglich wurden Ramos-B-Zellen aus einem Burkitt-Lymphom generiert.

4.1.13.2 DT40 (ATCC-Nummer: CRL-2111)

DT40 B-Zellen wurden aus einem bursalen Lymphom, das mit dem *avian leucosis virus* (ALV) infiziert wurde, generiert (Baba und Humphries, 1984; Baba *et al.*, 1985). DT40-Zellen exprimieren IgM auf der Zelloberfläche.

4.1.13.3 Plat-E

Die auf HEK293T-Zellen basierende Verpackungszelllinie Plat-E dient der Produktion rekombinanter Retroviren. Unter der Kontrolle des EF1α Promotors exprimieren die Zellen die viralen Gene *gag-pol* und *env* des MMLV. Die zwei Selektionsmarker-codierenden cDNA Blasticidin bzw. Puromycin sind über eine *internal ribosome entry site* (IRES) mit den Genen *gag-pol* bzw. *env* verbunden (Morita *et al.*, 2000).

4.1.14 Mauslinien

4.1.14.1 Balb/c

Mäuse des Balb/c-Inzuchtstammes weisen aufgrund von Albinismus eine weiße Fellfarbe, unpigmentierte Haare und rote Augen auf.

4.1.14.2 *mabp1*^{-/-} Balb/c

Bei *mabp1*^{-/-} Balb/c-Mäusen handelt es sich um mAbp1-defiziente Tiere mit einem genetisch homogenen Balb/c-Hintergrund (Connert, 2003; Connert *et al.*, 2006).

4.1.14.3 C57BL/6

C57BL/6 Inzucht-Mäuse weisen ein schwarzes Fell auf.

4.1.14.4 *hs1*^{-/-} C57BL/6

Bei *hs1*^{-/-} C57BL/6 Mäusen wurde der *hs1*-Genlocus inaktiviert. Die Mäuse wurden freundlicherweise von Dr. Takeshi Watanabe bereitgestellt (Taniuchi *et al.*, 1995).

4.1.14.5 Do11.10

Die Balb/c T-Zell-Antigenrezeptor-transgene Mauslinie Do11.10 (Murphy *et al.*, 1990) wurde im Tierhaus des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung, Braunschweig, gezüchtet. CD4⁺ T-Zellen der Mauslinie erkennen spezifisch das Epitop der Ovalbumin (OVA) -Aminosäuren 323 bis 339 bei Präsentation durch MHC-IA_d-Moleküle.

4.1.14.6 OT-I

Die C57BL/6 T-Zell-Antigenrezeptor-transgene Mauslinie OT-I (Hogquist *et al.*, 1995) wurde im Tierhaus des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung, Braunschweig, gezüchtet. Bei dieser Mauslinie erkennen CD8⁺ T-Zellen vermittelt durch ihren T-Zell-Antigenrezeptor das Peptid SIINFEKL aus OVA (Aminosäuren 257 bis 264) bei Präsentation durch MHC-I-K_b Moleküle (Sterry *et al.*, 1995).

4.2 Methoden

4.2.1 Arbeiten mit Versuchstieren

4.2.1.1 Haltungsbedingungen und Züchtung von Labormäusen

Mäuse wurden unter spezifiziert Pathogen-freien (SPF) Bedingungen alleine oder in Gruppen von bis zu sechs Tieren unter tierärztlicher Aufsicht gehalten. Die Zucht erfolgte unter Anwendung der Haltungsbedingungen der tierexperimentellen Einrichtungen des MPI für Experimentelle Medizin, Göttingen. Züchtungen wurden innerhalb aller Mausstämme durch Verpaarung der Geschwistertiere durchgeführt. Soweit nicht anders angegeben, wurden Tiere im Alter von 8 bis 16 Wochen für Analysen verwendet.

4.2.1.2 Rückkreuzung

Bei der Durchführung einer Rückkreuzung wird eine Mutation eines Maus-Inzuchtstammes (hier: mAbp1-defiziente Balb/c Mäuse) auf einen zweiten Inzuchtstamm (hier: wildtypische C57BL/6 Mäuse) durch Verpaarung übertragen. Waren die Tiere in der ersten Rückkreuzungsgeneration (F1) noch genetisch homogen, bedurfte es bei jeder weiteren Rückkreuzungsrunde (Nx) einer Genotypisierung der Mäuse. Es wurden fortlaufend wildtypische C57BL/6 Tiere mit mAbp1-heterozygoten Tieren der Generationen F1 bis Nx verpaart. Nach 15 Rückkreuzungsgenerationen konnte davon ausgegangen werden, dass der genetische Hintergrund des ehemaligen Mutations-Trägerstammes im Genom des Empfängerstammes nur noch zu einem geringen Anteil vorhanden war. mAbp1-heterozygote Tiere der N15-Generation wurden zur Erzeugung mAbp1-defizienter C57BL/6 Mäuse verpaart. Diese Tiere wurden in weiterführenden Experimenten eingesetzt.

4.2.1.3 Ohrlochung und Schwanzbiopsie

Falls erforderlich erfolgte die Kennzeichnung der Tiere durch Ohrlochmarkierungen. Anschließend wurden Schwanzbiopsien für Genotypisierungen der Mäuse angefertigt.

4.2.1.4 Blutentnahme und Serumgewinnung bei Mäusen

Mäuse wurden mit Isofluran narkotisiert. Nach erfolgter Betäubung wurde mit einer Glaskapillare Blut von der retrobulbären Augenvene entnommen. Das Blut wurde zur Serumgewinnung für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 3000 x g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Serumüberstand wurde bei -20 °C gelagert.

4.2.1.5 Sektion von Mäusen

Die Tötung der Mäuse erfolgte mittels konstanten CO₂-Einstroms in einem geschlossenen Behälter. Die Entnahme von Knochenmark bzw. der Milz wurde nach erfolgter Tötung durchgeführt.

4.2.1.6 Immunisierung von Mäusen

Die Immunisierung von Mäusen ist unter dem Tierversuchsantrag „Analyse von Mäusen mit Mutationen im B-Zell-Antigenrezeptor-Signalweg“ mit dem Aktenzeichen 038/09 genehmigt worden.

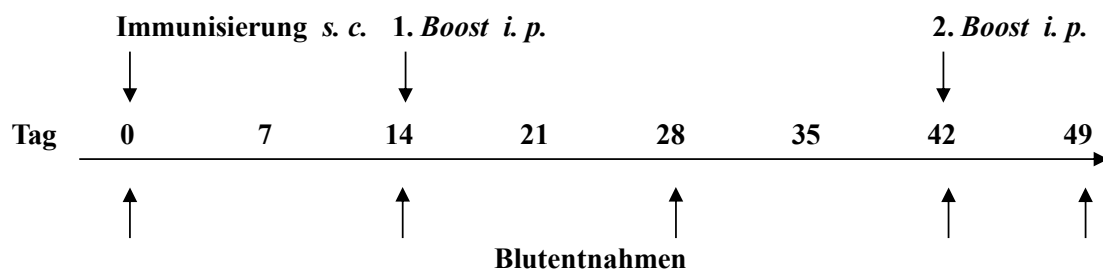


Abb. 4.1: Schema zur Immunisierung von Mäusen

Mäuse wurden an Tag 0 mit 100 µg NP(16)-KLH adsorbiert an Alum mit 10⁹ hitzeinaktivierten *Bordetella pertussis* Bakterien subkutan (*s. c.*) immunisiert. Zwei Folge-Immunsierungen mit 50 µg NP(16)-KLH gefällt in Alum *intra peritoneal (i. p.)* an Tag 14 und 42 folgten. Blut wurde an Tag 0, 14, 28, 42 und 49 aus der retroorbitalen Augenvene entnommen.

Zur Untersuchung der T-Zell-abhängigen Immunantwort wurden Mäuse mit Hapten-Protein-Konjugaten immunisiert. Ein T-Zell-abhängiges Hapten-Carrier-Konjugat stellt 4-Hydroxy-3-Nitrophenylacetyl (NP)- *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) dar.

Zur Analyse der T-Zell-vermittelten Immunantwort wurde den Mäusen an Tag 0 Mäusen nach Betäubung Blut aus der retrobulbären Augenvene zur Serumgewinnung entnommen. Anschließend wurde den Tieren je 100 µg NP(16)-KLH adsorbiert an Alum mit 10⁹ hitzeinaktivierten *Bordetella pertussis* Bakterien *s. c.* injiziert (Endvolumen: 30 µL). An Tag 14 erfolgten *Boost*-Immunsierungen mit je 50 µg NP(16)-KLH gefällt in Alum und eine Blutentnahme. 28 Tage nach Versuchsbeginn wurde eine erneute Blutentnahme durchgeführt. An Tag 42 wurde den Mäusen in einer zweiten *Boost*-Immunsierung je 50 µg NP(16)-KLH gefällt in Alum gespritzt, und eine Blutentnahme durchgeführt. 7 Wochen nach Versuchsbeginn wurden die Tiere nach einer Blutentnahme getötet und Knochenmarkzellen isoliert (siehe Abschnitte 4.2.2.1 bzw. 4.2.2.2), die für durchflusszytometrische Analysen eingesetzt wurden (siehe Abschnitte 4.2.2.8 bis 4.2.6).

4.2.2 Zellbiologische Methoden

Die Kultivierung von primären Zellen und Zellkulturarbeiten mit Zelllinien wurden mit steriler Ausrüstung unter HERAsafe-Sterilbänken durchgeführt. Die Zelldichte von Kulturen wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt, Zentrifugationen erfolgten bei 300 x g und 4 °C für 4 min. Alle eingesetzten Zellen wurden bei 37 °C unter Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ in HERAcell 150-Inkubatoren kultiviert.

4.2.2.1 Isolierung von Knochenmarkzellen

Von getöteten Mäusen wurden Femur und Tibia präpariert und von Muskelgewebe befreit. Die Knochen wurden an den Enden geöffnet. Das Knochenmark wurde mittels RPMI 1640 gefüllter 10 mL-Spritze mit Kanüle (23G) ausgespült. Die Zellen wurden durch wiederholtes Aufziehen der Suspension vereinzelt. Anschließend wurden die Zellen bei 4 °C für 4 min und 300 x g zentrifugiert und in 10 mL 1 x PBS resuspendiert. Isolierte Knochenmarkzellen wurden gezählt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

4.2.2.2 Generierung dendritischer Zellen (DC) aus Knochenmarkzellen

Die Herstellung und Kultivierung von DC wurde mit leichten Modifikationen, wie in Inaba *et al.* beschrieben, durchgeführt. Die Isolation und Kultur von dendritischen Zellen (DCs) wurden durchgeführt wie beschrieben in (Inaba *et al.*, 1992). Isolierte Knochenmarkzellen (siehe Abschnitt 4.2.2.1) wurden mit Erythrocyten-Lysepuffer inkubiert (siehe Abschnitt 4.2.2.6) und in 10 mL BMDC-Medium für 2 h bei 37 °C präplattiert. Alle nicht adhärenenten Zellen wurden geerntet und 3 x 10⁶ Knochenmarkzellen in 5 mL BMDC-Medium für 7 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. An Tag 3 wurde die Hälfte des BMDC-Mediums, an Tag 6 das komplette Medium erneuert und die Zellen in entsprechenden Volumina BMDC-Medium ausplattiert. Reife DC konnten ab Tag 7 für weitere Analysen verwendet werden.

BMDC-Medium: RPMI 1640
 50 µM β-Mercaptoethanol
 5 % FCS
 50 U/mL Penicillin und 50 µg/mL Streptomycin
 2 mM L-Glutamin
 1 x NEAA
 0,5 ng/mL GM-CSF
 0,05 ng/mL IL-4

4.2.2.3 Isolierung von Milzzellen

Nach Tötung der Mäuse durch CO₂-Zufuhr wurde die Milz präpariert und mittels Gewebesieb und Spritzenstempel in 10 mL RPMI 1640 homogenisiert. Die Zellen wurden durch wiederholtes Aufziehen der Suspension mittels 10 mL Spritze mit Kanüle (23G) vereinzelt. Die Milzzellen wurden anschließend mit 1 x PBS gewaschen und bei 4 °C für 4 min und 300 x g zentrifugiert. Nach erfolgter Erythrocyten-Lyse (siehe Abschnitt 4.2.2.6) erfolgte ein erneuter Waschschrift mit 1 x PBS und Zentrifugation bei 4 °C für 4 min und 300 g. Die Zellen wurden in 10 mL 1 x PBS aufgenommen und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen auf Eis gelagert.

4.2.2.4 Aufreinigung von B-Lymphocyten aus der Milz mittels autoMACS™

Isolierte Milzzellen der Maus wurden mit dem autoMACS™-System aufgereinigt. Dazu wurde das *B Cell Isolation Kit* gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die Aufreinigung von B-Lymphocyten erfolgte mit dem Programm *depletes*. Aufgereinigte Zellen wurden in MACS-Puffer auf Eis bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.2.2.5 Aufreinigung transgener T-Lymphocyten aus der Milz

Um T-Zellen aus einer Lymphocytensuspension der Milz zu isolieren, wurde ein MACS-Zellseparations-System von Miltenyi Biotech benutzt. Nicht erwünschte Zelltypen wurden mittels biotinylierter Antikörper-*Cocktails* markiert und mit magnetischen anti-Biotin-MicroBeads inkubiert. Mittels Separationssäule und eines Magneten wurden alle markierten, unerwünschten Zelltypen selektiert und verblieben in der Säule. Alle unmarkierten Zellen passierten die Separationssäule und konnten mit einer bis zu 95 %igen Reinheit eluiert werden.

Je 1×10^7 Milzzellen aus getöteten Do11.10 bzw. OT-I-Mäusen (siehe Abschnitte 4.1.14.5 bzw. 4.1.14.6) wurden in 40 µL MACS-Puffer resuspendiert und mit 10 µL Antikörper-*Cocktail* des entsprechenden T-Zell-Isolationskits für 10 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden 30 µL MACS-Puffer und 20 µL anti-Botin-MicroBeads hinzugefügt und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Es erfolgte ein Waschschrift mit MACS-Puffer mit anschließender Zentrifugation der Zellen bei 4 °C für 4 min und 300 g. Das Zellpellet wurde in 500 µL MACS-Puffer resuspendiert und auf eine mit 3 mL MACS-Puffer äquilibrierte MACS-Zell-Separationssäule gegeben. Die Säule wurde dreimal mit je 3 mL

MACS-Puffer gewaschen. Die separierten T-Lymphocyten wurden bei 4 °C für 4 min und 300 x g zentrifugiert und in 1 x PBS resuspendiert. Die Lagerung der Zellen erfolgte auf Eis bis zur weiteren Verwendung.

4.2.2.6 Erythrocyten-Lyse

Zur Erythrocyten-Lyse wurde der eingesetzte Puffer aus den Lösungen A und B (siehe Abschnitt 4.1.5) im Verhältnis 9:1 gemischt. Die Zellen einer Milz wurden in 2 mL Lyse-Puffer resuspendiert und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine Unterschichtung der Zellsuspension mit 1 mL FCS und eine Zentrifugation der Zellen bei 4 °C für 4 min und 300 g. Das Zellpellet wurde nach einmaligem Waschen mit 1 x PBS und erneuter Zentrifugation in 10 mL PBS resuspendiert. Die Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

4.2.2.7 Zellzählung

Die Zählung von Zellen wurde mittels Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Durch eine 1:1 Trypanblau-Färbung konnte eine Unterscheidung toter und lebender Zellen vorgenommen werden.

4.2.2.8 Vorbereitung von primären Zellen für durchflusszytometrische Analysen

Isolierte Milz- bzw. Knochenmarkzellen (siehe Abschnitte 4.2.2.1 bzw. 4.2.2.3) wurden für FACS-Analysen auf eine Zellzahl von 5×10^6 Zellen in jeweils 50 μL 1 x PBS eingestellt. Darauffolgend wurden die Zellen mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern bzw. biotinylierten Antikörpern und einem Streptavidin-Fluorophor nacheinander markiert und für 20 min bei 4 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Wurden Knochenmarkzellen aus Immunisierungsexperimenten verwendet (siehe Abschnitt 4.2.1.6), erfolgte eine Färbung der Zellen mit 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 4-OH-3-Iodo-5-Nitrophenylacetyl (NIP)-BSA, welches zuvor PE-markiert wurde (siehe Abschnitt 4.2.14.1). Sollte parallel eine Messung der Ca^{2+} -Mobilisierung der Zellen erfolgen, wurden die Zellen zusätzlich wie unter Abschnitt 4.2.2.22 angegeben behandelt. Nach den Färbeschritten wurden die Zellen mit 500 μL 1 x PBS gewaschen, bei 300 x g für 4 min und 4 °C zentrifugiert und auf Eis gelagert. Die durchflusszytometrischen Analysen erfolgten mittels Benutzung des BD LSR II. Die Aufzeichnung der Daten wurde unter Zuhilfenahme der Software BD FACSDiva™ bewältigt. Die anschließende Auswertung wurde mit dem Programm *FlowJo* durchgeführt.

4.2.2.9 Bestimmung der Endocytoserate von DC

DC wurden wie unter Abschnitt 4.2.2.2 beschrieben generiert. An Tag 1 nach LPS-Stimulation wurden je 1×10^6 DC in 1 mL BMDC-Medium für 1 h bei 37 °C oder 0 °C mit 25 µg/mL Alexa488-konjugiertem OVA unter Lichtausschluss inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit 1 x PBS gewaschen und jeweils bei 300 x g für 4 min bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern gegen CD11c und CD86 (siehe Abschnitt 4.2.2.8). Die Endocytoserate CD11c- und CD86-positiver Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt und der Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten der 0 °C-Zellfraktion von dem Wert der 37 °C-Zellfraktion bei der anschließenden Auswertung subtrahiert.

4.2.2.10 Beladung von T-Lymphocyten mit Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFSE)

Um die Proliferation von T-Lymphocyten zu detektieren, wurden diese vor Kokultivierung mit DC mit dem Farbstoff CFSE beladen. Dazu wurden T-Zellen wie unter Abschnitt 4.2.2.5 isoliert und für 4 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert. Unter Lichtausschluss wurden 2×10^8 Zellen/mL in 1 µM CFSE in PBS für 10 min gefärbt. Vom Zellwand-permeablen Farbstoff wurden intrazellulär durch Esterasen zwei Acetatgruppen abgespalten, wodurch CFSE in seine aktivierte, fluoreszierende Form überführt wird. Durch kovalente Bindung an zelluläre, amine Proteinseitenketten bleibt der Farbstoff irreversibel in der Zelle gebunden (Weston und Parish, 1990). Die Färbereaktion wurde durch Zugabe von 14 mL PBS je mL Färbelösung gestoppt. Die Zellen wurden für 4 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert und einmal mit 15 mL PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die gefärbten T-Lymphocyten für weitere Analysen eingesetzt.

4.2.2.11 Kokultivierung von DC und T-Zellen

Für *in vitro* T-Zell-Proliferationsassays wurden DC und transgene T-Zellen in einem Verhältnis von 1:4 bis 1:64 eingesetzt (2×10^5 T-Zellen + (5×10^4 DC bis $0,312 \times 10^4$ DC). CFSE-beladene CD4⁺ T-Zellen (siehe Abschnitt 4.2.2.10) aus DO11.10 Mäusen wurden entweder mit 20 µg/mL OVA oder 20 µg/mL OVA-Peptid (AS 323 bis 339) beladenen DC für 72 h bei 37 °C und 5 bis 10 % CO₂-Atmosphäre kokultiviert. CFSE-beladene CD8⁺ T-Zellen aus OT-I-Mäusen wurden entweder mit 0, 200, 2000 bzw. 20000 ng/mL OVA oder 0,002; 0,02 bzw. 0,2 ng/mL OVA-Peptid (SIINFEKL) beladenen DC für 72 h bei 37 °C und 5 bis 10 % CO₂-Atmosphäre kokultiviert. Als Negativkontrolle wurden

sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen in der Abwesenheit von DC kultiviert. Anschließend wurden sämtliche Zellen für durchflusszytometrische Analysen eingesetzt (siehe Abschnitt 4.2.2.8).

4.2.2.12 Durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Proliferation

CFSE-beladene T-Zellen übertragen bei jeder Zellteilung die Farbstoffmoleküle zu gleichen Anteilen auf die Tochterzellen, so dass anhand der Fluoreszenzintensität die Anzahl der Teilungen ermittelt werden kann. Zur Auswertung der Proliferation wurden maximal 1×10^7 CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen mit Ratte-anti-CD4-PE-Antikörpern bzw. Ratte-anti-CD8-APC-Antikörpern in einer 1:1000 Verdünnung in 1 x PBS unter Lichtausschluss bei RT für 20 min inkubiert. Die Färbung erfolgte in 96-Well-Rundboden-Platten in einem Volumen von 70 µL. Die gefärbten Zellen wurden anschließend mit 250 µL 1 x PBS gewaschen, für 4 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert und in 300 µL 1 x PBS resuspendiert. Die Analyse der CFSE-Fluoreszenz Antikörper-markierter T-Zellen erfolgte am FACSCalibur im Detektionskanal für FITC bei 530 nm.

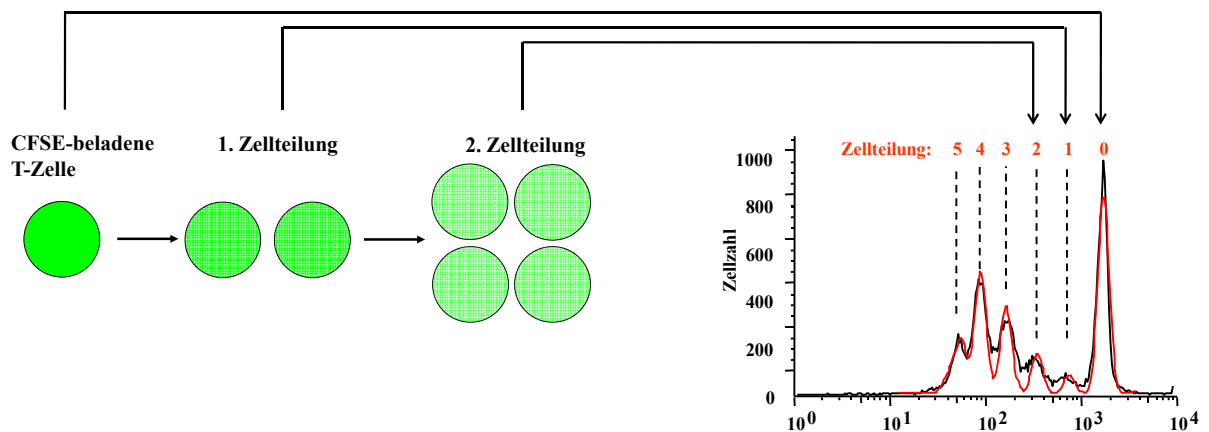


Abb. 4.2: Durchflusszytometrische Auswertung eines CFSE-basierten T-Zell-Proliferationstests

CFSE-beladene T-Zellen (grün) übertragen während jeder Zellteilung 50 % des Farbstoffs auf die Tochterzellen. Mittels durchflusszytometrischer Analysen kann die Fluoreszenzintensität einer Zelle mit der Anzahl der Zellteilungen in Bezug gesetzt werden (rechts, siehe Diagramm).

4.2.2.13 Kultivierungsbedingungen für Zelllinien

DT40-Zelllinien wurden in RPMI 1640 mit 1 % *chicken serum* (CS), 10 % *fetal calf serum* (FCS), 3 mM L-Glutamin, 50 µM β-Mercaptoethanol, 50 U/mL Penicillin und 50 µg/mL Streptomycin kultiviert.

Das Nährmedium für adhärenenten Plat-E-Zellen setzte sich aus 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 zusammen. Die Zellen wurden mit einer Trypsin/EDTA-Lösung gelöst und anschließend zu 25 % konfluent ausgesät.

Zur Inaktivierung von Komplementfaktoren wurden die Seren vor Benutzung für 30 min bei 56 °C inkubiert.

4.2.2.14 Einfrieren eukaryotischer Zellen

Zur Langzeitlagerung wurden 1 bis 5×10^6 eukaryotische Zellen bei 300 x g und 4 °C für 4 min pelletiert, in etwa 1 mL Einfriermedium (90 % (v/v) hitzeinaktiviertes FCS; 10 % (v/v) DMSO) aufgenommen und bei -80 °C bzw. -140 °C eingefroren.

4.2.2.15 Auftauen eukaryotischer Zellen

Das Auftauen eukaryotischer Zellen erfolgte bei 37 °C und anschließender Verdünnung in 10 mL Zellkulturmedium. Nach Zentrifugation bei 300 x g und 4 °C für 4 min wurde das Zellpellet in 10 mL Zellkulturmedium resuspendiert und auf eine Zellkulturschale ausgebracht.

4.2.2.16 Transfektion eukaryotischer Suspensionszellen

Die Transfektion eukaryotischer Zellen wurde durch Elektroporation durchgeführt. Die Zellmembran der Zellen wird bei diesem Verfahren durch einen elektrischen Impuls für kurze Zeit permeabilisiert, so dass Makromoleküle wie DNA in die Zellen gelangen können. Die Integration der DNA in das Genom der Zelle wird durch die vorherige Linearisierung der verwendeten Plasmid-DNA gesteigert (Andreason und Evans, 1988; Potter, 1993). Die Zellen wurden vor der Transfektion bei 300 x g und 4 °C für 4 min pelletiert und in 20 mL eiskaltem 1 x PBS resuspendiert. Die Zellzahl wurde auf 1×10^7 Zellen/700µL 1 x PBS eingestellt. 10 bis 40 µg der in 10 bis 40 µL TE-Puffer gelösten linearisierten Plasmid-DNA wurden in eine mit 700 µL Zellsuspension gefüllte Elektroporationsküvette (4 mm Elektrodenabstand, Peqlab Biotechnologie GmbH) gegeben. Als Negativkontrolle diente eine Elektroporationsküvette mit 700 µL Zellsuspension. Die Ansätze wurden für 10 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte mit dem *Gene Pulser[®] II* und *Capacitance Extender* bei 250 V und 960 µF bzw. 550 V und 25 µF. Anschließend wurden die Zellen in 50 mL vorgewärmtes Zellkulturmedium überführt und auf 96- oder 24-well-Zellkulturplatten verteilt. Bei einer

Zelldichte von 50 bis 70 % oder nach 24 h Kultivierung wurde Selektionsmedium (2 mg/mL G418 bzw. 1 mg/mL Histidinol) hinzugefügt. Dieses wurde je nach Bedarf nach 1 bis 3 Tagen erneuert. Die nach einigen Tagen mit bloßem Auge sichtbaren Klone wurden selektiert und vereinzelt. Das Selektionsmedium wurde frühestens 10 Tage nach erfolgter Transfektion abgesetzt.

4.2.2.17 Transduktion von DT40-Zellen durch pseudotypisierte, rekombinante Retroviren

Mittels retroviralem Gentransfers kann in jeden proliferierenden Zelltyp genetische Information stabil integriert werden. Durch den Einsatz von Verpackungszelllinien (siehe Abschnitt 4.1.13.3) gelingt die Herstellung retroviraler RNA verpackt in replikationsinkompetenten Viren. Dazu wurden die Verpackungszelllinien mit den viralen Genen *gag*, *env* bzw. *pol* ausgestattet, die für die Virusstruktur bzw. reverse Transkriptase kodieren. Getrennt davon werden durch den retroviralen Expressionsvektor pMSCVpuro, der sich vom *murine embryonic stem cell virus* (MESV) ableitet, das Verpackungssignal Ψ^+ , ein für die Prozessivität verantwortliches Element (*5' long terminal repeat*, LTR) sowie Zielgen und Selektionsmarker bereitgestellt (Grez *et al.*, 1990; Miller und Rosman, 1989).

pMSCVpuro stellt aufgrund des *env*-Strukturgens einen ecotrophen Virus dar, der ausschließlich Rezeptoren auf Zellen der Maus oder der Ratte erkennt. Durch den Einsatz des viralen Glycophüllproteins des *vesicular stomatitis virus* (VSV-G) wird das gebildete Virion pseudotypisiert und kann durch Rezeptor-unabhängige Fusion mit der Zellmembran Spezies-übergreifend infektiös wirken. Da eine stabile Expression von VSV-G toxisch ist, wurde die Verpackungszelllinie mit dem retroviralen Expressionsvektor pHCMV-VSV-G kotransfiziert, um eine transiente Expression von VSV-G zu erreichen. Die pseudotypisierten Viren können für die Infektion von DT40-Zellen eingesetzt werden.

4.2.2.18 Transfektion von Plat-E-Zellen mit FuGENE[®] zur Herstellung rekombinanter Viren

Als eine Verpackungszelllinie zur Herstellung rekombinanter, nicht replikationsfähiger Retroviren dienen Plat-E-Zellen. Die erzeugten Viren wurden im Anschluss für eine Transduktion von DT40-Zellen eingesetzt. Dazu wurden Plat-E-Zellen einen Tag vor Transfektion mit einer Konfluenz von 40 bis 50 % ausgesät.

Ein Reaktionsansatz wurde direkt vor Transfektion mit den folgenden Komponenten angesetzt:

200 μ L RPMI 1640 ohne Zusätze

7,5 μ L FuGENE[®]

2 μ g retroviraler Expressionsvektor (pMSCVpuro)

0,75 μ g pHCMV-VSV-G

Der Ansatz wurde für 20 bis 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zu den in 4 mL DT40-Medium aufgenommenen Plat-E-Zellen tropfenweise hinzugefügt. Die Zellen wurden 48 h bei 37 °C in 5 %iger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Der Zellkulturüberstand wurde nach einem Zentrifugationsschritt bei 300 x g für 4 min und 4 °C zur Infektion von DT40-Zellen eingesetzt (siehe Abschnitt 4.2.2.19).

4.2.2.19 Infektion von DT40-Zellen mit replikationsinkompetenten Retroviren

Für die Infektion mit VSV-G pseudotypisierten Retroviren wurden 1 x 10⁶ DT40-Zellen in 1,5 mL DT40-Medium und 3 mL retroviralem Überstand resuspendiert. Nach Zugabe von 3 μ g/mL Polybrene wurden die Zellen für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂-Anteil kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und nach 24 h Inkubation erfolgte die Zugabe von 1 μ g/mL Puromycin. Alle Arbeiten wurden unter S2-Sicherheitsbedingungen durchgeführt.

4.2.2.20 Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von IgM auf DT40-Zellen

Zur Expressionsanalyse von Oberflächen-IgM auf DT40-Zellen wurden 1 x 10⁶ DT40-Zellen in 1 x PBS gewaschen und für 4 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden in 100 μ L 1 x PBS resuspendiert und mit 1 μ L FITC-gekoppeltem anti-Hühner-IgM für 20 min unter Lichtausschluss auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 500 μ L 1 x PBS gewaschen und bei 300 x g für 4 min und 4 °C zentrifugiert. Die in 600 μ L 1 x PBS resuspendierten Zellen wurden direkt für durchflusszytometrische Analysen verwendet.

4.2.2.21 BCR-Stimulation von DT40-, Ramos- bzw. primären B-Zellen

Zur BCR-Stimulation wurden DT40- bzw. Ramos-Zellen geerntet, bei 300 x g für 4 min und 4 °C zentrifugiert und in einer Dichte von 2 bis 3 x 10⁷ Zellen/mL in RPMI 1640 resuspendiert. Primäre B-Zellen wurden aus der Milz isoliert (siehe Abschnitte 4.2.2.3

bzw. 4.2.2.4). Die Zellsuspensionen wurden auf dem Schüttler bei 550 rpm für 10 min bei 37 °C inkubiert. DT40-Zellen wurden anschließend mit 2 µg/mL M4, Ramos-Zellen mit 5 µg/mL F(ab')₂ α-IgM und primäre B-Zellen mit 10 µg/mL F(ab')₂ α-IgM + IgG (H+L) für eine festgelegte Zeit BCR-stimuliert. Die Reaktionen wurden durch Zentrifugation in der Tischzentrifuge und anschließender Lyse der Zellen in 200 µL eiskaltem Lysis-Puffer je 1 x 10⁷ Zellen gestoppt. Es erfolgte eine Inkubation auf Eis für 30 min mit anschließender Zentrifugation bei 20000 x g für 15 min bei 4 °C. Die geklärten Lysate wurden mit dem entsprechenden Volumen 5 x Laemmli-Puffer versetzt und gegebenenfalls direkt für GST-basierte Affinitätsaufreinigungen (siehe Abschnitte 4.2.14.2 bzw. 4.2.14.3) bzw. Immunpräzipitationen (siehe Abschnitt 4.2.14.4) verwendet oder bei 95 °C für 5 min inkubiert. Die Lagerung der Proben nach dem Aufkochen erfolgte bei -20 °C.

4.2.2.22 Analyse der Ca²⁺-Mobilisierung

Die Ca²⁺-Mobilisierung nach BCR-Stimulation wurde sowohl in DT40- als auch in primären B-Zellen unter Zuhilfenahme des Fluorophors Indo-1-AM am BD LSR II durchgeführt. Dieses Durchflusszytometer ermöglicht, neben der Messung der Ca²⁺-Mobilisierung, eine parallele Analyse markierter Oberflächenmoleküle zur Diskriminierung verschiedener Zell-Populationen in Primär-Zell-Suspensionen.

Indo-1-AM stellt ein ungeladenes, membrandurchlässiges Acetoxymethylester-Derivat dar, das bei einer mittels UV-Laser erzeugten Anregungswellenlänge von 355 nm ein Emissionsspektrum aufweist, das, je nach An- bzw. Abwesenheit von Ca²⁺, bei 400 nm bzw. 475 nm liegt. Das BD LSR II ist in der Lage, Lichtemissionen bei 405 nm bzw. 530 nm zu detektieren. Werden B-Zellen über ihren Antigenrezeptor stimuliert, kann die zeitliche Veränderung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration bei Markierung der Zellen mit Indo-1-Am ratiometrisch verfolgt werden. Dadurch lassen sich Einflüsse einer ungleichmäßigen Beladung und unterschiedlicher Zellgrößen während einer Messung minimieren.

Bei der Umwandlung des Ester-Derivates durch intrazelluläre Esterasen in eine freie Carbonsäure wird die Membrangängigkeit von Indo-1-AM stark eingeschränkt.

Zur Analyse der Ca²⁺-Mobilisierung wurden 1 x 10⁶ DT40-Zellen bzw. 5 x 10⁶ Milzzellen geerntet bzw. isoliert (siehe Abschnitte 4.2.2.3) und in 700 µL des entsprechenden Mediums mit 5 % FCS resuspendiert. Milzzellen wurden zuvor je nach Analyse mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern markiert (siehe Abschnitt 4.2.2.8).

Anschließend wurden die Zellen unter Lichtausschluss mit 0,75 μL Indo-1-AM (1 mM in DMSO) und 2,1 μL Pluronic F-127 (5 % (w/v) in ddH₂O) bei 30 °C für 25 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Das Detergenz Pluronic F-127 erleichtert die Membrangängigkeit von Indo-1-AM und verhindert die Einlagerung des Fluorophors in der Zellmembran. Darauffolgend wurden 700 μL vorgewärmtes Medium mit 10 % FCS zu den Zellen gegeben und für 10 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Zellsuspension wurde bei 300 x g für 4 min und RT zentrifugiert. Ein Waschschrift mit 600 μL Krebs-Ringer-Lösung versetzt mit 1 mM Ca²⁺ und eine anschließende Zentrifugation der Zellen bei 300 x g für 4 min und RT folgten. Nach Resuspension des Zellpellets in 600 μL Ca²⁺-haltiger Krebs-Ringer-Lösung wurden die Zellen bis zur weiteren Verwendung bei 28 °C inkubiert. Sollte eine Ca²⁺-Flux-Analyse durchgeführt werden, bei der zwischen einer Ca²⁺-Mobilisierung aus intrazellulären Speichern bzw. Ca²⁺-Einstrom über die Plasmamembran unterschieden wurde, erfolgte direkt vor der Messung eine Resuspension der Zellen in Ca²⁺-freier Krebs-Ringer-Lösung mit 0,5 mM EDTA (*add-back*-Messung). Nach Aufnahme des Emissionsverhältnisses bei 405 nm/530 nm für 30 sec wurden DT40-Zellen mit 1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ M4 und Milzzellen mit 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ F(ab')₂ α -IgM + IgG (H+L) stimuliert. Die Ca²⁺-Mobilisierung wurde für mindestens 5 min durchflusszytometrisch analysiert. Bei *add-back*-Messungen wurde frühestens nach 5 min eine 1 mM Ca²⁺-Konzentration eingestellt und die Ca²⁺-Mobilisierung für mindestens weitere 5 min analysiert. Die Aufzeichnung der Daten wurde unter Zuhilfenahme der Software BD FACSDiva™ bewältigt. Die anschließende Auswertung wurde mit dem Programm *FlowJo* durchgeführt.

4.2.3 Molekularbiologische Methoden

4.2.3.1 Restriktionsspaltung von DNA

Restriktionsendonukleasen wurden für die sequenzspezifische, hydrolytische Spaltung von DNA in den empfohlenen Puffern gemäß den Herstellerangaben eingesetzt.

4.2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Mittels Agarose-Gelelektrophorese wurden DNA-Moleküle nach ihrer Größe zur anschließenden Analyse aufgetrennt. Die Auftrennung wurde in einem 1 %igen Agarosegel (w/v), hergestellt mit TAE-Puffer, und 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ethidiumbromid durchgeführt. Die DNA-Proben wurden vor der Auftrennung mit 6 x DNA-Ladepuffer versetzt und gemeinsam mit einem DNA-Größenstandard auf das Agarosegel aufgetragen.

In einer mit TAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer erfolgte die Auftrennung bei 5 V/cm Elektrodenabstand. Aufgetrennte DNA-Moleküle wurden unter Bestrahlung mit UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht (590 nm).

4.2.3.3 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurden mittels *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean Up System* gemäß den Herstellerangaben isoliert. Zur Elution der DNA wurden 30 bis 50 µL ddH₂O eingesetzt.

4.2.3.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dabei wurde die optische Dichte (OD) bei 260 nm wie folgt in Korrelation zur Konzentration gesetzt:

$$OD_{260} = 1 \cong 50 \mu\text{g/mL dsDNA in ddH}_2\text{O}$$

Die Reinheit der DNA wurde über den Quotienten der optischen Dichte der Lösung bei 260 und 280 nm errechnet:

$$\text{Reine DNA } OD_{260}/OD_{280}: \geq 1,8$$

4.2.3.5 5'-Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Um die Religation eines linearisierten Plasmids bzw. die Entstehung von Vektor-Konkatameren zu verhindern, wurden die 5'-PO₄-Enden vor einer Ligation abgespalten. Durch die *calf intestine phosphatase* (CIP) wurde die selektive Hydrolyse der PO₄-Gruppen katalysiert. Dazu wurde einem Restriktionsverdau 1 U CIP pro 20 µL Reaktionsvolumen hinzugefügt und bis zu 1h bei 37 °C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde anschließend einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen bzw. direkt aufgereinigt (siehe Abschnitte 4.2.3.2 bzw. 4.2.3.3).

4.2.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Das Enzym T4-DNA-Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen den 3'-Hydroxy- bzw. 5'-PO₄-Enden von DNA-Fragmenten. Zur Ligation von linearisierter Plasmid-DNA mit DNA-Fragmenten wurde folgender, typischer Reaktionsansatz hergestellt:

1 µL Vektor-DNA

7,5 µL *Insert*

1 μL 10 x Ligase-Puffer

0,5 μL T4-DNA-Ligase (3 U)

Als Negativkontrolle dienten Ligationsansätze ohne Insert. Nach Inkubation für mindestens 5 min bei Raumtemperatur wurden 6 μL der Ansätze für die Transformation von kompetenten Bakterien eingesetzt.

4.2.4 Herstellung transformationskompetenter *E.coli*-Bakterien

Um transformationskompetente *E.coli* herzustellen, wurde eine mit dem entsprechenden Bakterienstamm angeimpfte 5 mL-Übernachtskultur in LB-Medium bei 37 °C im Schüttelinkubator kultiviert (siehe Abschnitt 4.1.12). 900 μL dieser Kultur wurden zur Animpfung von 150 mL LB-Medium eingesetzt und bis zu einer OD600 von 0,45 bis 0,55 bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Es erfolgte eine Lagerung auf Eis für 10 min mit anschließender Zentrifugation der Suspension bei 2000 x g für 10 min bei 4 °C. Das Bakterienpellet wurde in 30 mL TFB I-Puffer resuspendiert. Nach einer weiteren Inkubation für 10 min auf Eis und einem Zentrifugationsschritt bei 2000 x g für 10 min bei 4 °C wurde das Pellet in 6 mL TFB II-Puffer aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde zu 50 μL aliquotiert und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Eine weitere Lagerung der Aliquots erfolgte bei -80 °C.

4.2.5 Transformation kompetenter Bakterien

Bei der Transformation kompetenter *E.coli* bindet DNA an die Oberfläche der Bakterien und passiert durch einen Hitzeimpuls die Zellmembran. Dazu wurden 50 μL der Bakteriensuspension mit 10 bis 50 ng Plasmid-DNA oder 5 bis 10 μL eines Ligationsansatzes hinzugefügt. Anschließend erfolgten eine Inkubation für 42 min auf Eis und ein 42 sek dauernder Hitzeschock bei 42 °C. Im Anschluss wurde die Suspension 5 min auf Eis inkubiert und auf 37 °C vorgewärmten LB-Ampicillin-Agarplatten ausgestrichen. Diese wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert.

4.2.6 Langzeitaufbewahrung von Bakterienstämmen

Zur Langzeitlagerung von *E.coli*-Stämmen wurden 2 mL einer frischen Bakterienkultur für 5 min bei RT und 2000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde 1,2 mL des Überstandes verworfen und das Bakterienpellet in dem verbleibenden Medium und 0,2 mL zugesetztem Glycerin resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

4.2.7 Analytische Plasmidisolierung (Miniprep)

Für die analytische Plasmidisolierung wurden 5 mL LB-Ampicillin-Medium mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator kultiviert. Die anschließende Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem *Wizard®Plus SV Miniprep DNA Purification System* gemäß den Herstellerangaben. Die Elution der DNA wurde mit 70 bis 100 µL Elutionspuffer oder ddH₂O vorgenommen.

4.2.8 Präparative Plasmidisolierung (Midiprep)

Zur Aufreinigung größerer Mengen Plasmid-DNA wurden 100 bis 150 mL LB-Ampicillin-Medium mit einem Bakterienklon inokuliert und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Mit Hilfe des *Pure Yield™ Plasmid Midiprep System* erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA gemäß den vom Hersteller gemachten Angaben. Die Plasmid-DNA wurde mit 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) bzw. ddH₂O auf eine DNA-Konzentration von 1 µg/µL eingestellt.

4.2.9 Isolierung genomischer DNA aus DT40 B-Zellen

Für PCR-Analysen wurden DT40 Zellen einmal mit 1 x PBS gewaschen und in K-Puffer mit einer Konzentration von $5 \cdot 10^3$ Zellen/µL resuspendiert. Die Suspension wurde bei 56 °C für mindestens 45 min und anschließend bei 95 °C für 30 min inkubiert, um die Proteinase K zu inaktivieren. Die genomische DNA der Zelllysate wurde direkt für eine PCR eingesetzt.

4.2.10 DNA-Isolierung aus Schwanzbiopsien

Schwanzspitzen von Mäusen dienten als Material für die Isolierung genomischer DNA. Die Schwanzspitzen wurden mit jeweils 220 µL 1 x MGB-Puffer mit 1 % β-Mercaptoethanol; 0,05 % Triton X-100; 1 mg/mL Proteinase K versetzt und bei 56 °C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Inkubation der Lysate bei 95 °C für 20 min gestoppt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 2000 x g für 10 min wurde 1 µL des Überstandes als *template* für die PCR-Analyse verwendet (siehe Abschnitt 4.2.12).

4.2.11 Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR)

Die reverse Transkriptions-PCR eignet sich für die Analyse der Genexpression auf RNA-Ebene. Die reverse Transkription von Gesamt-RNA in Einzelstrang-cDNA wurde mit dem

RevertAid™ H Minus First Strand cDNA-Synthesis Kit, welches die *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (MMLV-RT) beinhaltet, durchgeführt. Reife eukaryotische mRNA besitzt in der Regel ein polyA 3'-Ende, wodurch die Amplifikation des Erststranges der cDNA mit Hilfe von komplementären oligo-dT-Primern und einer retroviralen, RNA-abhängigen DNA-Polymerase katalysiert werden kann. Die cDNA wird im Anschluss durch konventionelle PCR mit Hilfe der *Taq*-DNA-Polymerase amplifiziert (siehe Abschnitt 4.2.12). Für die Synthese der cDNA wurden 0,5-1,0 µg Gesamt-RNA mit RNase-freiem ddH₂O auf ein Volumen von 12 µL eingestellt.

Der Ansatz wurde für 3 min bei 70 °C inkubiert und anschließend schnell auf Eis gekühlt. Die folgenden Reagenzien wurden hinzugefügt:

Hitzenaturierte Gesamt-RNA (0,5 bis 1,0 µg) 12 µL

5 x MMLV-Reaktionspuffer 4 µL

Oligo-dT-Primer₁₂₋₁₈ (100 ng/µL) 1 µL

dNTPs (10 mM) 1 µL

DTT (0,1 M) 0,5 µL

RNaseOUT™ (40 U/µL) 0,5 µL

MMLV-Reverse Transkriptase (200 U/µL) 0,5 µL

Der Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µL wurde für eine h bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurde das Reaktionsgemisch für eine konventionelle PCR verwendet (siehe Abschnitt 4.2.12) oder bei -20 °C gelagert.

4.2.12 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode zur selektiven *in vitro*-Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase (Mullis, 1990; Saiki, 1988). Sie entwickelte sich seit ihrer Einführung 1985 zu einer der leistungsfähigsten Werkzeuge in der Molekularbiologie (Saiki *et al.*, 1985, Mullis *et al.*, 1986, Mullis und Faloona, 1987). Dabei wird der zu amplifizierende DNA-Bereich durch zwei synthetische Oligonukleotide (*forward*- und *reverse*-Primer) definiert, die sich komplementär an die bekannten Enden der zu amplifizierenden Zielsequenz anlagern. Eine thermostabile DNA-Polymerase verlängert die Oligonukleotid-Primer, wobei 2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphate (dNTPs) benötigt werden. Zu Beginn des aus drei Schritten bestehenden PCR-Zyklus wird die doppelsträngige Matrizen-DNA thermisch zu Einzelsträngen denaturiert. Dabei wird der PCR-Ansatz für circa 30 Sekunden auf 94 °C erhitzt. Durch Abkühlen des

Reaktionsgemischs erfolgt die spezifische Hybridisierung der Oligonukleotid-Primer mit den komplementären Enden der Zielsequenz durch homologe Basenpaarung (*annealing*). Die entstandenen doppelsträngigen Sequenzbereiche dienen der thermostabilen DNA-Polymerase als Startpunkt für die DNA-Synthese (Elongation). Dabei wird die Temperatur der Reaktionsmischung dem Temperaturoptimum der DNA-Polymerase angepasst. Wird diese Reaktionsfolge 20 bis 35 Mal durchgeführt, so führt dies zu einer exponentiell ansteigenden Amplifikation der Ziel-DNA. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die *Taq*-DNA-Polymerase des Eubakteriums *Thermus aquaticus* und die *Pfu*-DNA-Polymerase des marinen Archaeobakteriums *Pyrococcus furiosus* verwendet. Die *Taq*-Polymerase besitzt neben ihrer matrizenabhängigen 5'-3'-Polymeraseaktivität und ihrer 5'-3'-Exonukleaseaktivität ebenso eine matrizenunabhängige Polymeraseaktivität, durch welche häufig ein Desoxyadenosin an das 3'-Ende von DNA-Strängen angefügt wird (Clark, 1988). Diese matrizenunabhängige Polymeraseaktivität wird bei der *Pfu*-DNA-Polymerase nicht beobachtet. Sie zeichnet sich durch eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität aus (Lundberg *et al.*, 1991), die falsch eingebaute 3'-terminale Nukleotide entfernt und durch korrekte ersetzt. Zur Amplifikation eines DNA-Abschnitts wurden anhand der Sequenzinformation Oligonukleotide an flankierenden Abschnitten synthetisiert, die eine Länge von 18 bis 24 Nukleotiden und einen GC-Gehalt von 40 bis 60 % aufwiesen. Die Berechnung der Anlagerungstemperatur erfolgte anhand folgender Näherungsformel für die Schmelztemperatur (T_m) doppelsträngiger DNA: $T_m = 2 \text{ °C (A + T) + 4 °C (C + G)}$. Folgende

DNA-Polymerasen wurden für unterschiedliche Anwendungen eingesetzt:

DNA-Polymerase	Prozessivität (Basen/min)	Elongation T [°C]	3'-5'-Exonukleaseaktivität	A-Überhänge	Anwendung
<i>Taq</i>	1000	72	Nein	Ja	Analytische PCR
<i>Pfu</i>	500	68-72	Ja	Nein	cDNA-Amplifikation
<i>LA-Taq</i>	1000	68-72	Ja	Ja	Genomische PCR
Prime-star	1000	72	Ja	Nein	Genomische PCR

Tab.4.1: DNA-Polymerasen und Einsatzgebiet

Zur Durchführung einer PCR wurden 10 ng bis 150 ng DNA-Matrize in einem Endvolumen von 20 bis 50 μL eingesetzt. Die Primerkonzentrationen lagen bei 0,2 μM und die finale Konzentration eingesetzter dNTP variierte zwischen 100 und 400 μM . Alle DNA-Polymerasen wurden gemäß den Herstellerangaben mit den dazugehörigen Puffern verwendet. Die Reaktionsansätze wurden auf Eis hergestellt und direkt in einen auf 95 °C temperierten Heizblock überführt.

Folgendes allgemeine PCR-Programm wurde verwendet:

- 1) 94 °C/98 °C für 2 Min.
- 2) 94 °C/98 °C für 45 Sek.
- 3) 50 °C bis 68 °C für 0,5 bis 1 min
- 4) 68 °C/72 °C 1 min/kb bzw. 2 min/kb
- 5) Wiederholung Schritte 2 bis 4; 25- bis 35-mal
- 6) 68 °C/72 °C für 10 Min.
- 7) 10 °C

Die amplifizierten PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 4.2.3.2) aufgereinigt und für Klonierungsexperimente eingesetzt.

4.2.13 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden von den Firmen MWG-Biotech bzw. SeqLab nach der Didesoxymethode durchgeführt (Sanger *et al.*, 1977).

4.2.14 Proteinbiochemische Methoden

4.2.14.1 Phycoerythrin (PE)-Kopplung an 4-OH-3-Iodo-5-Nitrophenylacetyl (NIP)-BSA

Die Kopplung von PE an NIP-BSA wurde mit dem *R-Phycoerythrin Labeling Kit-SH* gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. NIP-BSA-PE wurde in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ unter Lichtausschluss bei 4 °C gelagert.

4.2.14.2 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Mit Hilfe des *GST Gene Fusion Systems* wurde die Expression von Fusionsproteinen, die aus dem Enzym Glutathion-S-Transferase (GST) und einem Zielprotein bestehen, durchgeführt.

Dazu wurde in den Expressionsvektor pGEX-4T-1 die entsprechende Ziel-cDNA ligiert (siehe Abschnitt 4.2.3.6). Der Vektor verfügt über einen IPTG-induzierbaren *tac*-Promotor, durch den die Expression des Fusionsproteins nach Transformation des Plasmids in *E.coli* BL21(D3) gesteuert wird. Zusätzlich weist der Vektor das *lac I^q* Gen auf, welches für den Repressor des *tac*-Promotors kodiert, wodurch die Expression eines GST-Fusionsproteins in Abwesenheit von IPTG weitestgehend inhibiert wird.

Zur Herstellung von Fusionsproteinen wurden 500 mL LB-Amp-Medium mit einer 5 mL transformierten BL21(D3)-Übernachtskultur angeimpft (siehe Abschnitt 4.2.5) und bei 37 °C unter Schütteln bis zum Erreichen einer OD600 von 0,5 bis 1 inkubiert. Durch anschließende Einstellung der IPTG-Konzentration auf 100 µM erfolgte die Induktion der Proteinexpression. Nach 3 bis 4 h Inkubation bei 37 °C wurden die Bakterien bei 3000 x g für 20 min und 4 °C pelletiert. Die Bakterien wurden über Nacht bei -80 °C eingefroren. Anschließend erfolgte eine Resuspension des Pellets in 20 mL 1 x PBS, versetzt mit 500 µL Protease-Inhibitor-Cocktail. Die Lyse der Bakteriensuspension wurde mit 5 x 30 Ultraschall-Stößen und darauffolgender Zugabe von 2 mL 10 % Triton-X-100 durchgeführt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde das Lysat für 1 h bei 5000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die im Überstand vorhandenen GST-Fusionsproteine wurden durch Hinzufügen von 0,5 bis 1 mL 50 % Glutathion-Sepharose und Inkubation bei 4 °C im Rotator für mindestens 1 h inkubiert. Die Sepharose wurde anschließend mit 10 mL kaltem 1 x PBS dreimal gewaschen und jeweils bei 250 x g mit langsamer Zentrifugenbeschleunigung für 2 min und 4 °C zentrifugiert. Es erfolgte eine erneute Inkubation der Sepharose-Matrix mit 2 mL Elutionspuffer für 20 min im Rotator bei 4 °C. Die Bestimmung der Proteinmenge wurde mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 4.2.14.5) und anschließender *Coomassie*-Färbung durchgeführt.

4.2.14.3 GST-basierte Affinitätsaufreinigung

Zur Affinitätsaufreinigung mit GST-Fusionsproteinen wurden 2 bis 3 x 10⁷ unstimulierte oder BCR-stimulierte DT40- bzw. Ramos-Zellen (siehe Abschnitt 4.2.2.21) mit Lysepuffer und Proteinase-Inhibitor-Cocktail lysiert. Es erfolgte eine Inkubation auf Eis für 30 min und ein Zentrifugationsschritt bei 20000 x g für 15 min bei 4 °C. Der Überstand wurde mit 4 bis 6 µg des entsprechenden, aufgereinigten GST-Fusionsproteins oder GST und 20 µL Glutathion-Sepharose für mindestens 1 h bei 4 °C im Rotator inkubiert. Die Matrix wurde viermal mit Lysepuffer gewaschen und jeweils bei 250 x g mit langsamer Zentrifugenbeschleunigung für 2 min und 4 °C zentrifugiert. Die Glutathion-Sepharose

wurde mit dem entsprechenden Volumen 5 x Laemmli-Puffer versetzt, bei 95 °C für 5 min inkubiert und direkt für eine SDS-PAGE eingesetzt. Eine Lagerung der Proben erfolgte bei -20 °C.

4.2.14.4 Immunpräzipitation (IP)

Zur Immunaufreinigung von Proteinen wurden 600 µL geklärte Lysate (siehe Abschnitt 4.2.2.21) mit dem jeweiligen Antikörper und 20 µL Protein-A/G-Agarose versetzt. Die Lysate wurden mindestens 1 h bei 4 °C auf dem Rotator inkubiert. Anschließend erfolgten vier Waschschrte mit 600 µL Lysis-Puffer und jeweiliger Zentrifugation bei 200 x g und langsamer Zentrifugenbeschleunigung für 2 min bei 4 °C. Die Agarose wurde in 50 µL 2 x Laemmli-Puffer für 5 min bei 95 °C aufgekocht. Die aufgereinigten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (siehe Abschnitt 4.2.14.5) und einer *Western-Blot*-Analyse unterzogen (siehe Abschnitt 4.2.14.6).

4.2.14.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch den Einsatz der diskontinuierlichen SDS-PAGE werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Lämmli, 1970; Weber und Osborn, 1969). Diese werden vor der elektrophoretischen Auftrennung über eine Polyacrylamid-Matrix mit dem anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) versetzt. Dieses Detergenz denaturiert Proteine und umgibt sie durch Bindung an hydrophobe Bereiche mit einer stark negativen Ladung. Durch das nahezu konstante Bindungsverhältnis von 1,4 g SDS pro g Protein, besitzen SDS-beladene Proteine ein fast identisches Ladungs-Masse-Verhältnis. Die Auftrennung im elektrischen Feld ist aus diesen Gründen auf die unterschiedliche molare Masse der Proteine zurückzuführen. Um das ungefähre Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine zu bestimmen, wird bei der SDS-PAGE ein Proteinstandard für die Bestimmung der molekularen Massen aufgetragen. Die vor Gebrauch hergestellten Polyacrylamidgele bestanden aus je einem 5 %igen Sammelgel, zur Aufkonzentrierung der Proteine, sowie aus einem 10 %igen Trenngel, welches zur Auftrennung der einzelnen Proteine dient. Die Gele wurden mittels der Elektrophorese-Systeme der Firmen BioRad erzeugt.

Der Gel-Lauf erfolgte mittels Verwendung eines Laufpuffers bei konstanter Stromstärke (Mini-Gele: 20 bis 25 mA für 1 bis 2 h; große Gele: 10 mA für 12 bis 15 h oder 30 bis 35 mA für 4 bis 6 h). Aufgetrennte Proteine wurden mit Coomassie gefärbt bzw. einer *Western Blot*-Analyse unterzogen (siehe Abschnitt 4.2.14.6).

4.2.14.6 *Western-Blot-Analyse*

Um die bei der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine zu detektieren, wurden diese mittels vertikaler Elektrophorese auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Für diesen Transfer wurden die *Semi-Dry-Blotting*-Apparaturen von Amersham verwendet. Es wurden eine Lage Whatman-Papier, die Nitrocellulose-Membran, das Polyacrylamid-Gel und eine weitere Lage Whatman-Papier, die alle zuvor in Transfer-Puffer getränkt wurden, zwischen die Elektroden der *Blotting*-Apparatur gelegt. Das *Blotting* erfolgte bei einer Stromstärke von höchstens $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gel für 60 min. Anschließend wurde die Nitrozellulose-Membran zur Absättigung Protein-freier Bereiche für 1 h bei Raumtemperatur in Block-Puffer inkubiert. Daraufhin wurde die Membran mehrmals mit PBS-T gewaschen. Anschließend wurde ein für die zu detektierenden Proteine spezifischer Antikörper in PBS-T mit 5 % BSA und 0,01 % Natriumazid in angebrachter Verdünnung auf die Membran gegeben. Die Inkubation erfolgte für mindestens 1 h bei Raumtemperatur oder für 12 bis 15 h bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Daraufhin wurde die Membran zur Entfernung nicht gebundener Antikörper 3 mal 5 min mit PBS-T gewaschen und anschließend für 1 h mit einem gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichteten HRPO-markierten Sekundärantikörper unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran wiederum dreimal für je 10 min mit PBS-T gewaschen. Zur Herstellung der *Western-Blot*-Detektionslösung wurden die Lösungen A und B im Verhältnis 10:1 gemischt und mit 0,027 % (v/v) H_2O_2 (30 %) versetzt. Anschließend erfolgte die digitale Entwicklung mit Hilfe einer Dokumentationsanlage.

5 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine funktionelle Charakterisierung der sowohl strukturell als auch funktionell analogen Adapterproteine mAbp1 bzw. HS1 in Zellen hämatopoietischen Ursprungs erfolgen (zur Übersicht: Daly, 2004; Weed und Parsons, 2001). Für die Analysen standen mAbp1- bzw. HS1-defiziente Mäuse zur Verfügung (Connert *et al.*, 2006; Taniuchi *et al.*, 1995). Vergleichende Studien mit wildtypischen Mäusen sollten Aufschlüsse über die Auswirkungen der Defizienzen in hämatopoietischen Zellen geben.

5.1 Interaktion von mAbp1 und HS1 in Maus-B-Lymphocyten

Da mAbp1 und HS1, wie oben erwähnt, vielseitige Analogien aufweisen und durch Koimmunpräzipitationen die Interaktion von mAbp1 und HS1 in humanen B-Lymphocyten nachgewiesen wurde (Muzio *et al.*, 2007), sollte diese Interaktion in B-Zellen der Maus durch Immunpräzipitationsexperimente verifiziert, werden.

Dazu wurden B-Lymphocyten aus wildtypischen bzw. HS1-defizienten Mäusen isoliert und unbehandelt belassen oder über ihren BCR stimuliert. Die für Immunpräzipitationen eingesetzten Lysate wurden mit Antikörpern gegen HS1 inkubiert. Aufgereinigte Proteine wurden einer SDS-PAGE unterzogen, und die aufgetrennten Proteine im *Western Blot* mittels Antikörper gegen mAbp1 bzw. HS1 nachgewiesen.

HS1 in B-Lymphocyten interagiert sowohl vor als auch nach BCR-Stimulation mit mAbp1 (Abb. 5.1, Spuren 7 und 8, oben). Ein Nachweis von HS1 im *Western Blot* wurde als Immunpräzipitationskontrolle durchgeführt (Abb. 5.1, Spuren 7 und 8, unten). Durch die geringere Menge an immunpräzipitiertem HS1 nach BCR-Stimulation wurde dementsprechend weniger mAbp1 koimmunaufgereinigt (Abb. 5.1, Spuren 7 und 8, oben und unten). Anhand einer densitometrischen Auswertung wurden die Verhältnisse der mAbp1/HS1-Bandenintensitäten vor bzw. nach BCR-Stimulation verglichen. Dadurch konnte eine Reduktion der mAbp1-HS1-Bindungskompetenz nach BCR-Stimulation von 30 % nachgewiesen werden. Aus unbehandelten bzw. stimulierten HS1-defizienten B-Zellen konnte mAbp1 mittels Immunaufreinigungen im *Western Blot* nicht detektiert werden (Abb. 5.1, Spuren 5 und 6, oben). Proteinladekontrollen bestätigten den Einsatz gleicher Mengen mAbp1 (Abb. 5.1, Spuren 1 bis 4, oben) bzw. HS1 (Abb. 5.1, Spuren 3 bis 4, unten) zu den jeweiligen Stimulationszeitpunkten.

Auf Grundlage der Daten konnte ich eine Interaktion von mAbp1 und HS1 in B-Lymphocyten der Maus sowohl vor als auch nach BCR-Stimulation nachweisen.

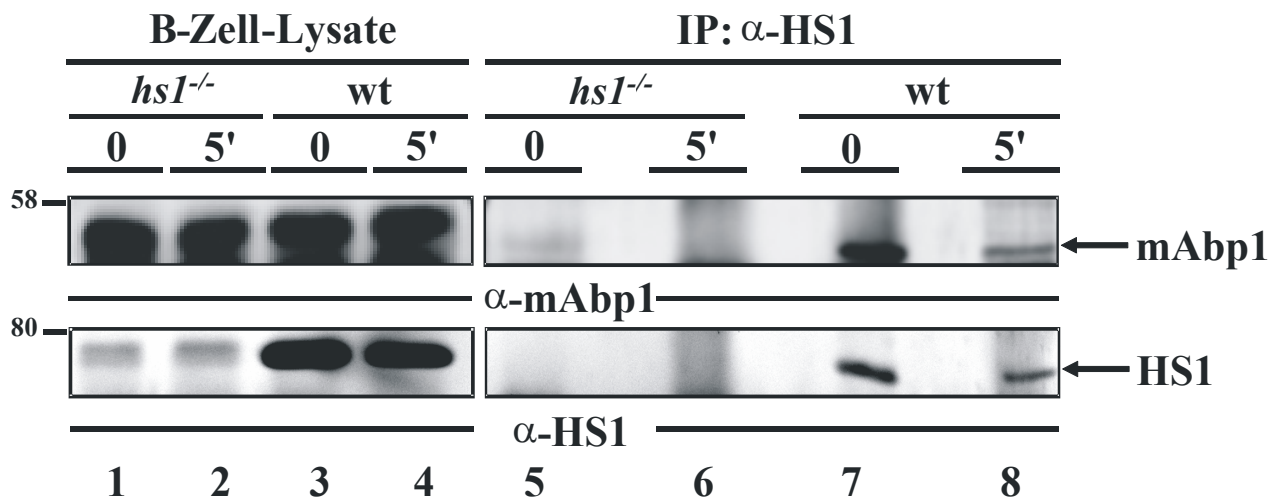


Abb. 5.1: Interaktion von mAbp1 und HS1 vor und nach BCR-Stimulation

Je 5×10^7 HS1-defiziente (Spuren 1, 2, 5 und 6) bzw. wildtypische (Spuren 3, 4, 7 und 8) Milz-B-Zellen aus Mäusen wurden isoliert und für 0 (Spuren 1, 3, 5, und 7) bzw. 5 Minuten (Spuren 2, 4, 6 und 8) mit $10 \mu\text{g/mL}$ $\text{F(ab}')_2$ α -IgM + IgG (H+L) stimuliert und lysiert. Die Lysate (Spuren 1 bis 4) aus je 5×10^6 Zellen wurden als Proteinladekontrolle eingesetzt. Die restlichen Lysate aus je $4,5 \times 10^7$ Zellen wurden für IP mit Antikörpern gegen HS1 verwendet (Spuren 5 bis 8). Aufgereinigte Proteine wurden einer SDS-PAGE unterzogen und im *Western Blot* mit anti-mAbp1-Antikörpern detektiert (oben). Als Proteinladekontrolle für die IP diente eine *Western Blot*-Analyse mit Antikörpern gegen HS1 (unten). Die relativen molekularen Massen sind in kDa an der linken Seite angegeben. Die Abbildung spiegelt das repräsentative Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten wider.

5.2 Generierung mAbp1/HS1-defizienter Mäuse

Da die Adapterproteine mAbp1 und HS1 sowohl strukturelle als auch funktionelle Analogien aufweisen (zur Übersicht: Daly, 2004; Weed und Parsons, 2001) und eine Interaktion beider Proteine in B-Lymphocyten gezeigt werden konnte (siehe Abschnitt 5.1), sollten mögliche redundante Funktionen beider Moleküle in B-Zellen analysiert werden. Dazu sollte eine mAbp1/HS1 doppelt-defiziente Mauslinie etabliert werden.

HS1-defiziente C57BL/6 Mäuse wurden im Labor von Dr. Takeshi Watanabe hergestellt und unserem Labor freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Taniuchi *et al.*, 1995).

Um die Funktion des Adapterproteins mAbp1 zu analysieren, wurde bereits auf dem genetischen Hintergrund eines homogenen Balb/c Maus-Inzuchtstammes eine mAbp1-defiziente Maus generiert (Connert *et al.*, 2006). Um die Auswirkungen einer Inaktivierung von mAbp1 und HS1 in C57BL/6 Mäusen zu untersuchen, wurden Rückkreuzungen mAbp1-defizienter Balb/c Tiere in den Mausstamm C57BL/6 durchgeführt. Die Initiierung

der Experimente erfolgte unter der Aufsicht von Dr. S. Wienand in den tierexperimentellen Einrichtungen der Universität Bielefeld (Wienand, 2006). Die Sanierung der *mAbp1*-defizienten C57BL/6 Linie erfolgte unter SPF-Bedingungen mittels Embryotransfer im Maushaus des MPI für Experimentelle Medizin in Göttingen.

Für die Herstellung *mAbp1*/HS1-defizienter Mäuse wurden *mabp1*^{-/-} Mäuse mit *hs1*^{-/-} Mäusen verpaart (Abb. 5.2).

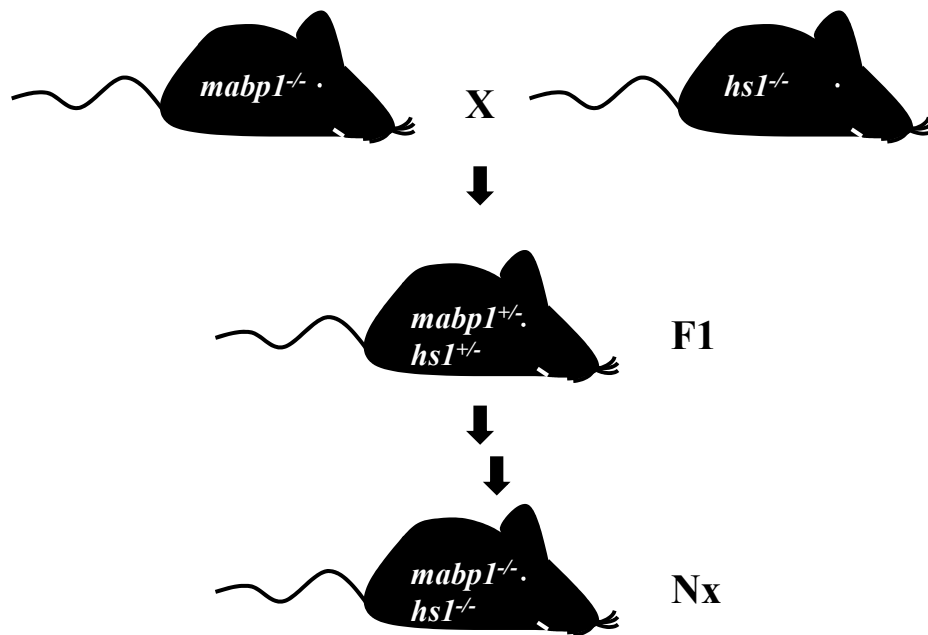


Abb. 5.2: Kreuzungsschema zur Generierung *mAbp1*/HS1-defizienter Mäuse

C57BL/6 *mAbp1*-defiziente Mäuse wurden mit C57BL/6 HS1-defizienten Mäusen gekreuzt. Die heterozygote F1-Generation wurde fortlaufend bis zum Erhalt *mAbp1*/HS1-defizienter Tiere in Generation Nx verpaart.

5.3 Durchflusszytometrische Analyse der Zusammensetzung des B-Zell-Kompartiments in wildtypischen, HS1- bzw. *mAbp1*/HS1-defizienten Milzen der Maus

Um eine mögliche, redundante Funktion von *mAbp1* und HS1 in der B-Zell-Entwicklung nachzuweisen, wurden B-Lymphocyten aus wildtypischen, HS1- bzw. *mAbp1*/HS1-defizienten Mäusen durchflusszytometrisch anhand der Charakterisierung der Oberflächenexpression von B220, CD21 bzw. CD24 analysiert. Die Oberflächenproteine CD21 bzw. CD24 erlauben die Differenzierung von frühen bzw. späten Entwicklungsstadien der B-Zellen in der Milz. Eine frühe B-Zell-Population stellen transitionale B-Zellen vom Typ 1 (T1) dar, die CD21-positiv, CD24-negativ sind. Transitionale B-Zellen vom Typ 2 (T2) exprimieren sowohl CD21 als auch CD24. Reife B-Zellen, die aus T1 bzw. T2 B-Zellen entstehen können, weisen kaum CD21 bzw. CD24

auf ihrer Oberfläche auf (Loder *et al.*, 1999). Alle hier gezeigten Daten entstanden in Kooperation mit Dr. K. Dittmann.

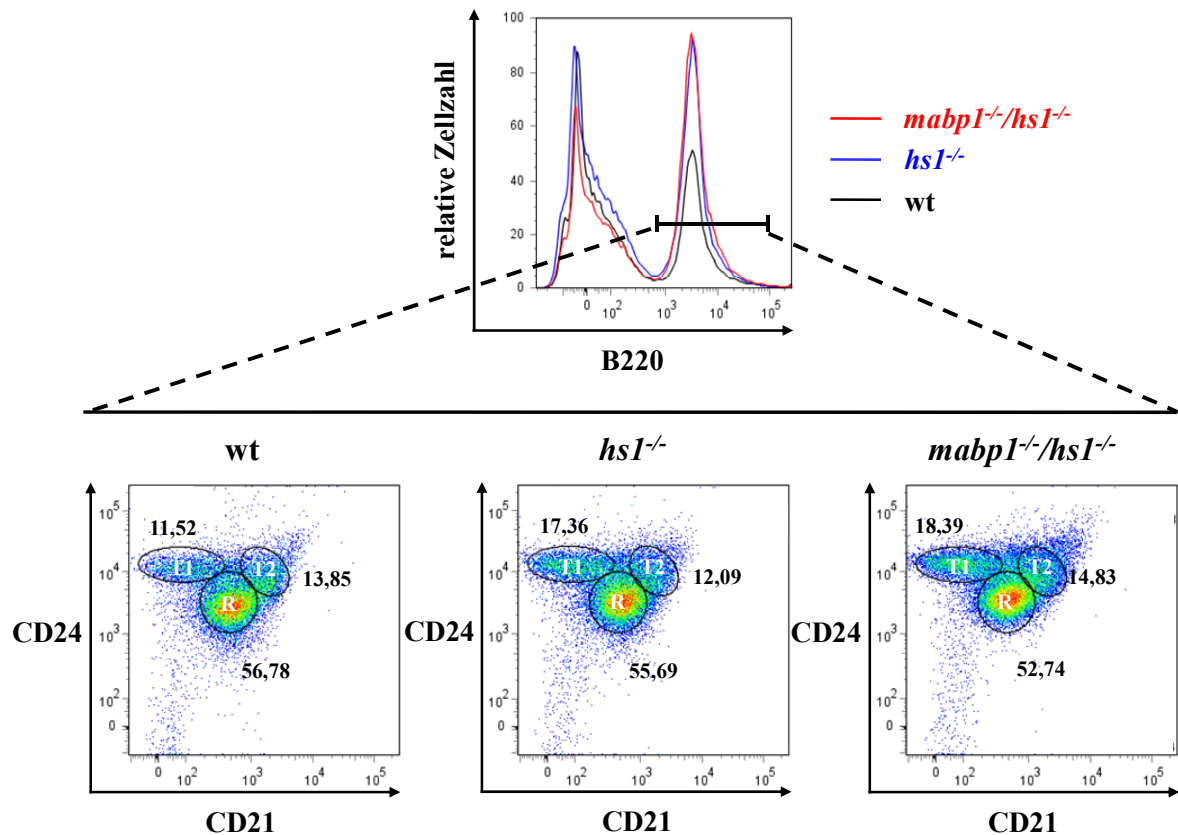


Abb. 5.3: Gleiche Zusammensetzung des B-Zell-Kompartiments in wildtypischen, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten Milzen

1 x 10⁶ Milzzellen von wildtypischen, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten Mäusen wurden isoliert und mit Fluorophor-markierten Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle B220, CD21 und CD24 inkubiert. Mittels durchflusszytometrischer Analysen wurden die Milzzellen im SSC/FSC aufgetrennt und anhand der B220-Oberflächenexpression unterschieden (oben, Histogramm). Eine weitere Diversifizierung B220-positiver Zellen erfolgte anhand der CD21- bzw. CD24-Oberflächenexpression (unten). Die relativen prozentualen Verteilungen transistionaler (T1, T2) bzw. reifer (R) B-Zellen sind angegeben. Die Abbildung spiegelt das repräsentative Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen wider.

Der Vergleich der B220-Oberflächenexpression von HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten Milzzellen ergab eine erhöhte relative Zellzahl an B220-positiven Zellen im Vergleich zu wildtypischen Zellen (Abb. 5.3, oben). Wurden diese Zellfraktionen gleichzeitig auf die Expression von CD21 und CD24 untersucht, so konnten in wildtypischen, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten Milzzellen sowohl T1, T2 als auch reife (R) B-Zellen detektiert werden. Die relativen Verteilungen der Populationen von HS1- bzw. mAbp1/HS1-

defizienten Milzzellen wiesen keine Unterschiede im Vergleich zu wildtypischen Mäusen auf (Abb. 5.3, unten).

Zusammenfassend deuten die Daten darauf hin, dass die B-Zell-Entwicklung in Abwesenheit von HS1 bzw. mAbp1 und HS1 nicht beeinträchtigt wurde. Eine redundante Funktion der beiden Proteine in der B-Zell-Entwicklung war nicht erkennbar.

5.4 Durchflusszytometrische Analyse der Verteilung von CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen in wildtypischen, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten Milzen der Maus

Im Rahmen der durchflusszytometrischen Analyse der Zusammensetzung des B-Zell-Kompartiments wurden auch die prozentualen Verhältnisse der T-Zellen in der Milz untersucht. Reife T-Zellen können aufgrund der Oberflächenproteine CD4 bzw. CD8 unterschieden werden (Cantor und Boyse, 1975; Reinherz *et al.*, 1979; Shiku *et al.*, 1975). T-Zell-Entwicklungsdefekte in mAbp1- bzw. HS1-einfach-defizienten Mäusen wurden bislang nicht beobachtet (Taniuchi *et al.*, 1995; Wienand, 2006). Um einen Anhaltspunkt für redundante Funktionen von mAbp1 und HS1 in der T-Zell-Entwicklung zu erhalten, wurde die Verteilung peripherer CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen in doppelt-defizienten Mäusen durchflusszytometrisch analysiert. Dazu wurden wildtypische, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defiziente T-Zellen aus der Milz mittels Fluorophor-gekoppelter Antikörper gegen CD4, CD8 bzw. B220, zur Unterscheidung der B-Lymphocyten, inkubiert. Die Zellen wurden im SSC und FSC bezüglich ihrer Granularität bzw. Größe aufgetrennt und alle B220-negativen Zellen (Abb. 5.4, oben) entsprechend der Expression von CD4 bzw. CD8 untersucht (Abb. 5.4, unten).

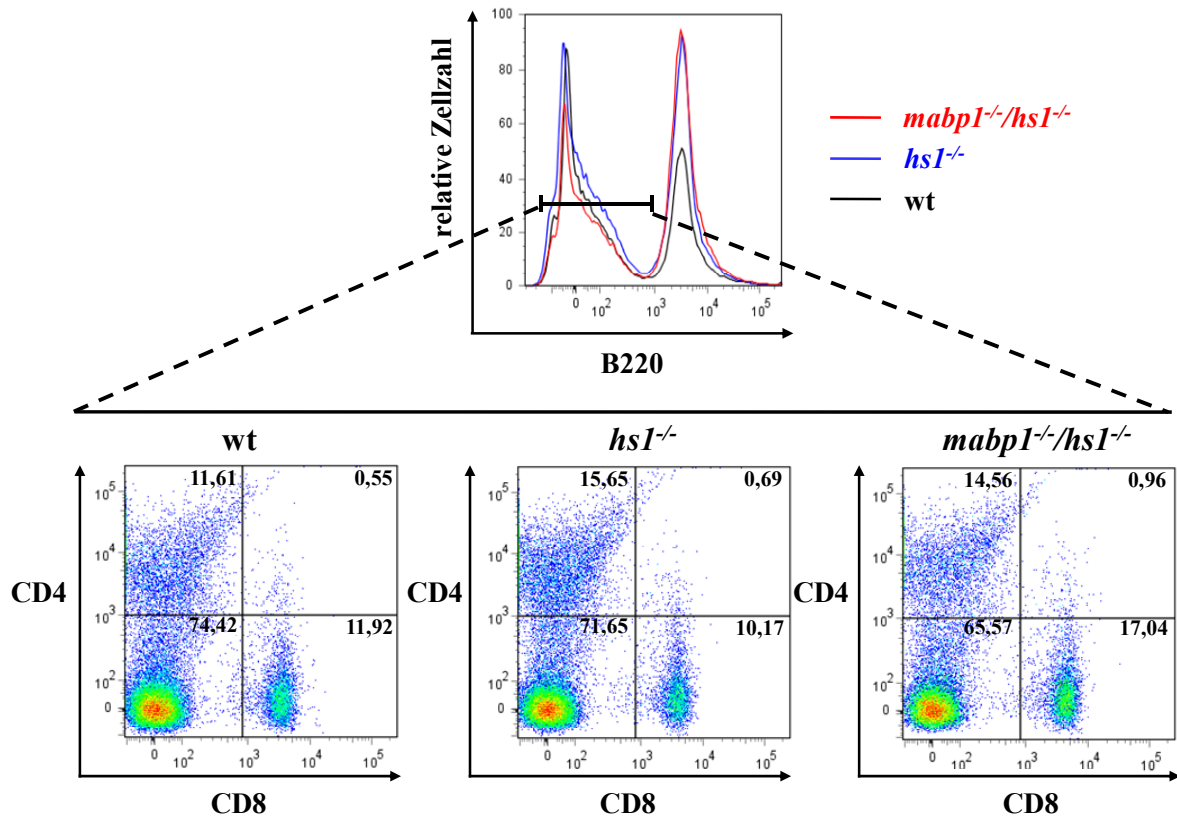


Abb. 5.4: Ähnliche Verteilung von CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen in wildtypischen, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten Milzen

Milzzellen von wildtypischen, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten Mäusen wurden isoliert und mit Fluorophor-markierten Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle B220, CD4 und CD8 inkubiert. Mittels durchflusszytometrischer Analysen wurden die Milzzellen in SSC/FSC aufgetrennt und in einem Histogramm nach B220-Oberflächenexpression unterschieden (oben). B220-negative Zellfraktionen wurden auf das Vorhandensein von CD4- oder CD8-positiven T-Zell-Populationen untersucht (unten). Die relativen prozentualen Verteilungen der Zellen sind für jeden Quadranten angegeben. Die Abbildung spiegelt das repräsentative Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen wider.

Bei der Expressionsanalyse HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienter Milzzellen konnten sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen detektiert werden. Es wurden keine Veränderungen in den relativen Verteilungen von CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu wildtypischen T-Zellen detektiert (Abb. 5.4, unten). So schwankten die prozentualen Verteilungen CD4-positiver T-Zellen zwischen 11 % bis 15 %, die der CD8⁺ T-Zellen zwischen 10 % und 17 %.

Aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse konnten in HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten Mäusen keine Auswirkungen der Defizienzen auf die Zusammensetzung des T-Zell-Kompartiments in der Milz nachgewiesen werden. Daher deuten die Analysen darauf hin, dass mAbp1 und HS1 keine redundante Funktionen in der T-Zell-Entwicklung übernehmen.

5.5 Protein-Tyrosin-Phosphorylierung in wildtypischen, mAbp1-, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten B-Lymphocyten aus der Maus

Die in ihrer Struktur und Funktion analogen Moleküle mAbp1 bzw. HS1 werden nach BCR-Stimulation von Protein-Tyrosin-Kinasen phosphoryliert (Baumann *et al.*, 1994; Hata *et al.*, 1994; Larbolette *et al.*, 1999; Yamanashi *et al.*, 1993). Um zu analysieren, ob eine mAbp1- bzw. HS1-Defizienz einen Einfluss auf die Protein-Tyrosin-Phosphorylierung in B-Zellen ausübt, wurden BCR-Stimulationsexperimente durchgeführt.

Dazu wurden in Zusammenarbeit mit Dr. K. Dittmann B-Lymphocyten aus wildtypischen, mAbp1-, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten Mäusen isoliert, über den BCR stimuliert und lysiert. Die Proben wurden einer SDS-PAGE unterzogen und Tyrosin-phosphorylierte Proteine im *Western Blot* mittels anti-phospho-Tyrosin-Antikörpern detektiert (Abb. 5.5, A, oben). Um die Protein-Tyrosin-Phosphorylierung für die angegebenen Zeitpunkte mit der Gesamt-Proteinmenge zu korrelieren, diente eine Aktin-Ladekontrolle als Standard (Abb. 5.5, A, unten).

Die gesamte Protein-Tyrosin-Phosphorylierung in mAbp1- (Abb. 5.5, A, Spuren 6 bis 10), HS1- (Abb. 5.5, A, Spuren 11 bis 15) bzw. mAbp1/HS1-defizienten B-Lymphocyten (Abb. 5.5, A, Spuren 15 bis 16) war zu den untersuchten Zeitpunkten stärker als in wildtypischen Zellen (Abb. 5.5, A, Spuren 1 bis 5). Diese Ergebnisse wurden anhand densitometrischer Auswertungen der relativen integrierten optischen Dichten (IOD) mit der Software *Gel-Pro Analyser* verifiziert. Die Tyrosin-Phosphorylierung aller Mutanten lag, ausgenommen bei $t=0$, zu allen anderen Zeitpunkt um das 1,6- bis 2,3-fache über der densitometrischen Verlaufskurve der wildtypischen Kontrolle (Abb. 5.5, B).

Zusammenfassend deuten diese Beobachtungen darauf hin, dass mAbp1 bzw. HS1 Negativ-Regulatoren bei der BCR-induzierten Signalweiterleitung darstellen.

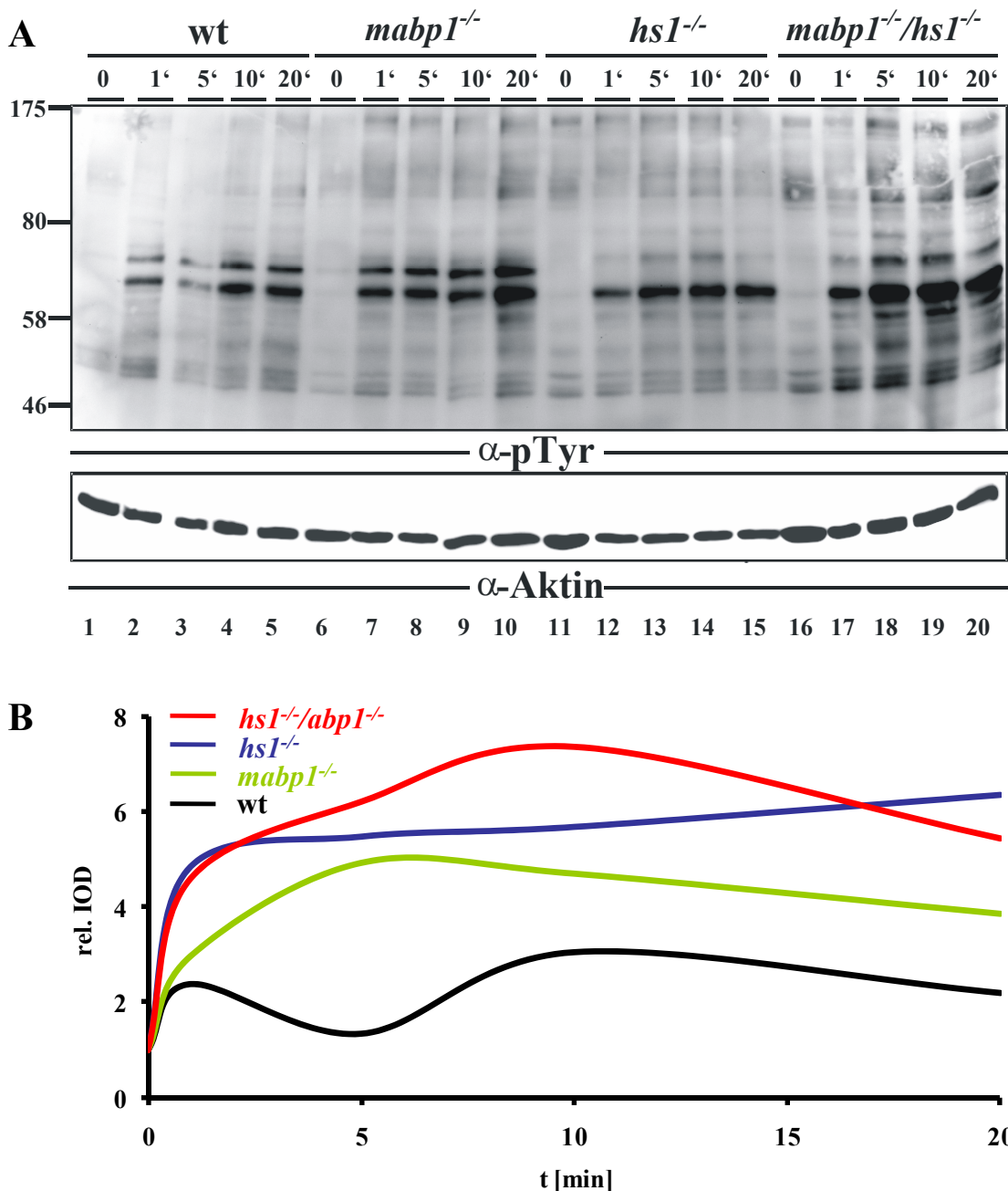


Abb. 5.5: Verstärkte Protein-Tyrosin-Phosphorylierung nach BCR-Stimulation in mAbp1-, HS1-, mAbp1/HS1-defizienten B-Zellen

(A) Je 2×10^6 Milz-B-Zellen aus einer wildtypischen (Spuren 1 bis 5), mAbp1- (Spuren 6 bis 10), HS1- (Spuren 11 bis 15) bzw. mAbp1/HS1-defizienten Maus (Spuren 16 bis 20) wurden isoliert und für 0 (Spuren 1, 6, 11 und 16), 1 (Spuren 2, 7, 12 und 17), 5 (Spuren 3, 8, 13 und 18), 10 (Spuren 4, 9, 14 und 18) und 20 Minuten (Spuren 5, 10, 15 und 20) mit $10 \mu\text{g/mL}$ F(ab')_2 α -IgM + IgG (H+L) stimuliert. Die Lysate wurden einer SDS-Page unterzogen und aufgetrennte Proteine im *Western Blot* mittels anti-phospho-Tyrosin-Antikörper detektiert (oben). Als Proteinladekontrolle diente Aktin (unten). Die relative molekulare Masse wurde in kDa an der linken Seite angegeben. Die Abbildung spiegelte das repräsentative Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen wider. (B) Die im Western Blot detektierte Protein-Tyrosin-Phosphorylierung wurde für wildtypische (schwarz), mAbp1- (grün), HS1- (blau) bzw. mAbp1/HS1-defiziente (rot) Maus-B-Zell-Lysate

densitometrisch analysiert. Mittels der Software *Gel-Pro Analyzer* wurden jeweils für die Spuren 1 bis 20 (siehe A) die gesamten IOD berechnet. Relative IOD wurden aus dem Verhältnis IOD Protein-Tyrosin-Phosphorylierung/IOD Aktin-Ladekontrolle hergeleitet. Die relativen IOD der Null-Werte (A, Spuren 1, 6, 11 und 16) wurden von den relativen IOD der Zeitpunkte 1 (A, Spuren 2, 7, 12 und 17), 5 (A, Spuren 3, 8, 13 und 18), 10 (A, Spuren 4, 9, 14 und 18) bzw. 20 Minuten (A, Spuren 5, 10, 15 und 20) subtrahiert und auf den Wert 1 determiniert.

5.6 Ca²⁺-Mobilisierung in B-Lymphocyten aus HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten Mäusen

Eine veränderte Protein-Tyrosin-Phosphorylierung nach BCR-Stimulation kann Auswirkungen auf die Ca²⁺-Mobilisierung haben (zur Übersicht: Engelke *et al.*, 2007). Da in mAbp1-, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten B-Lymphocyten insgesamt erhöhte Protein-Tyrosin-Phosphorylierungsmuster nach BCR-Stimulation nachgewiesen werden konnten (siehe Abschnitt 5.5), wurden in Zusammenarbeit mit Dr. K. Dittmann Ca²⁺-Mobilisierungsexperimente mit Milzzellen durchgeführt.

Die Ca²⁺-Mobilisierung wurde lokal differenziert betrachtet, indem zwischen intrazellulärer Ca²⁺-Mobilisierung aus dem ER bzw. extrazellulärem Ca²⁺-Einstrom über die Plasmamembran unterschieden wurde. Dazu wurden wildtypische, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defiziente Milzzellen für diese Analysen mit Indo-1-AM beladen sowie mit anti-B220-PE-Cy7 Antikörpern inkubiert. Die Zellen wurden in Abwesenheit von Ca²⁺ resuspendiert und BCR-stimuliert. Die intrazelluläre Ca²⁺-Mobilisierung aus dem ER wurde für 6 Minuten durchflusszytometrisch analysiert. Durch anschließende extrazelluläre Zugabe von Ca²⁺ wurde der Einstrom über die Plasmamembran für weitere 7 Minuten durchflusszytometrisch untersucht (Abb. 5.6).

In den ersten 6 Minuten der Analyse verlief die intrazelluläre Ca²⁺-Mobilisierung aus dem ER in wildtypischen B-Lymphocyten am stärksten. mAbp1/HS1-defiziente B-Zellen wiesen die geringste Ca²⁺-Mobilisierung auf, während HS1-defiziente B-Lymphocyten eine mittlere Ca²⁺-Mobilisierung zeigten. Die Verhältnisse kehrten sich bei der Untersuchung des Ca²⁺-Einstroms über die Plasmamembran um. mAbp1/HS1-defiziente Zellen wiesen den stärksten und wildtypische B-Lymphocyten den geringsten Ca²⁺-Einstrom über die Plasmamembran auf. HS1-defiziente B-Zellen zeigten eine im Vergleich zu wildtypischen bzw. mAbp1/HS1-defizienten B-Zellen intermediäre Ca²⁺-Mobilisierung (Abb. 5.6).

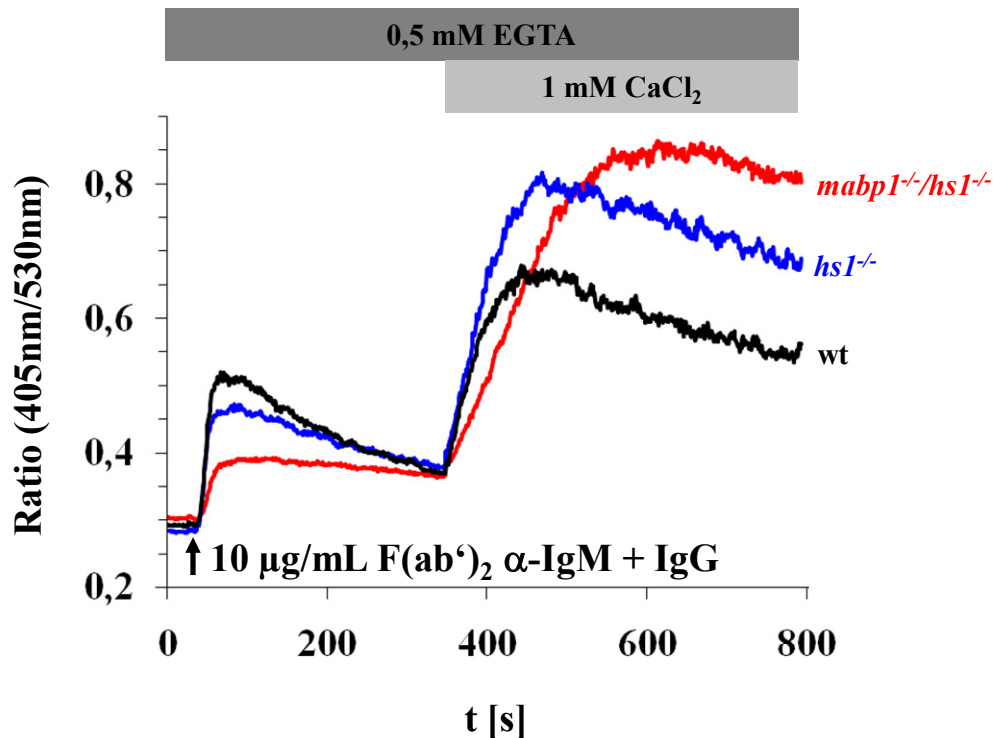


Abb. 5.6: Differentieller Verlauf der Ca²⁺-Mobilisierung aus dem ER und über die Plasmamembran in Abwesenheit von HS1 bzw. mAbp1/HS1

Aus einer wildtypischen (schwarz), HS1- (blau) bzw. mAbp1/HS1-defizienten Maus (rot) wurden je 5×10^6 Milzzellen isoliert und mit anti-B220-PE-Cy7 Antikörpern sowie Indo-1-AM markiert bzw. beladen. Die Ca²⁺-Mobilisierung B220-positiver Zellen nach BCR-Stimulation mit 10 µg/mL F(ab')₂ α-IgM + IgG (H+L) wurde durchflusszytometrisch analysiert. Die Abbildung spiegelt das repräsentative Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen wider.

Diese Daten zeigen, dass mAbp1 und HS1 in signalleitende Prozesse nach BCR-Stimulation involviert sind. Bei der Modulation der Ca²⁺-Antwort in mAbp1/HS1-defizienten B-Lymphocyten konnte eine Verstärkung des Effekts im Vergleich zu wildtypischen bzw. HS1-defizienten Zellen festgestellt werden, was auf eine redundante Funktion beider Proteine während der Ca²⁺-Mobilisierung hindeutet.

In Abb. 5.6 wurde die Ca²⁺-Mobilisierung aller B220-positiver B-Lymphocyten der Milz nach BCR-Stimulation dargestellt. Um zu überprüfen, ob dieses Ca²⁺-Signal durch gegenläufige oder kompensatorische Ca²⁺-Mobilisierungsprofile einzelner B-Zell-Subpopulationen hervorgerufen wurde, wurden B220-positive Milzzellen von wildtypischen, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten Mäusen anhand der entwicklungspezifischen Oberflächenproteine CD21, CD23 bzw. CD24 differenziert (siehe Abschnitt 5.3). Dadurch konnten nach einer FACS-Analyse T1, T2 bzw. reife B-Zellen unterschieden werden. Eine durchflusszytometrische Analyse der Ca²⁺-Mobilisierung der Zellen erfolgte nach BCR-Stimulation für 6 Minuten in Ca²⁺-freiem

Puffer. Nach Absinken der Ca^{2+} -Konzentrationen auf den Basalwert wurden die Zellsuspensionen mit einer CaCl_2 -Lösung versetzt, und der Ca^{2+} -Flux für weitere 7 Minuten analysiert (Abb. 5.7).

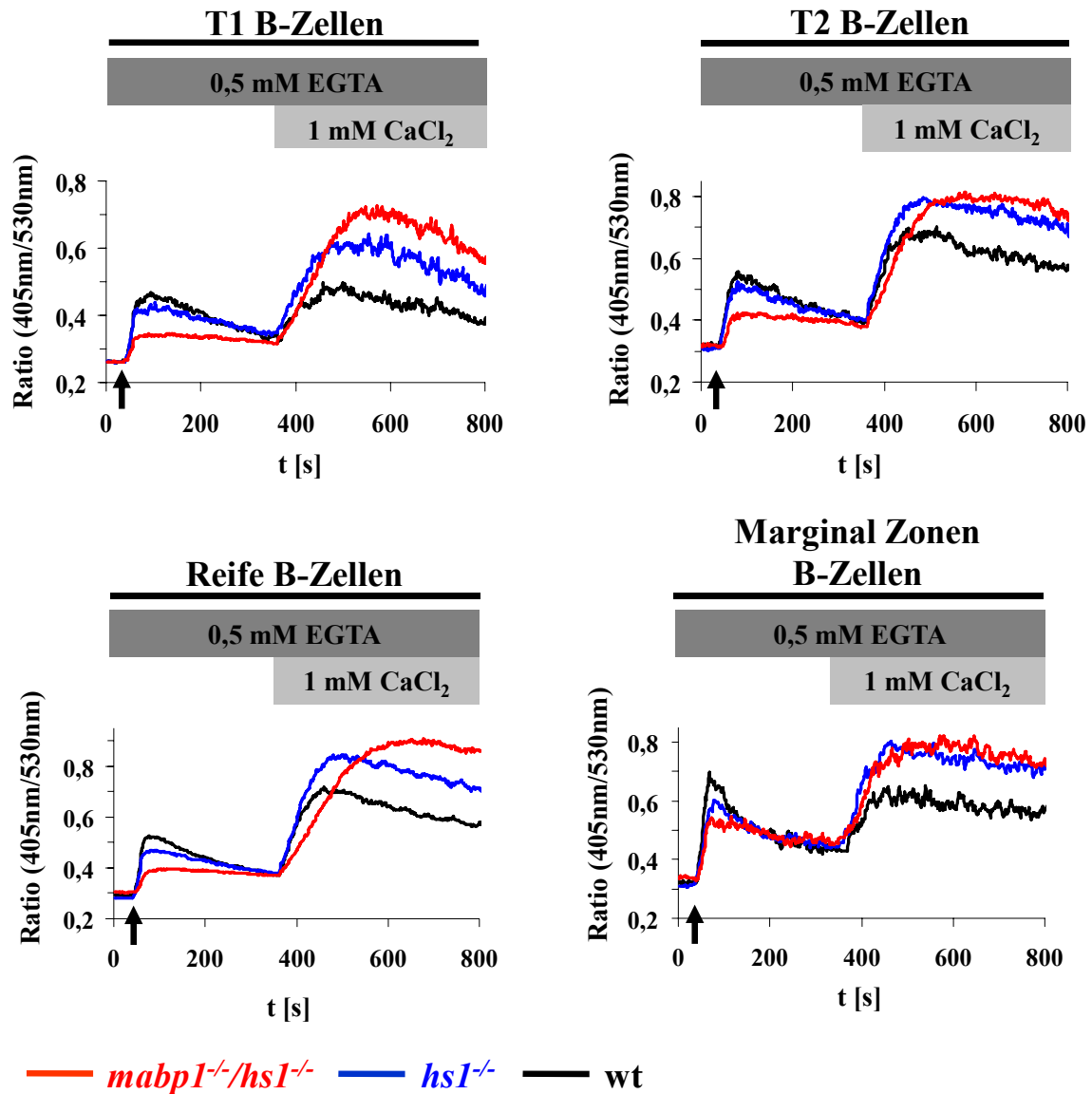


Abb. 5.7: Diametral verlaufendes Ca^{2+} -Signal in HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten B-Zell-Subpopulationen

Je 5×10^6 Milzzellen aus einer wildtypischen (schwarz), HS1- (blau) bzw. mAbp1/HS1-defizienten Maus (rot) wurden isoliert und mit anti-B220-PE-Cy7, anti-CD21-, anti-CD23- und anti-CD24-Antikörpern sowie Indo-1-AM markiert bzw. beladen. Die Ca^{2+} -Mobilisierung in Ab- (0,5 mM EGTA) bzw. Anwesenheit von 1mM Ca^{2+} von T1, T2, reifen und Marginal Zonen B-Zellen wurde nach BCR-Stimulation mit $10 \mu\text{g/mL}$ F(ab')_2 α -IgM + IgG (H+L) (Pfeil) durchflusszytometrisch analysiert.

Die Ca^{2+} -Mobilisierung in allen untersuchten B-Zell-Subpopulationen von wildtypischen, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten Mäusen ähnelte den in Abb. 5.6 dargestellten Ca^{2+} -Mobilisierungsprofilen aller B220-positiven Zellen. Tendenziell waren leichte

Unterschiede beim Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran in mAbp1/HS1-defizienten T2 und Marginal Zonen B-Zellen zu beobachten. Der Ca^{2+} -Einstrom war in diesen Subpopulationen auf dem Niveau von HS1-defizienten Zellen (Abb. 5.7). Da in allen Subpopulationen die Ca^{2+} -Mobilisierung vergleichbar mit den in Abb. 5.6 erhobenen Daten waren, kann davon ausgegangen werden, dass mAbp1 bzw. HS1 in allen untersuchten Entwicklungsstadien der B-Lymphocyten wichtige Funktionen der Ca^{2+} -Regulierung übernehmen.

Um zu verifizieren, dass die Ca^{2+} -Antworten in HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten Zellen durch Defekte in der Signaltransduktion nach BCR-Stimulation hervorgerufen wurden, habe ich Inhibitionsstudien durchgeführt. Zwei für die Aufrechterhaltung des Ca^{2+} -Gradienten in der B-Zelle verantwortliche Proteinfamilien sind die in der Plasmamembran verankerten Ca^{2+} -ATPasen (PMCA) sowie die im endo- bzw. sarcoplasmatischen Retikulum befindlichen Ca^{2+} -ATPasen (SERCA) (zur Übersicht: Strehler und Treiman, 2004; Floyd und Wray, 2007). Durch die Inhibition dieser Proteine sollte ausgeschlossen werden, dass mAbp1 bzw. HS1 seine Ca^{2+} -regulatorischen Effekte durch direkte Steuerung der Ca^{2+} -ATPasen oder indirekt durch die Reorganisation des Cytoskeletts bzw. durch Beeinflussung von Ca^{2+} -Kanälen ausübte.

Zur Überprüfung wurden Milzzellen von wildtypischen, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten Mäusen isoliert, mit Antikörpern gegen B220 markiert und mit Indo-1-AM beladen. Durch die Hemmung der PMCA mittels PMCA-Inhibitionsbuffer und anschließender BCR-Stimulation wurde deutlich, dass nach durchflusszytometrischer Analyse der Ca^{2+} -Mobilisierung weiterhin Unterschiede im cytosolischen Ca^{2+} -Flux detektierbar waren. mAbp1/HS1-defiziente B-Lymphocyten zeigten die stärkste Ca^{2+} -Mobilisierung im Vergleich zum wildtypischen Signal. Die Analyse des Ca^{2+} -Fluxes von HS1-defizienten B-Zellen wies im Vergleich einen mittleren Verlauf auf (Abb. 5.8).

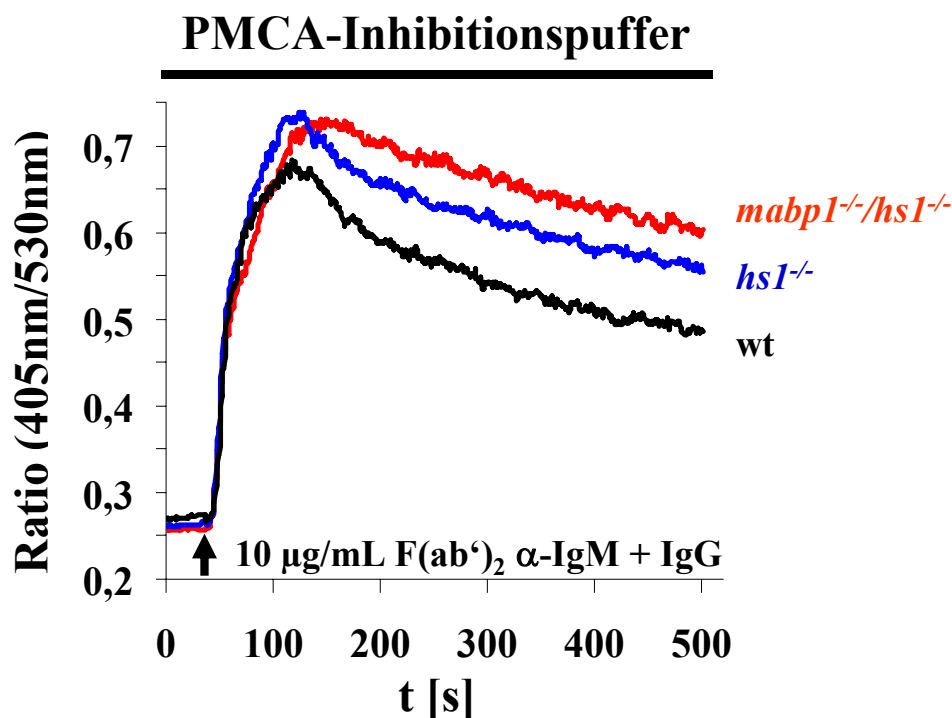


Abb. 5.8: Ca²⁺-Mobilisierung nach Hemmung von Ca²⁺-ATPasen in der Plasmamembran

Je 5×10^6 Milzzellen aus einer wildtypischen (schwarz), HS1- (blau) bzw. mAbp1/HS1-defizienten Maus (rot) wurden isoliert und mit anti-B220-PE-Cy7 Antikörpern sowie Indo-1-AM markiert bzw. beladen. Die Ca²⁺-Mobilisierung B220-positiver Zellen wurde nach BCR-Stimulation mit 10 µg/mL F(ab')₂ α-IgM + IgG (H+L), in einem Puffer, der selektiv Ca²⁺-ATPasen in der Plasmamembran (PMCA) inhibiert, durchflusszytometrisch analysiert.

Da durch die Inhibitionsstudien Unterschiede in der Ca²⁺-Mobilisierung nachgewiesen wurden, schieden mAbp1 bzw. HS1 als Regulatoren von PMCA aus. Wäre in wildtypischen, HS1- bzw. mAbp1/HS-defizienten B-Lymphocyten ein annähernd gleicher Ca²⁺-Flux beobachtet worden, hätten mAbp1 bzw. HS1 an der Steuerung der PMCA Anteil gehabt. Die Differenzen in der Ca²⁺-Mobilisierung mussten von anderen regulatorischen Mechanismen der intrazellulären Ca²⁺-Antwort nach BCR-Stimulation ausgelöst worden sein.

Ein weiterer selektiver Inhibitor von Ca²⁺-ATPasen stellt Thapsigargin dar. Thapsigargin ist ein Sesquiterpenlacton aus der Pflanze *Thapsia garganica*, das zur Hemmung von SERCA eingesetzt wird und zur passiven Ca²⁺-Depletion des ER einer Zelle führt. Für die Ca²⁺-Analyse wurden wildtypische, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defiziente Milzzellen mit Antikörpern gegen B220 inkubiert und mit Indo-1-AM beladen. Die Zellen wurden in Ca²⁺-freiem Puffer resuspendiert und mit Thapsigargin inkubiert. Die intrazelluläre Ca²⁺-

Depletion des ER wurde durchflusszytometrisch analysiert. Nach Entleerung des ER wurden die Zellsuspensionen mit Ca^{2+} versetzt und der Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembranen detektiert (Abb. 5.9).

Bei der spontanen Entleerung des ER in wildtypischen, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten B-Lymphocyten traten keine Unterschiede in der Ca^{2+} -Mobilisierung auf. Die in den Abb. 5.6 bzw. 5.7 gezeigten charakteristischen Ca^{2+} -Mobilisierungsprofile konnten in HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten B-Lymphocyten nach Zugabe von CaCl_2 -Lösung für die sekundären Ca^{2+} -Signale ebenfalls nicht beobachtet werden. Den stärksten Ca^{2+} -Influx bei dieser Analyse wiesen HS1-defiziente B-Zellen, gefolgt von wildtypischen Zellen bzw. mAbp1/HS1-defizienten B-Lymphocyten auf (Abb. 5.9).

Durch den Einsatz von Thapsigargin als SERCA-Inhibitor konnte gezeigt werden, dass nach ER-Depletion die typischen Unterschiede (vgl. Abb. 5.6 bzw. 5.7) in primären bzw. sekundären Ca^{2+} -Signalen nicht nachzuweisen waren. Durch diese Analyse wurde eine Beteiligung von mAbp1 bzw. HS1 an der passiven Entleerung des ER über Ca^{2+} -Kanäle bzw. an der direkten Regulation von SERCA widerlegt.

Insgesamt betrachtet wurde durch die Inhibitionsstudien gezeigt, dass die Unterschiede der intrazellulären und extrazellulären Ca^{2+} -Mobilisierung in wildtypischen, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten B-Lymphocyten auf Defekte in der Signalleitung nach BCR-Stimulation zurückzuführen waren.

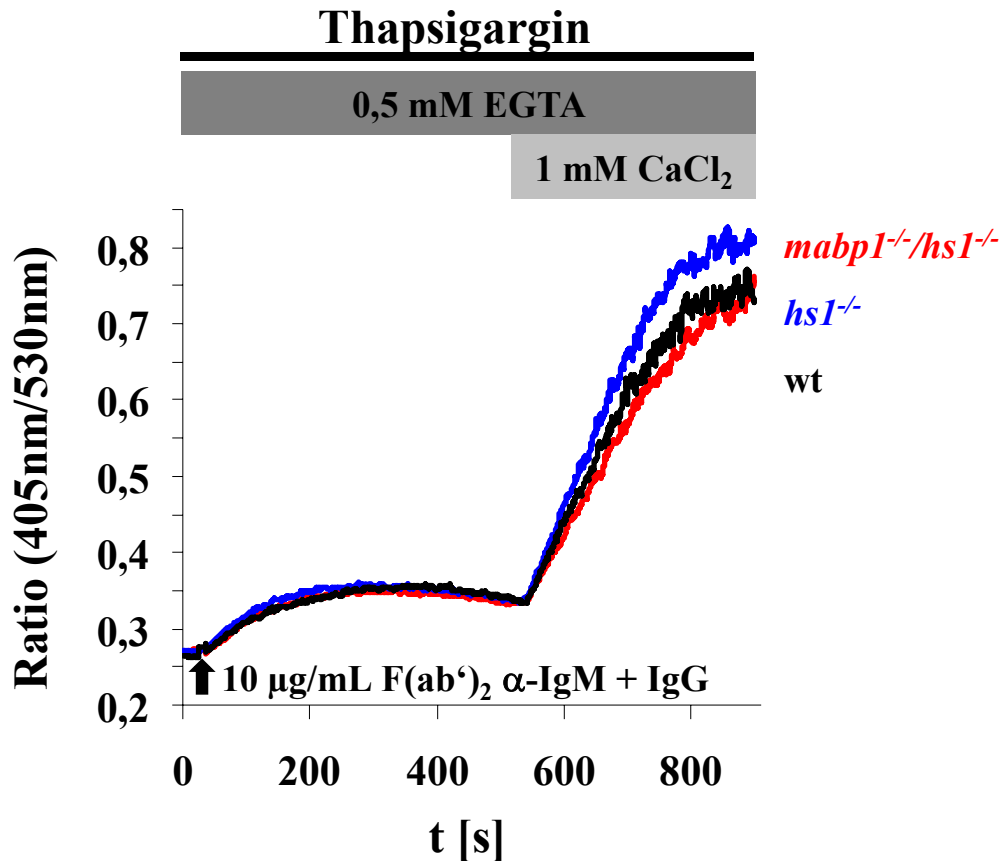


Abb. 5.9: Ca²⁺-Mobilisierung nach ER-Depletion durch Thapsigargin

Je 5×10^6 Milzzellen aus einer wildtypischen (schwarz), HS1- (blau) bzw. mAbp1/HS1-defizienten Maus (rot) wurden isoliert und mit anti-B220-PE-Cy7 Antikörpern sowie Indo-1-AM markiert bzw. beladen. Die Ca²⁺-Mobilisierung B220-positiver Zellen wurde nach Zugabe von 1,5 µM Thapsigargin durchflusszytometrisch in Ca²⁺-freiem Puffer (0,5mM EGTA) sowie in Anwesenheit von 1mM Ca²⁺ analysiert.

5.7 SHIP Tyrosin-Phosphorylierung in wildtypischen, mAbp1-, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten B-Lymphocyten aus der Maus

Um eine Erklärung für die im Vergleich diametral verlaufenden primären bzw. sekundären Ca²⁺-Signale zu erhalten, wurde die Protein-Tyrosin-Phosphorylierung eines wichtigen Negativ-Mediators der Ca²⁺-Mobilisierung genauer analysiert. Dieses negativregulatorische Element der Ca²⁺-Mobilisierung nach BCR-Stimulation stellt das Protein *SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase* (SHIP) dar (Okada *et al.*, 1998). Die Inositol-Phosphatase katalysiert die Konversion von Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) nach Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat (PIP₂) (Damen *et al.*, 1996). PIP₃ fungiert als Membrananker für Proteine, die am Ca²⁺-Initiationskomplex beteiligt sind. Folglich wird durch die Dephosphorylierung von PIP₃ durch SHIP die Bildung des für die Ca²⁺-Mobilisierung benötigten Proteinkomplexes inhibiert.

Zur Analyse der Tyrosin-Phosphorylierung von SHIP wurden wildtypische, mAbp1-, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defiziente B-Lymphocyten isoliert, für 0, 1, 5, 10 bzw. 20 Minuten BCR-stimuliert und lysiert. Die Proben wurden einer SDS-PAGE unterzogen und aufgetrennte Proteine im *Western Blot* mittels Antikörper gegen Protein-Tyrosin-phosphoryliertes SHIP (Tyr¹⁰²⁰), mAbp1, HS1 bzw. Aktin detektiert.

Die Tyrosin-Phosphorylierung von SHIP in mAbp1- (Abb. 5.10, A, Spuren 6 bis 10, oben), HS1- (Abb. 5.10, A, Spuren 11 bis 15, oben) bzw. mAbp1/HS1-defizienten (Abb. 5.10, A, Spuren 16 bis 20, oben) Maus-B-Lymphocyten war im Vergleich zu wildtypischen (Abb. 5.10, A, Spuren 1 bis 5, oben) Zellen 1 Minute nach BCR-Stimulation verstärkt. Für diesen Zeitpunkt wurde für die Protein-Tyrosin-Phosphorylierung in mAbp1-, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten B-Lymphocyten eine maximale relative IOD von 7,7; 3,6 bzw. 9,3 im Vergleich zu 2,50 in wildtypischen Zellen berechnet (Abb. 5.10, B). Die maximale relative IOD der Tyrosin-Phosphorylierung in wildtypischen Zellen von 5,9 wurde nach 5 Minuten BCR-Stimulation erreicht (Abb. 5.10, B). Ab diesem Zeitpunkt lagen die IOD der SHIP Tyrosin-Phosphorylierungen mAbp1- bzw. HS1-defizienter B-Zellen unter der errechneten wildtypischen IOD. Die IOD der SHIP Tyrosin-Phosphorylierung in mAbp1/HS1-defizienten B-Lymphocyten nach 5 min wurde mit 3,9 berechnet. Der Wert lag unter der errechneten IOD von 6,1 nach 10 min (Abb. 5.10, B, rot). Dieser Unterschied wurde möglicherweise durch unvollständiges *Western Blotting* der einzelnen Proteinbande für den zu bestimmenden Wert nach 5 min hervorgerufen (Abb. A, Spur 18, oben). Die IOD nach 10 und 20 min lagen über den errechneten Werten für die SHIP Tyrosin-Phosphorylierung in wildtypischen Zellen.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die anfängliche SHIP Tyrosin-Phosphorylierung nach 1 min BCR-Stimulation in mAbp1-, HS1 bzw. mAbp1/HS1-defizienten B-Lymphocyten stärker als in wildtypischen Zellen war.

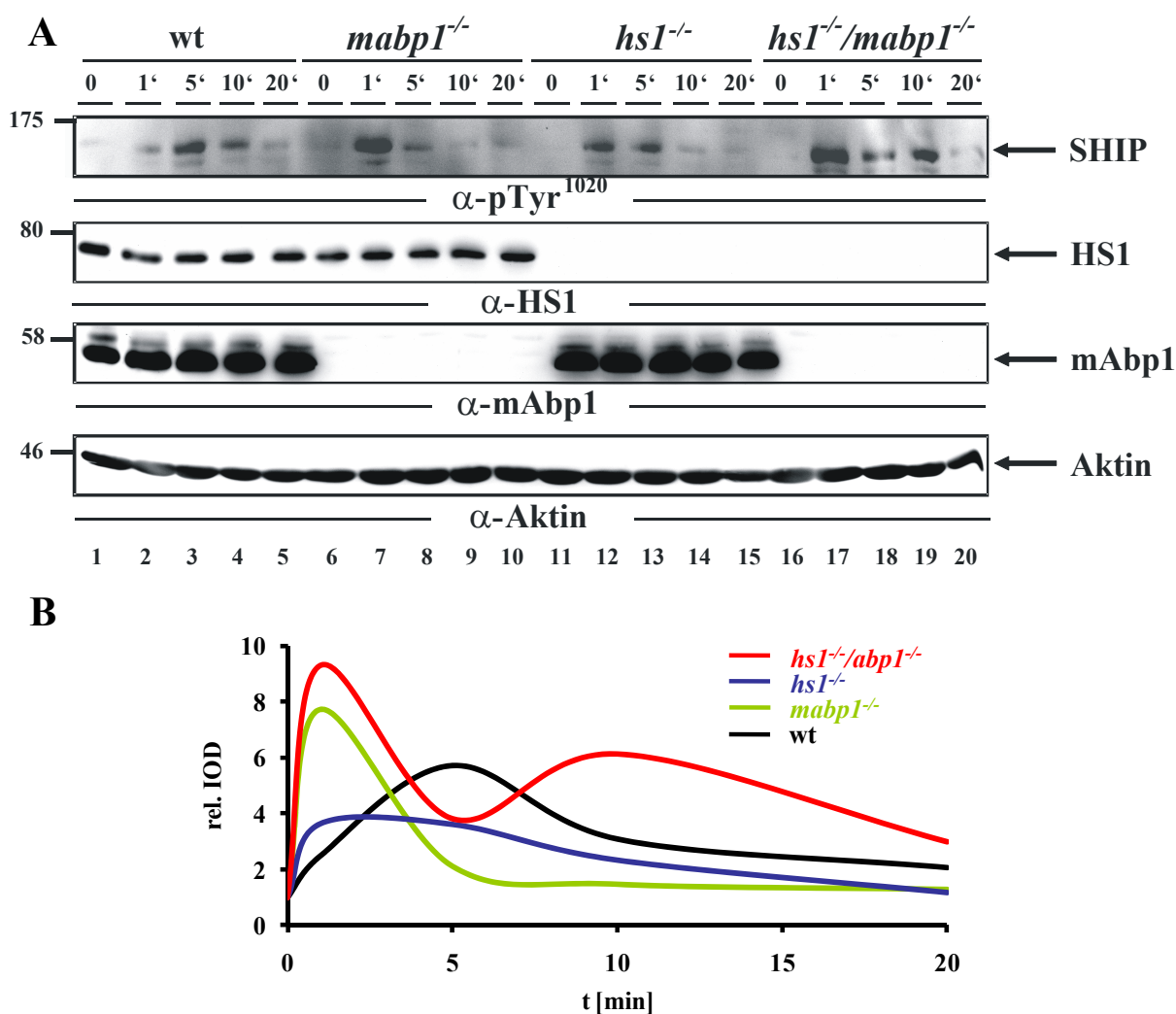


Abb. 5.10: Verstärkte anfängliche SHIP Tyrosin-Phosphorylierung in mAbp1-, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten B-Zellen

(A) Aus Milzen wildtypischer (Spuren 1 bis 5), mAbp1- (Spuren 6 bis 10), HS1- (Spuren 11 bis 15) bzw. mAbp1/HS1-defizienter Mäuse (Spuren 16-20) wurden B-Zellen isoliert. Je 5×10^6 Zellen wurden für 0 (Spuren 1, 6, 11 und 16), 1 (Spuren 2, 7, 12 und 17), 5 (Spuren 3, 8, 13 und 18), 10 (Spuren 4, 9, 14 und 19) bzw. 20 Minuten (Spuren 5, 10, 15 und 20) mit $10 \mu\text{g/mL}$ $\text{F(ab}')_2$ α -IgM + IgG (H+L) inkubiert und anschließend lysiert. Die Lysate wurden einer SDS-Page unterzogen und aufgetrennte Proteine im *Western Blot* mit Antikörpern gegen Tyrosin-phosphoryliertes (Tyr^{1020}) SHIP detektiert (oben). Die Expression von HS1 und mAbp1 wurde mittels anti-HS1- und anti-mAbp1-Antikörpern nachgewiesen (2. bzw. 3. Reihe von oben). Als Proteinladekontrolle diente Aktin (unten). Die relativen molekularen Massen sind in kDa an der linken Seite angegeben. Die Abbildung spiegelt das repräsentative Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen wider.

(B) Die im *Western Blot* detektierte Protein-Tyrosin-Phosphorylierung wurde für wildtypische (schwarz), mAbp1- (grün), HS1- (blau) bzw. mAbp1/HS1-defiziente (rot) Maus-B-Zell-Lysate densitometrisch analysiert. Mittels der Software *Gel-Pro Analyzer* wurden jeweils für die Spuren 1 bis 20 (siehe A) die gesamten IOD berechnet. Relative IOD wurden aus dem Verhältnis IOD Protein-Tyrosin-Phosphorylierung/IOD Aktin-Ladekontrolle hergeleitet. Die relativen IOD der Null-Werte (A, Spuren 1, 6, 11 und 16)

wurden von den relativen IOD der Zeitpunkte 1 (A, Spuren 2, 7, 12 und 17), 5 (A, Spuren 3, 8, 13 und 18), 10 (A, Spuren 4, 9, 14 und 18) bzw. 20 Minuten (A, Spuren 5, 10, 15 und 20) subtrahiert und auf den Wert 1 determiniert.

5.8 SLP-65 Tyrosin-Phosphorylierung in wildtypischen, mAbp1-, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten B-Lymphocyten aus der Maus

Ein nach BCR-Stimulation Tyrosin-phosphoryliertes Protein und für den Ca^{2+} -Initiationskomplex essentieller Adapter stellt das 1998 charakterisierte SLP-65, auch als BLNK oder BASH bekannt, dar (Fu *et al.*, 1998; Goitsuka *et al.*, 1998; Wienands *et al.*, 1998). Da in wildtypischen, mAbp1-, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten B-Lymphocyten Unterschiede während der unter Abschnitt 5.5 gezeigten gesamten Protein-Tyrosin-Phosphorylierung nach BCR-Stimulation auftraten, die besonders an einer prominenten Proteinbande um 65 kDa erkennbar waren (Abb. 5.5, A), erfolgte die Analyse der SLP-65 Tyrosin-Phosphorylierung (Tyr¹⁷⁸). Dazu wurden wildtypische, mAbp1-, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defiziente B-Lymphocyten für 0, 1, 5, 10 bzw. 20 min BCR-stimuliert und lysiert. Die Proben wurden einer SDS-PAGE unterzogen und aufgetrennte Proteine im *Western Blot* mittels Antikörper gegen Tyrosin-phosphoryliertes SLP-65 (Tyr¹⁷⁸) bzw. Aktin detektiert (Abb. 5.11, A).

Durch die densitometrische Auswertung der Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65 in mAbp1-, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten Maus-B-Lymphocyten im Vergleich zu wildtypischen Zellen wurde deutlich, dass nach 5 min BCR-Stimulation die Tyrosin-Phosphorylierung erniedrigt war (Abb. 5.11, B, grüne, rote bzw. blaue Linie). Die maximale relative IOD der Tyrosin-Phosphorylierung in wildtypischen Zellen wurde nach 5 Minuten BCR-Stimulation mit 3,1 berechnet. Die weitere densitometrische Auswertung des *Western Blots* zeigte eine erhöhte Tyrosin-Phosphorylierung 10 bzw. 20 Minuten nach BCR-Stimulation in mAbp1-, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten Maus-B-Lymphocyten im Vergleich zur Kontrolle. Nach 10 Minuten wurde für die SLP-65 Tyrosin-Phosphorylierung in mAbp1-, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten B-Lymphocyten eine maximale relative IOD von 2,1; 2,9 bzw. 2,8 im Vergleich zu 1,0 in wildtypischen Zellen berechnet (Abb. 5.11, B). Auch nach 20 min BCR-Stimulation hielt der Zustand einer erhöhten Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65 in den mutierten B-Lymphocyten im Vergleich zur wildtypischen Kontrolle an (Abb. 5.11, B).

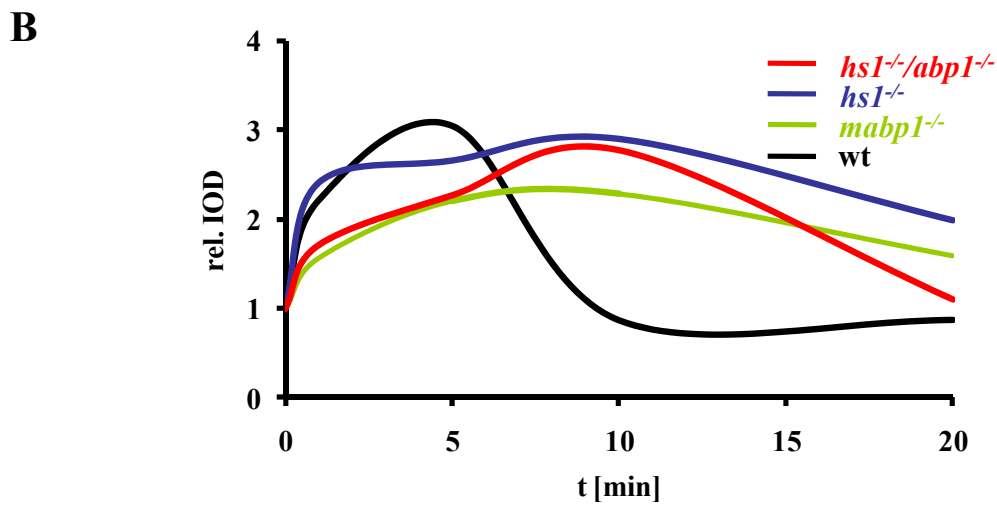
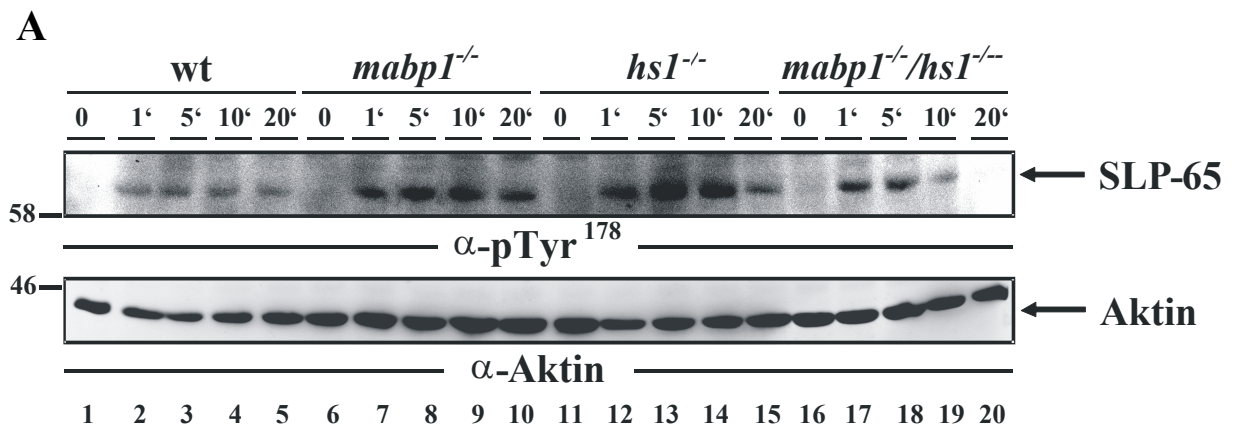


Abb. 5.11: Verstärkte späte SLP-65 Tyrosin-Phosphorylierung in mAbp1-, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten B-Lymphocyten

(A) Je 5×10^6 Milz-B-Zellen wildtypischer (Spuren 1 bis 5), mAbp1- (Spuren 6 bis 10), HS1- (Spuren 11 bis 15) bzw. mAbp1/HS1-defizienter Mäuse (Spuren 16 bis 20) wurden isoliert und für 0 (Spuren 1, 6, 11 und 16) 1 (Spuren 2, 7, 12 und 17), 5 (Spuren 3, 8, 13 und 18), 10 (Spuren 4, 9, 14 und 19) und 20 Minuten (Spuren 5, 10, 15 und 20) mit $10 \mu\text{g/mL}$ $\text{F(ab}')_2$ α -IgM + IgG (H+L) stimuliert. Die Lysate wurden einer SDS-Page unterzogen und aufgetrennte Proteine im *Western Blot* mittels Antikörper gegen Tyrosin-phosphoryliertes (Tyr¹⁷⁸) SLP-65 detektiert (oben). Als Proteinladekontrolle diente Aktin (unten). Die relative molekulare Masse wurde in kDa an der linken Seite angegeben. Die Abbildung spiegelte das repräsentative Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen wider.

(B) Die im *Western Blot* detektierte Protein-Tyrosin-Phosphorylierung wurde für wildtypische (schwarz), mAbp1- (grün), HS1- (blau) bzw. mAbp1/HS1-defiziente (rot) Maus-B-Zell-Lysate densitometrisch analysiert. Mittels der Software *Gel-Pro Analyzer* wurden jeweils für die Spuren 1 bis 20 (siehe A) die gesamten IOD berechnet. Relative IOD wurden aus dem Verhältnis IOD Protein-Tyrosin-Phosphorylierung/IOD Aktin-Ladekontrolle hergeleitet. Die relativen IOD der Null-Werte (A, Spuren 1, 6, 11 und 16) wurden von den relativen IOD der Zeitpunkte 1 (A, Spuren 2, 7, 12 und 17), 5 (A, Spuren 3, 8, 13 und 18), 10 (A, Spuren 4, 9, 14 und 18) bzw. 20 Minuten (A, Spuren 5, 10, 15 und 20) subtrahiert und auf den Wert 1 determiniert.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass in mAbp1-, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten B-Zellen die Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65 zu einem späteren Zeitpunkt als in wildtypischen Zellen ein Maximum erreicht. Offenbar scheinen mAbp1 bzw. HS1 an der Kinetik der Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65 beteiligt zu sein.

5.9 Interaktion von HS1 mit regulatorischen Elementen der BCR-Signaltransduktion

Da HS1- bzw. mAbp1/HS1-Defizienzen in BCR-stimulierten B-Lymphocyten eine verstärkte Protein-Tyrosin-Phosphorylierung und veränderte Ca^{2+} -Mobilisierung induzierten, wurde die stimulationsabhängige Interaktion von HS1 mit SHIP bzw. SLP-65 analysiert. Bereits durch Dr. O. Larbolette wurde über Immunpräzipitationen mit endogenem mAbp1 SHIP als Interaktionspartner nachgewiesen (Larbolette, 2000). Die Interaktion wurde über die SH3-Domäne von mAbp1 vermittelt. Da HS1 ebenfalls eine SH3-Domäne mit hoher Sequenzhomologie zur SH3-Domäne von mAbp1 aufweist (Feng *et al.*, 1995; zur Übersicht: Daly, 2004; Mayer und Eck, 1995), wurden Koimmunpräzipitationen mit SHIP durchgeführt, um eine Interaktion mit HS1 zu verifizieren.

Für die Analysen wurden Ramos B-Zellen für 0 bzw. 3 Minuten über die BCR stimuliert und lysiert. Die Lysate wurden mit Antikörpern gegen SHIP inkubiert. Als Negativkontrollen dienten Lysate mit Antikörpern des gleichen Isotyps. Die aufgereinigten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Antikörpern gegen HS1 bzw. SHIP im *Western Blot* nachgewiesen. Die Daten zeigen, dass HS1 ausschließlich nach BCR-Stimulation mit Antikörpern gegen SHIP koimmunpräzipitiert werden konnte (Abb. 5.12, A, Spur 4, oben). Gleiche Proteinmengen von immunpräzipitiertem SHIP wurden für die Zeitpunkte 0 bzw. 3 Minuten nach BCR-Stimulation mit Antikörpern gegen SHIP nachgewiesen (Abb. 5.12, A, Spuren 3 und 4, unten). Immunaufreinigungen mit Isotyp-Antikörpern als Kontrolle lieferten keine Signale für SHIP bzw. HS1 nach *Western Blot*-Analyse mit anti-SHIP- bzw. anti-HS1-Antikörpern. (Abb. 5.12, A, Spuren 1 und 2). Die Totallysate vor Immunpräzipitation wiesen zum Zeitpunkt 0 bzw. 3 Minuten nach BCR-Stimulation gleiche Proteinmengen von SHIP bzw. HS1 auf (Daten nicht gezeigt).

Um die in Abbildung 5.12 A gezeigten Ergebnisse zu verifizieren, wurden Immunpräzipitationen mit HS1 durchgeführt, um SHIP als Koimmunopräzipitat nachzuweisen. Für die Analysen wurden, wie oben angegeben, Ramos B-Zellen für 0 bzw. 5 Minuten BCR-stimuliert und lysiert. Die Lysate wurden mit Antikörpern gegen SHIP inkubiert. Als Negativkontrollen dienten Lysate, die mit Isotyp-Antikörpern behandelt wurden. Die aufgereinigten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im

Western Blot mit Antikörper gegen HS1 bzw. SHIP nachgewiesen. Wie bereits für die in Abb. 5.12 A gezeigte Interaktion von HS1 und SHIP, konnte SHIP durch den Einsatz von anti-HS1-Antikörpern in Ramos B-Zellen nach BCR-Stimulation koimmunpräzipitiert (Abb. 5.12, B, Spur 6) werden. Nach Immunaufreinigungen mit Isotyp-Antikörpern als Kontrollen wurden bei der *Western Blot*-Analyse mit anti-SHIP-Antikörpern schwache SHIP-Signale detektiert (Abb. 5.12, B, Spur 4). Allerdings war die Bandenintensität im Vergleich zur Immunpräzipitation mit anti-HS1-Antikörpern (Abb. 5.12, B, Spur 6) sehr gering.

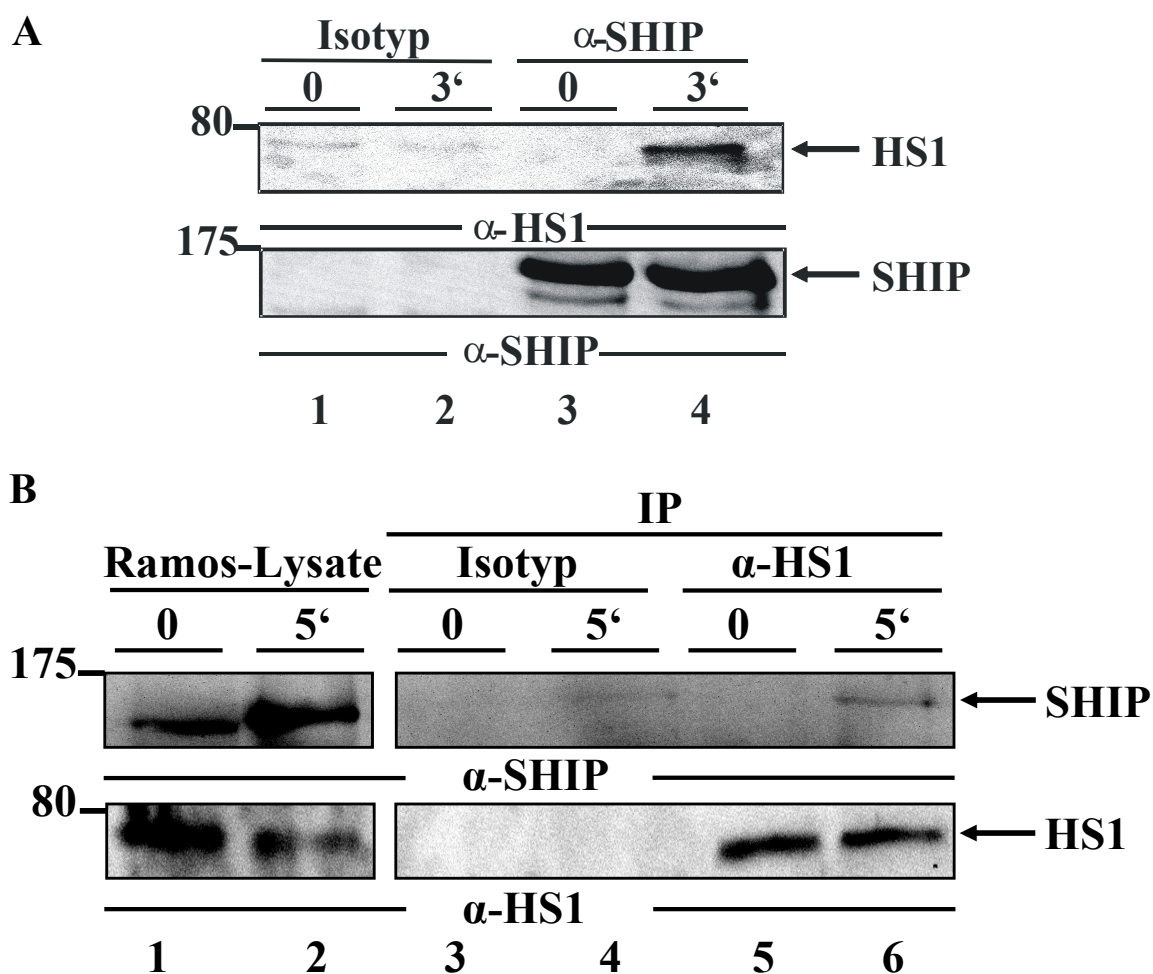


Abb. 5.12: Stimulationsabhängige Interaktion von HS1 mit SHIP in Ramos B-Zellen
(A) Je 5×10^7 Ramos B-Zellen (Spuren 1 bis 4) wurden für 0 (Spuren 1 und 3) bzw. 3 Minuten (Spuren 2 und 4) mit $20 \mu\text{g/mL}$ $\text{F(ab}')_2$ α -IgM stimuliert und lysiert. Lysate wurden für IP mit irrelevanten IgG (Spuren 1 und 2) oder Antikörpern gegen SHIP inkubiert. Aufgereinigte Proteine wurden einer SDS-PAGE unterzogen. Die aufgetrennten Proteine wurden für eine *Western Blot*-Analyse mit Antikörpern gegen HS1 (oben) oder SHIP (unten) eingesetzt. **(B)** Ramos B-Zellen wurden für 0 (Spuren 1, 3 und 5) bzw. 5 Minuten (Spuren 2, 4 und 6) mit $20 \mu\text{g/mL}$ $\text{F(ab}')_2$ α -IgM stimuliert und lysiert. Lysate aus je 1×10^6 Zellen wurden als Proteinladekontrolle (Spuren 1 und 2) eingesetzt. Für die IP

wurden Lysate aus je 3×10^7 Zellen (Spuren 3 bis 6) verwendet und mit Antikörpern gegen HS1 (Spuren 5 und 6) bzw. Isotyp-Antikörpern (Spuren 3 und 4) inkubiert. Aufgereinigte Proteine wurden einer SDS-PAGE unterzogen, und aufgetrennte Proteine im *Western Blot* mittels Antikörper gegen SHIP (oben) bzw. HS1 (unten) inkubiert. Die relativen molekularen Massen sind in kDa linksseitig angegeben.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse erstmals eine Assoziation von HS1 mit SHIP in humanen B-Zellen nach Antigenrezeptorstimulation. Zur weiteren Bestätigung sollten Immunpräzipitationsexperimente mit SHIP-defizienten B-Zellen als Kontrolle durchgeführt werden, um unspezifische Interaktionen beider Proteine vollständig ausschließen zu können.

Um zu zeigen, dass die Interaktion von HS1 und SHIP über die SH3-Domäne von HS1 ermöglicht wird, wurden in Zusammenarbeit mit M. Lösing Affinitätsaufreinigungen mit Fusionsproteinen aus GST und der SH3-Domäne von HS1 (GST-HS1[SH3]) durchgeführt. Für die Analysen wurden *ship*^{-/-} DT40-Zellen mit cDNA kodierend für SHIP bzw. einer Leervektorkontrolle rekonstituiert. Die Zellen wurden für 0 bzw. 3 Minuten mit α -IgM stimuliert. Die anschließend hergestellten Lysate wurden mit GST-HS1[SH3] bzw. GST inkubiert. Gleiche Proteinmengen wurden zuvor anhand eines *Coomassie*-Gels bestimmt (Daten nicht gezeigt). Die mit Glutathion-Sepharose aufgereinigten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach *Western Blotting* mit Antikörpern gegen SHIP detektiert.

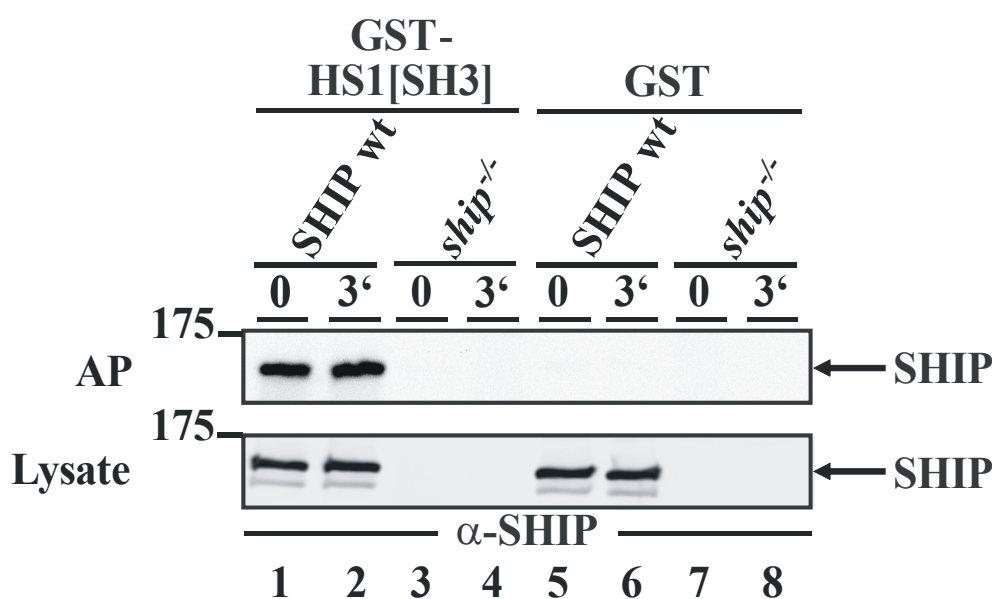


Abb. 5.13: Die SH3-Domäne von HS1 interagiert mit SHIP

Je 3×10^7 DT40 *ship*^{-/-} Zellen wurden mit cDNA kodierend für pMSCVpuro (Spuren 3, 4, 7 und 8) oder für SHIP wt (Spuren 1, 2, 5 und 6) rekonstituiert und für 0 (Spuren 1, 3, 5 und 7) bzw. 3 Minuten (Spuren 2, 4, 6 und 8) mit $2\mu\text{g/mL}$ α -IgM stimuliert und lysiert.

Für Affinitätsaufreinigungen (oben) wurden Lysate mit GST-HS1[SH3]-Fusionsproteinen (Spuren 1 bis 4) oder GST inkubiert (Spuren 5 bis 8). Aufgereinigte Proteine wurden einer SDS-PAGE unterzogen und im *Western Blot* mittels Antikörper gegen SHIP detektiert. Als SHIP-Ladekontrolle dienten Lysate aus 1×10^6 Zellen (unten). Die relative molekulare Masse wurde in kDa an der linken Seite angegeben.

Die Analysen zeigen, dass eine Assoziation von SHIP und der SH3-Domäne von HS1 unabhängig von einer BCR-Stimulation bestand (Abb. 5.13, Spuren 1 und 2). Kontrollaufreinigungen aus Lysaten von *ship*^{-/-} DT40 Zellen zeigten sowohl mit GST-HS1[SH3] als auch mit GST keine Signale nach *Western-Blot*-Analyse (Abb. 5.13, Spuren 3, 4, 7, bzw. 8). Eine Affinitätsaufreinigung von SHIP mit GST aus Lysaten von *ship*^{-/-} DT40 Zellen rekonstituiert mit cDNA kodierend für SHIP verlief ebenfalls negativ (Abb. 5.13, Spuren 5 und 6). Zum Abschätzen der eingesetzten SHIP-Proteinmenge dienten Lysate vor Affinitätsaufreinigung (Abb. 5.13, unten).

Zusammenfassend konnte eine Interaktion zwischen der SH3-Domäne von HS1 und SHIP durch die Affinitätsaufreinigungen erstmalig nachgewiesen werden.

In Abschnitt 5.8 wurde eine erhöhte BCR-induzierte SLP-65 Tyrosin-Phosphorylierung in HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten B-Lymphocyten beschrieben. Um eine mögliche Assoziation von HS1 mit Proteinen des Ca²⁺-Initiationskomplexes zu analysieren, wurden *in vivo* Immunaufreinigungen mit Ramos B-Zellen durchgeführt.

Für die Analysen wurden die Zellen für 0 bzw. 5 Minuten BCR-stimuliert und lysiert. Die Lysate wurden mit Antikörpern gegen HS1 (Abb. 5.14, Spuren 5 und 6) bzw. äquivalenten Mengen von Isotyp-Antikörpern (Abb. 5.14, Spuren 3 und 4) inkubiert. Die aufgereinigten Proteine wurden mittels SDS-Page aufgetrennt und im *Western Blot* durch anti-HS1-, anti-pTyr¹⁷⁸- bzw. anti-GFP-Antikörpern nachgewiesen.

Durch die Interaktionsstudien konnte ich zeigen, dass Cit-SLP-65 in BCR-stimulierten B-Lymphocyten mit HS1 koimmunpräzipitiert werden konnte. Der Nachweis von SLP-65 gelang sowohl mittels anti-pTyr¹⁷⁸- (Abb. 5.14, Spur 6, oben) als auch mit anti-GFP-Antikörpern (Abb. 5.14, Spur 6, Mitte). HS1 wurde zu gleichen Mengen aus unbehandelten als auch aus stimulierten Zelllysaten aufgereinigt (Abb. 5.14, Spuren 5 und 6, unten). Ein Nachweis der Proteine mittels Isotyp-Antikörpern war zu keinem Stimulationszeitpunkt möglich (Abb. 5.14, Spuren 3 und 4, oben, Mitte bzw. unten). In Kontrollexperimenten wurden SLP-65 bzw. HS1 aus Lysaten im *Western Blot* mit den entsprechenden Antikörpern zu gleichen Mengen nachgewiesen (Abb. 5.14, Spuren 1 und 2, Mitte bzw. unten).

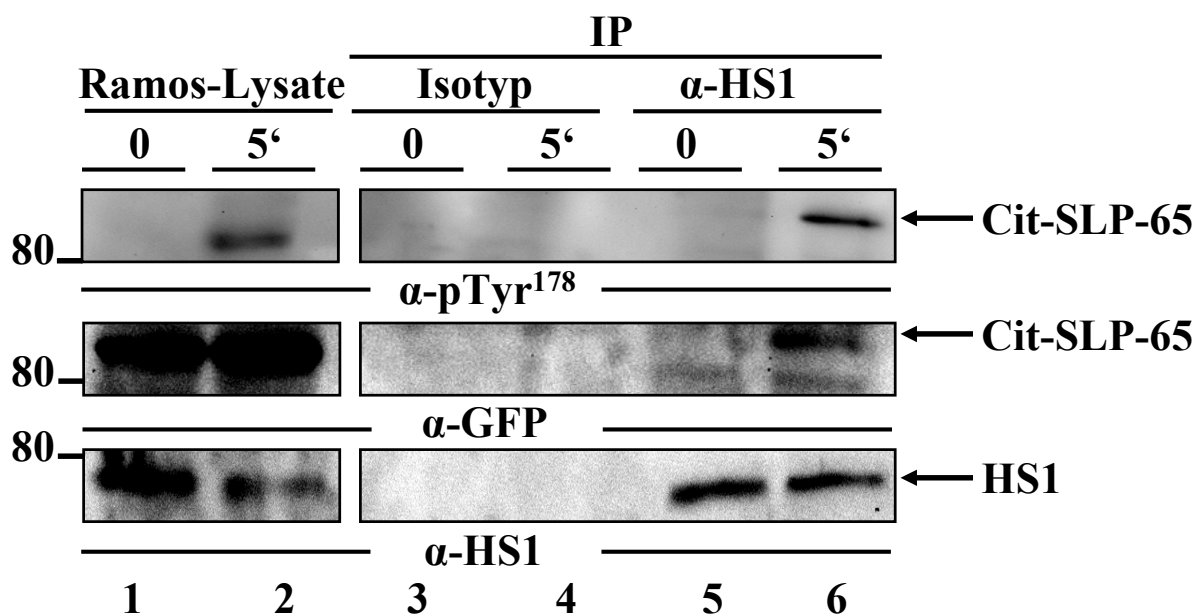


Abb. 5.14: Stimulationsabhängige Interaktion von HS1 mit Cit-SLP-65 in Ramos B-Zellen

Cit-SLP-65 exprimierende Ramos B-Zellen wurden für 0 (Spuren 1, 3 und 5) bzw. 5 Minuten (Spuren 2, 4 und 6) mit $10 \mu\text{g/mL}$ $\text{F(ab}')_2$ α -IgM stimuliert und lysiert. Lysate aus je 1×10^6 Zellen wurden als Proteinladekontrolle (Spuren 1 und 2) eingesetzt. Für die IP wurden Lysate aus je 3×10^7 Zellen (Spuren 3 bis 6) eingesetzt und mit irrelevanten IgG (Spuren 3 und 4) oder Antikörpern gegen HS1 (Spuren 5 und 6) inkubiert. Aufgereinigte Proteine wurden einer SDS-PAGE unterzogen, und aufgetrennte Proteine im *Western Blot* mittels Antikörpern gegen Tyrosin-phosphoryliertes (Tyr^{178}) SLP-65 (oben), GFP (Mitte) und HS1 (unten) inkubiert. Die relativen molekularen Massen wurden in kDa an der linken Seite angegeben.

Um die anhand von Immunpräzipitationen nachgewiesene Interaktion von HS1 und SLP-65 genauer zu untersuchen, wurden Affinitätsaufreinigungen mit Fusionsproteinen bestehend aus GST und der SH2-Domäne von SLP-65 in Ramos B-Lymphocyten in Zusammenarbeit mit N. Herrmann durchgeführt.

Für die Analysen wurden Ramos B-Zellen für 0 (Abb. 5.15, Spuren 1 und 3) bzw. 5 Minuten (Abb. 5.15, Spuren 2 und 3) mit anti-IgM-Antikörpern stimuliert und lysiert. Die Lysate wurden einer SDS-PAGE unterzogen und aufgetrennten Proteine im *Western Blot* mittels Antikörper gegen HS1 (Abb. 5.15, oben) bzw. GST (Abb. 5.15, unten) nachgewiesen.

Mit Hilfe der Analysen konnte ich eine Interaktion von HS1 mit der SH2-Domäne von SLP-65 detektieren. Die Assoziation von HS1 und der SH2-Domäne war ausschließlich BCR-induziert (Abb. 5.15, Spur 4, oben). Eine Aufreinigung von HS1 aus nicht aktivierten B-Zellen gelang nicht (Abb. 5.15, Spur 3, oben). Eine Kontrollaufreinigung mit GST

zeigte nach *Western Blot*-Analyse keine HS1-spezifischen Signale (Abb. 5.15, Spuren 1 und 2, oben). Die Proteinmengen an eingesetztem GST (Abb. 5.15, Spuren 1 und 2, unten) bzw. GST-SH2 (Abb. 5.15, Spuren 3 und 4, unten) waren annähernd gleich. Die für die Affinitätsaufreinigung verwendete Menge an HS1 wurde über *Western Blotting* bestimmt und war zu jedem Zeitpunkt der BCR-Stimulation identisch (Daten nicht gezeigt).

Obwohl HS1 nach Antigenrezeptorstimulation nur als schwaches Signal im *Western Blot* detektiert wurde, konnte ich zum ersten Mal demonstrieren, dass eine BCR-induzierte Assoziation von HS1 über die SLP-65 SH2-Domäne in Ramos B-Zellen möglich war (Abb. 5.15, Spur 4, oben).

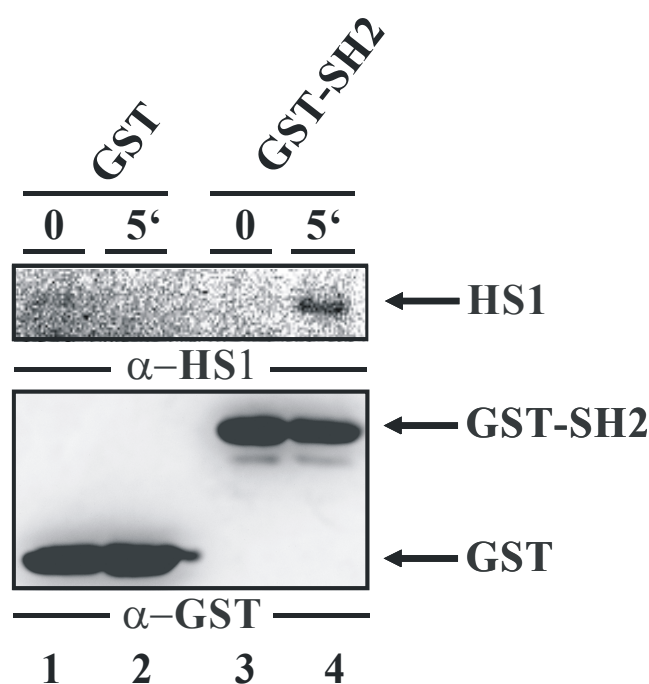


Abb. 5.15: Die SH2-Domäne von SLP-65 interagiert mit HS1

Je 3×10^7 Ramos B-Zellen wurden für 0 (Spuren 1 und 3) oder 5 Minuten (Spuren 2 und 4) mit $20 \mu\text{g/mL}$ F(ab')_2 α -IgM stimuliert und lysiert. Die Lysate wurden Affinitätsaufreinigungen mit GST (Spuren 1 und 2) oder Fusionsproteinen aus GST und der SH2-Domäne von SLP-65 (Spuren 3 und 4) unterzogen. Aufgereinigte Proteine wurden durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und nach *Western Blot*-Analyse mittels anti-HS1- (oben) oder anti-GST-Antikörpern (unten) nachgewiesen. Die relativen molekularen Massen wurden in kDa an der linken Seite angegeben.

5.10 Inaktivierung von *chabp1* in DT40-Zellen durch zielgerichtete Mutagenese

Primäre Zellen aus der Maus stellen im Vergleich zu Zelllinien experimentell schwer zu handhabende Populationen dar, da ihre langfristige Kultivierung ohne Immortalisierung nicht möglich ist. Um weitere funktionelle Analysen von Abp1 in hämatopoietischen Systemen durchzuführen, wurde auf eine in unserem Labor etablierte B-Zelllinie des

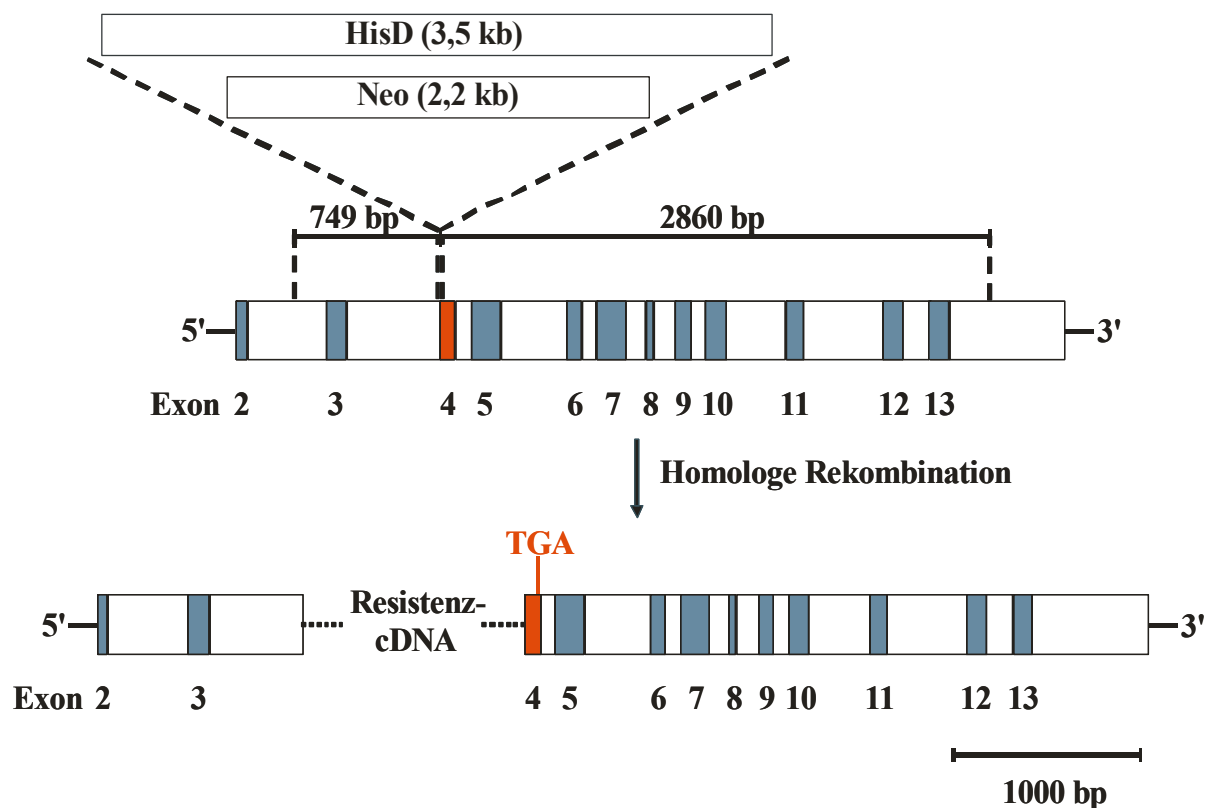
Huhns (DT40) zurückgegriffen. DT40-Zellen können aufgrund ihrer hohen Rekombinationseffizienz für die Erzeugung von Gen-Inaktivierungen, wie z. B. des *chabp1*-Gens, durch zielgerichtete Mutagenesen eingesetzt werden.

Um eine Inaktivierung von *chabp1* zu erzielen, wurden detaillierte Informationen des betreffenden Genabschnitts benötigt. Obwohl bereits 99 % des Hühner-Genoms entschlüsselt waren, wiesen die unter der *ensembl*-Genbank bereitgestellten Sequenzinformationen des Genlokus von *chabp1* erhebliche Abschnitte unbekannter genomischer Sequenz auf (Daten nicht gezeigt). Die in der Datenbank aufgelisteten Sequenzbereiche von *chabp1* konnten aufgrund der geringen Länge nicht zur Generierung eines DNA-Konstrukts genutzt werden, das mit hinreichender Effizienz homolog rekombinieren würde. Ich konnte durch umfangreiche PCR-Verfahren den in Abb. 5.16, A schematisch dargestellten, zusammenhängenden Sequenzbereich von 4301 bp dekodieren. Diese Sequenzinformationen waren ausreichend, um einen Substitutionsvektor zur Inaktivierung des *chabp1*-Lokus zu generieren. Zwei Resistenz-kodierende cDNA (Neo bzw. HisD), sollten die letzten 30 bp von Intron 3 und die erste Base von Exon 4 des *chabp1*-Genlokus ersetzen. Sollte trotz Insertion der Resistenz-vermittelnden Kassetten ein mRNA-Transkript von einem noch aktiven *chabp1*-Genlokus entstehen, wird durch Deletion der ersten Base von Exon 4 eine Leserasterverschiebung induziert mit Generierung eines Stopp-Codons ab Basenabfolge 322-324. Flankierend zu den Resistenz-vermittelnden Kassetten Neo bzw. HisD wurden zu *chabp1* homologe Sequenzabschnitte mit 749 bp an den 3'-Enden bzw. 2860 bp an den 5'-Seiten angefügt (Abb. 5.16, A). Der generierte Substitutionsvektor pBSabp1Neo wurde mittels Elektroporation in DT40-Zellen transfiziert. Die homologe Rekombination wurde mit Hilfe von PCR-Analysen überprüft. Ein DT40 Klon von 34 wies eine monoallelische Inaktivierung des *chabp1*-Genlokus auf (Daten nicht gezeigt). Um das zweite Allel zu inaktivieren, wurde der Vektor pBSabp1HisD in den bereits mutierten DT40 B-Zellklon eingeschleust. Die homologe Rekombination des Konstrukts wurde wiederum durch PCR analysiert. Von 27 getesteten DT40 B-Zellklonen war ausschließlich bei Klon ID12 der Nachweis der korrekten Rekombination für beide Substitutionskonstrukte erfolgreich (Abb. 5.16, A). Um die Inaktivierung des *chabp1*-Lokus auch auf Proteinebene nachzuweisen, wurden Lysate aus wildtypischen, *chabp1*^{+/+} bzw. *chabp1*^{-/-} DT40-Zellen hergestellt (Abb. 5.16, C, Spuren 1-3, oben). Diese wurden einer SDS-PAGE unterzogen und aufgetrennte Proteine im *Western Blot* mittels Antikörper gegen chAbp1 nachgewiesen.

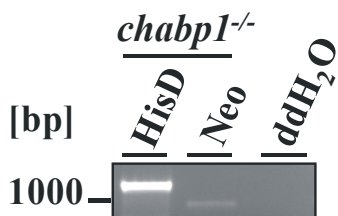
Ich konnte zeigen, dass die chAbp1-Proteinproduktion in Klon ID12 erfolgreich inaktiviert wurde (Abb. 5.16, C, Spur 3, oben). In wildtypische bzw. *abp1*^{+/-} DT40-Zellen wurde chAbp1-Expression detektiert (Abb. 5.16, C, Spuren 1 und 2, oben). Eine *Western Blot*-Analyse mit Antikörpern gegen Aktin diente als Proteinladekontrolle (Abb. 5.16, Spuren 1 bis 3, unten).

Zusammenfassend konnte ich zeigen, dass die Generierung chAbp1-defizienter DT40-Zellen erfolgreich war.

A



B



C

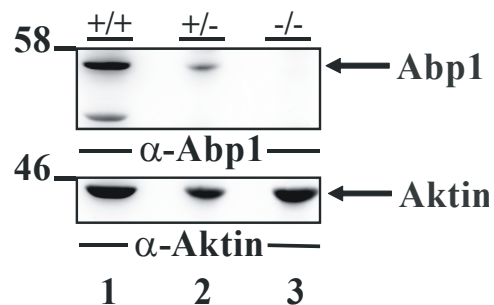


Abb. 5.16: Generierung chAbp1-defizienter DT40-Zellen

(A) Schematische Darstellung des wildtypischen und des durch gezielte Mutagenese mit einem Substitutionskonstrukt veränderten *chabp1*-Genlocus in DT40-Zellen. Nach

homologer Rekombination des Konstrukts wird ein Stopp-Codon (TGA) in Exon 4 generiert. Ein Maßstab in Basenpaaren (bp) ist angegeben. **(B)** Aus DT40-Zellen wurde genomische DNA isoliert, welche mittels PCR auf die Integration der Resistenzkodierenden cDNA (Neo und HisD) in den *chabp1*-Genlocus überprüft wurde. Die bei der Amplifikation verwendeten Primer waren im Fall der Neo-Resistenz-vermittelnden Kasette Neo1 bzw. *abp1ko2screen.rev* und für die HisD-Resistenz-kodierende Kasette HisD2 bzw. *abp1ko2screen.rev*. Bei homologer Rekombination des Neo- bzw. des HisD-Substitutionskonstrukts entstand ein PCR-Produkt mit 997 bzw. 1120 bp. Als Negativkontrolle wurde eine PCR in Abwesenheit genomischer DNA durchgeführt. Ein DNA-Größenstandard wurde in Basenpaaren (bp) an der linken Seite angegeben. **(C)** Je 1×10^6 *chabp1*^{+/+} (Spur 1), *chabp1*^{+/-} (Spur 2) bzw. *chabp1*^{-/-} (Spur 3) DT40-Zellen wurden lysiert und einer SDS-PAGE unterzogen. Die Detektion von Abp1 erfolgte nach *Western Blotting* mittels Antikörper gegen Abp1 aus dem Huhn (oben). Als Proteinladekontrolle diente Aktin (unten). Die relativen molekularen Massen wurden in kDa an der linken Seite angegeben.

5.11 Ca²⁺-Mobilisierung in *chabp1*^{-/-} DT40-Zellen

Für mAbp1 aus der Maus wurde in B-Lymphocyten eine Beteiligung an der BCR-induzierten Signaltransduktion gezeigt (Larbolette *et al.*, 1999, Larbolette, 2000). Dr. S. Wienand konnte einen Einfluss von mAbp1 auf den extrazellulären Ca²⁺-Einstrom in B-Zellen nach BCR-Stimulation belegen (Wienand, 2006). Um eine ähnliche Funktion von chAbp1 in DT40 B-Lymphocyten nachzuweisen, wurden Ca²⁺-Mobilisierungsexperimente durchgeführt. *chabp1*^{-/-} DT40-Zellen wurden mit cDNA kodierend für chAbp1-HA oder einer Leervektorkontrolle rekonstituiert. Die Proteinexpression von chAbp1-HA entsprach der endogenen chAbp1-Expression in wildtypischen DT40-Zellen (Daten nicht gezeigt). Eine durchflusszytometrische Analyse der IgM-Oberflächenexpression von *chabp1*^{-/-} DT40 bzw. *chabp1*^{-/-} DT40-Zellen, rekonstituiert mit cDNA kodierend für chAbp1, mittels Fluoreszenz-markierter anti-IgM-Antikörper zeigte keine Unterschiede (Daten nicht gezeigt).

Der Vergleich der Ca²⁺-Mobilisierung der oben angegebenen Zellen erfolgte nach Beladung mit Indo-1-AM mittels durchflusszytometrischer Analysen. *chabp1*^{-/-} DT40-Zellen bzw. deren Derivate, die mit cDNA kodierend für chAbp1-HA rekonstituiert wurden, wurden mit anti-IgM-Antikörpern stimuliert. Der aus intrazellulären Speichern stammende Ca²⁺-Flux wurde in Anwesenheit von EGTA analysiert. Eine anschließende Ca²⁺-Zugabe erlaubte die Detektion des Ca²⁺-Einstroms über die Plasmamembran.

Ich konnte zeigen, dass sowohl die Ca²⁺-Mobilisierung aus intrazellulären Speichern als auch der Ca²⁺-Flux über die Plasmamembran in *chabp1*^{-/-} DT40-Zellen im Vergleich zu chAbp1-HA-exprimierenden *chabp1*^{-/-} DT40-Zellen erhöht war (Abb. 5.17).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Ca^{2+} -Mobilisierung in *chabp1*^{-/-} DT40-Zellen verstärkt war. Die Daten deuten darauf hin, dass chAbp1, ähnlich wie orthologes mAbp1 aus der Maus, als Negativ-Regulator der Ca^{2+} -Mobilisierung fungieren kann.

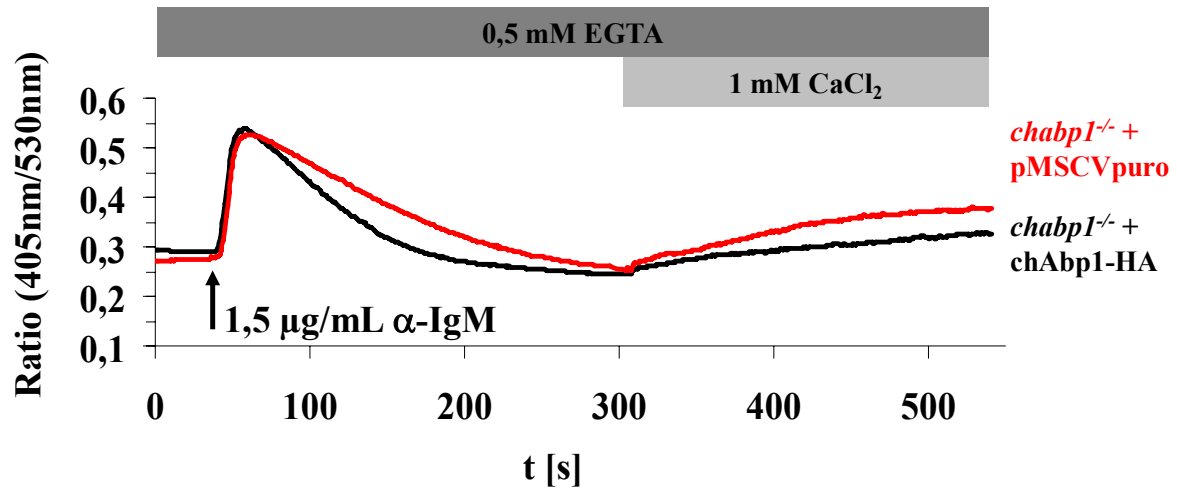


Abb. 5.17: Erhöhter Ca^{2+} -Flux in *chabp1*^{-/-} DT40 Zellen

Je 1×10^6 *chabp1*^{-/-} DT40-Zellen (rot) bzw. *chabp1*^{-/-} DT40-Zellen rekonstituiert mit cDNA kodierend für chAbp1-HA (schwarz) wurden mit Indo-1-AM beladen. Die Ca^{2+} -Mobilisierung der Zellen wurde nach BCR-Stimulation mit $1,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ α -IgM-Antikörpern in Ca^{2+} -freiem Puffer (0,5 mM EGTA) für 4,5 Minuten durchflusszytometrisch analysiert. Anschließend wurde die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration auf 1 mM eingestellt und der Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran für weitere 4 Minuten detektiert. Die Abbildung spiegelt das Ergebnis von zwei unabhängigen Messungen wider.

5.12 Durchflusszytometrische Charakterisierung IgG-positiver B-Zellen

Das Adapterprotein mAbp1 spielt eine entscheidende Rolle im intrazellulären Vesikeltransport und partizipiert an der Steuerung der Antigenrezeptor-vermittelten Endocytose (Connert *et al.*, 2006; Onabajo *et al.*, 2008). Um potenzielle Auswirkungen der mAbp1-, HS1- bzw. mAbp1/HS1-Defizienzen auf die Expression von BCR-Oberflächenmolekülen zu untersuchen, wurden wildtypische, mAbp1-, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defiziente Milzzellen mit Fluorophor-markierten Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle B220, CD19 und IgG inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch im SSC bzw. FSC und nach B220-Expression im Histogramm aufgetrennt (Abb. 5.16, oben). B220^{low/-}-Zellen wurden auf die Expression von CD19 und IgG untersucht (Abb. 5.16, unten). In wildtypischen, mAbp1- bzw. HS1-defizienten Tieren konnte eine B220^{low/-}/CD19^{low/-}/IgG⁺-Zell-Population (Abb. 5.16, unten) nachgewiesen werden. Das früheste Auftreten dieser Zell-Population wurde mit 3,5 bzw. 4 Monaten in wildtypischen bzw. mAbp1-defizienten Tieren beobachtet. 57 % (n=7) der wildtypischen,

86 % (n= 7) der mAbp1-defizienten und 33 % (n=3) der HS1-defizienten Mäuse älter als 4 Monate wiesen diese IgG⁺-Population auf. Eine Detektion der Populationen gelang sowohl aus Knochenmark- als auch aus Milzzellen (Daten nicht gezeigt). In mAbp1/HS1-defizienten Mäusen konnte in keinem der untersuchten Tiere (n=8) die B220^{low/-}/CD19^{low/-}/IgG⁺-Zell-Population nachgewiesen werden (Abb. 5.16, rechts unten). Bei der durchflusszytometrischen Charakterisierung B220^{low/-}/CD19^{low/-}/IgG⁺-Zellen wurde in mAbp1-defizienten Zellen eine stark erhöhte IgG-Oberflächenexpression im Vergleich zu wildtypischen Zellen beobachtet. Die Verschiebung der Populationen im Histogramm beträgt circa 0,5 log-Einheiten, was einer fünffach gesteigerten Oberflächenexpression entspricht (Abb. 5.16, unten, Ellipse).

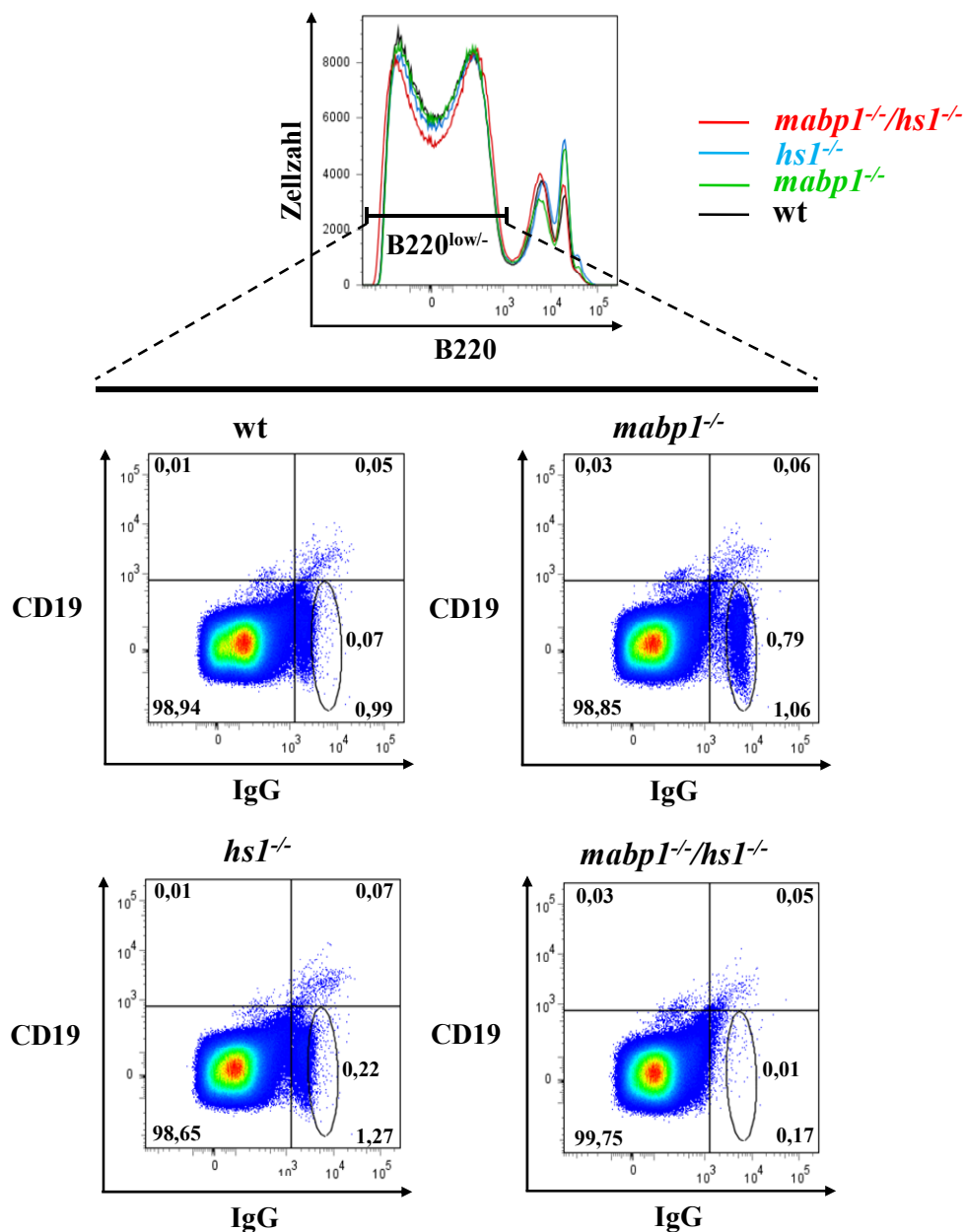


Abb. 5.18: Abbildungslegende siehe nächste Seite

Unterschiede in der Zusammensetzung IgG-positiver Populationen in mAbp1-, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten Mäusen

5×10^6 Knochenmarkzellen von wildtypischen, mAbp1-, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten Mäusen wurden isoliert und mit Fluorophor-markierten Antikörpern gegen die Oberflächenproteine B220, CD19 und IgG inkubiert. Mittels durchflusszytometrischer Analysen wurden die Knochenmarkzellen im SSC bzw. FSC aufgetrennt und anhand der B220-Expression unterschieden (oben). B220^{low/-}-Zellen wurden anhand der CD19- oder IgG-Oberflächenexpression unterschieden (unten). Die relativen prozentualen Verteilungen der Zellen je Quadrant sowie der B220^{low/-}/CD19^{low/-}/IgG⁺-Zellfraktionen (Ellipse) sind angegeben. Die in der Abbildung gezeigten Daten entsprechen drei repräsentativen Ergebnissen.

Um auszuschließen, dass im Vergleich zum genetisch reinen Hintergrund wildtypischer bzw. HS1-defizienter C57BL/6 Mäuse eine verbleibende Inhomogenität des Hintergrundes mAbp1-defizienter C57BL/6 Tiere zur Verschiebung der B220^{low/-}/CD19^{low/-}/IgG⁺-Zellen beitrug, wurden wildtypische bzw. mAbp1-defiziente Balb/c Mäuse auf das Vorkommen dieser Population untersucht. Auch bei mAbp1-defizienten Balb/c Mäusen trat eine Verschiebung der Population bei der durchflusszytometrischen Analyse auf. Aufgrund dieses Befundes konnten eventuelle Rückkreuzungseffekte vom Balb/c- auf den C57BL/6-Mausstamm ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

Um auszuschließen, dass B220^{low/-}/CD19^{low/-}/IgG⁺-Populationen eine zufällige, artifizielle Anhäufung von Ereignissen während der FACS-Analyse darstellten, wurden wildtypische bzw. mAbp1-defiziente Populationen im SSC/FSC (Abb. 5.19, Mitte) aufgetrennt und mit der Gesamtzahl der im SSC/FSC aufgetretenen Ereignisse in einem Diagramm überlagert (Abb. 5.19, rechts). B220^{low/-}/CD19^{low/-}/IgG⁺-Zellen bildeten bei Diversifizierung im SSC/FSC eine definierte Population starker Granularität. Die in mAbp1-defizienten Zellen beobachteten Verschiebungen der B220^{low/-}/CD19^{low/-}/IgG⁺-Population wirkte sich nicht auf die Lage im SSC/FSC aus (Abb. 5.19, Mitte).

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass B220^{low/-}/CD19^{low/-}/IgG⁺-Zellen eine Population im SSC/FCS bildeten. Die IgG-Expression dieser Zellen war sowohl in mAbp1-defizienten C57BL/6 als auch Balb/c Tieren im Vergleich zur wildtypischen Kontrolle erhöht. Ein Nachweis dieser Population in mAbp1/HS1-defizienten Tieren konnte nicht nachgewiesen werden.

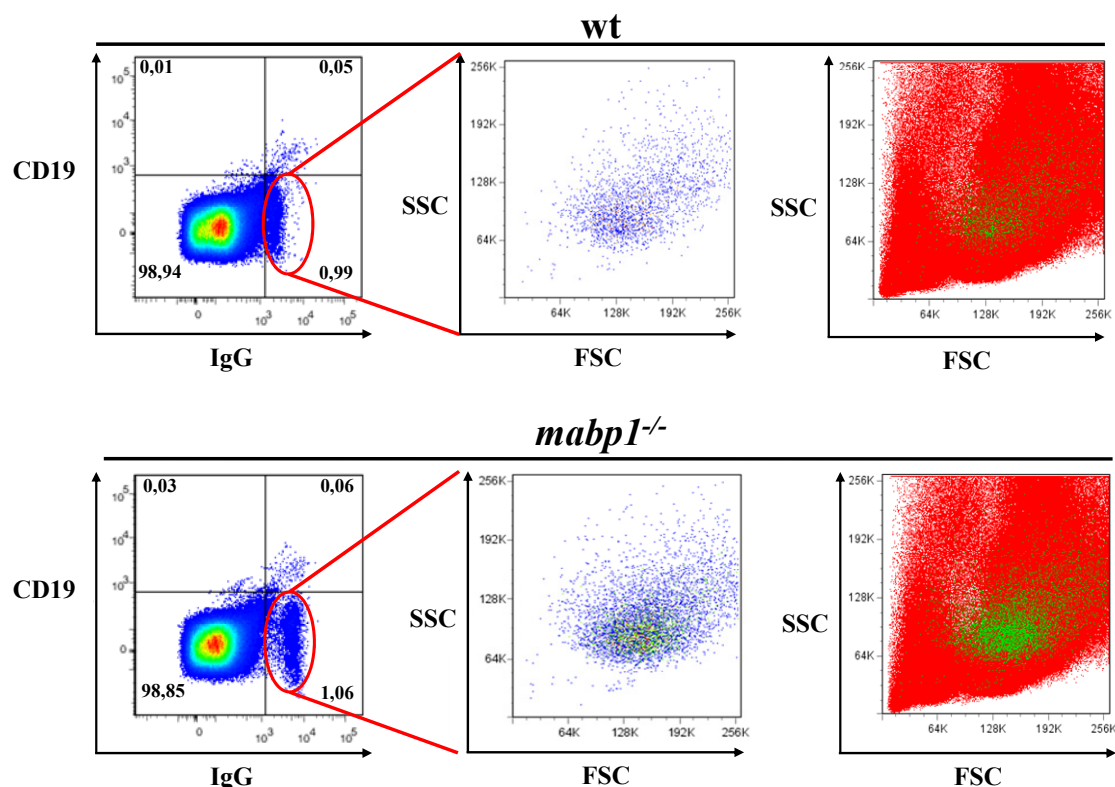


Abb. 5.19: B220^{low/-}/CD19^{low/-}/IgG⁺-Knochenmarkzellen bilden eine Zell-Population
 Knochenmarkzellen von wildtypischen (oben) und *mAbp1*-defizienten Mäusen (unten) wurden isoliert und mit Fluorophor-markierten Antikörpern gegen die Oberflächenproteine B220, CD19 und IgG inkubiert. B220^{low/-}-Zellen wurden anhand der CD19- und IgG-Oberflächenexpression unterschieden (links, vgl. Abb. 5.18). B220^{low/-}/CD19^{low/-}/IgG⁺-Knochenmarkzellen wurden mittels durchflusszytometrischer Analysen im SSC/FSC aufgetrennt (Mitte). Die relative Lage dieser Zellen (rechts, grün) zu allen Knochenmarkzellen im SSC/FSC (rechts, rot) wurde im rechten Graphen abgebildet. Die relativen prozentualen Verteilungen der Zellen je Quadrant sind angegeben (links). Die in der Abbildung gezeigten Daten entsprechen drei repräsentativen Ergebnissen.

5.13 Durchflusszytometrische Charakterisierung B220^{low/-}/CD19^{low/-}/IgG⁺ B-Lymphocyten in wildtypischen bzw. *mAbp1*-defizienten Mäusen nach Immunisierung mit Hapten-Protein-Konjugaten

Die unter 5.12 gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass aufgrund der starken Oberflächenexpression von IgG eine Population von B-Zellen identifiziert wurde, die bereits Reaktionen der Keimzentren, wie Isotypwechsel bzw. somatische Hypermutation, durchlaufen hat. Einige Memory-B-Zell-Populationen exprimieren kein B220 bzw. CD19 auf ihrer Zelloberfläche (Cascalho *et al.*, 2000; Driver *et al.*, 2001; McHeyzer-Williams *et al.*, 2000). Um nachzuweisen, dass die beschriebene B-Zell-Population eine in Mäusen erstmals mittels FACS-Analyse nachgewiesene Memory-B-Zellfraktion darstellt, wurden

Immunisierungsexperimente mit Hapten-Protein-Konjugaten durchgeführt. Haptene sind als Moleküle, die von Antikörpern gebunden werden, jedoch keine Immunreaktion auslösen können (Landsteiner, 1921). Erst bei Kopplung eines Haptens an ein Trägerprotein wird eine Immunantwort ausgelöst. Für Immunisierungsexperimente werden niedermolekulare Substanzen wie z. B. 4-Hydroxy-3-Nitrophenylacetat (NP), 4-Hydroxy-3-Iodo-5-Nitrophenylacetat (NIP) oder 2,4-Dinitrophenol (DNP) als Haptene verwendet. In T-Zell-abhängige Immunantworten finden Trägerproteine wie z. B. *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) bzw. *chicken gamma globulin* (CGG) Anwendung. T-Zell-unabhängige Kopplungsreagenzien stellen Polysaccharide, wie z. B. Ficoll dar.

Um eine T-Zell-abhängige Immunreaktion in wildtypischen bzw. mAbp1-defizienten Mäusen zu induzieren, wurde den Tieren NP(16)-KLH subkutan injiziert. Zwei *Boost*-Immunisierungen wurden in der zweiten bzw. sechsten Woche nach Versuchsbeginn durchgeführt. In der siebten Woche wurden Knochenmarkzellen isoliert und durchflusszytometrisch mittels Fluorophor-markierter Antikörper auf die Expression der Oberflächenproteine B220, CD19 und IgG untersucht. Die als B220^{low/-}/CD19^{low/-}/IgG⁺ charakterisierte Zell-Population wurde auf die Affinität zum Fluorophor-gekoppelten Hapten-Trägerprotein NIP-BSA untersucht und wurde sowohl bei wildtypischen als auch mAbp1-defizienten Mäusen als BP-spezifisch nachgewiesen. Die Oberflächenexpression der Antigenrezeptoren vom IgG-Isotyp wildtypischer bzw. mAbp1-defizienter B-Lymphocyten lag auf dem Niveau von mAbp1-defizienten B220^{low/-}/CD19^{low/-}/IgG⁺-Zell-Populationen vor Immunisierung (Abb. 5.20; vgl. Abb. 5.18). Der Prozentsatz der Population an allen Knochenmarkzellen war vergleichbar mit den relativen Häufigkeiten vor Immunisierung wildtypischer bzw. mAbp1-defizienter Tiere (Abb. 5.20, Ellipsen; vgl. Abb. 5.18, Ellipsen). Die Auswertung der NIP-BSA Bindekapazität ergab, dass sowohl bei wildtypischen als auch mAbp1-defizienten Tieren die B220^{low/-}/CD19^{low/-}/IgG⁺-Zell-Population hochspezifisch für das verwendete Modellantigen war (Abb. 5.20, unten). Kontrollpopulationen aus nicht immunisierten Tieren zeigten im Gegensatz dazu nur eine geringe Affinität zu NIP-BSA (Abb. 5.20, unten).

Zusammenfassend konnte bestätigt werden, dass sowohl in wildtypischen als auch in mAbp1-defizienten Mäusen die B220^{low/-}/CD19^{low/-}/IgG⁺-Zell-Population hochspezifisch und mit annähernd gleicher Affinität NIP-BSA nach Immunisierung mit NP-KLH bindet.

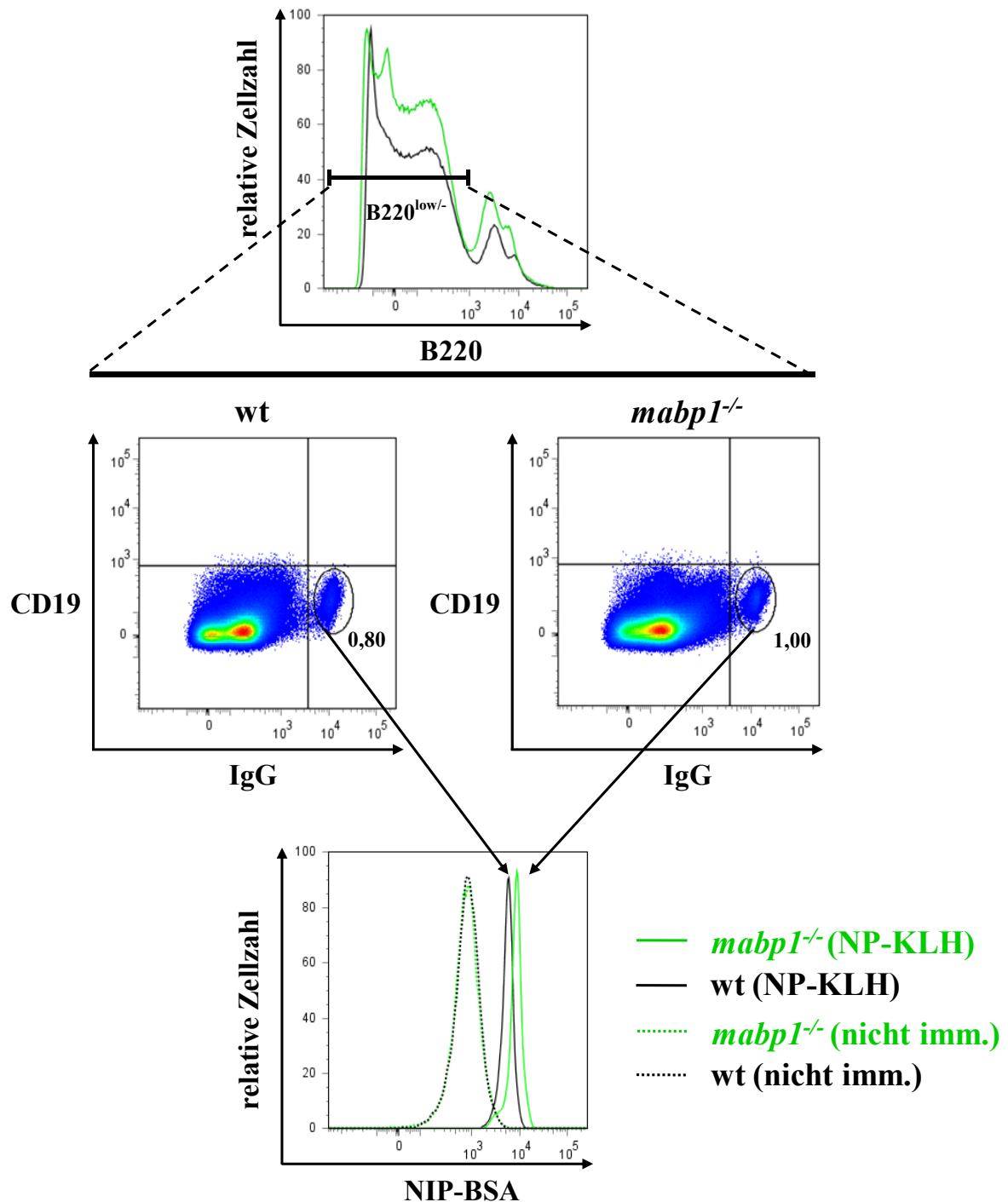


Abb. 5.20: Nachweis hochaffiner, NIP-spezifischer BCR auf B220^{low/-}/CD19^{low/-}/IgG⁺-Zell-Populationen

Wildtypische bzw. mAbp1-defiziente Mäuse wurden an Tag 0 mit 100 µg NP-KLH subkutan immunisiert. An Tag 14 bzw. 42 erfolgten *Boost*-Immunsierungen mit je 50 µg NP-KLH *intra peritoneal*. Am 49. Tag wurden Knochenmarkszellen isoliert und mit Fluorophor-markierten NIP-BSA-Konjugaten bzw. Antikörpern gegen B220, CD19 und IgG inkubiert. B220^{low/-}/CD19^{low/-}/IgG⁺-Populationen wurden mittels durchflusszytometrischer Analysen dargestellt, und die Affinität zu NIP-BSA untersucht. IgG-positive, B220^{low/-}/CD19^{low/-}-Knochenmarkszellen aus nicht immunisierten,

wildtypischen bzw. mAbp1-defizienten Mäusen dienten bei der Detektion NIP-positiver B-Lymphozyten als Negativkontrolle. Die relativen prozentualen Verteilungen B220^{low/-}/CD19^{low/-}/IgG⁺-Zellfraktionen (Ellipse) wurden angegeben.

5.14 Durchflusszytometrische Analyse der Reifung und Endocytoserate mAbp1-defizienter dendritischer Zellen (DC)

Eine Beteiligung von mAbp1 an der Antigen-vermittelten Endocytose und am intrazellulären Vesikeltransport wurde bereits nachgewiesen (Connert *et al.*, 2006; Onabajo *et al.*, 2008). Beide Vorgänge sind für die Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von Antigenen durch professionelle, Antigen-präsentierende Zellen (APC) von großer Bedeutung. Wie bereits unter 5.12 gezeigt, war die Expression von BCR vom IgG-Isotyp auf der Oberfläche einer B-Zellsubpopulation in mAbp1-defizienten Mäusen stark erhöht, was auf einen Defekt im Recycling oder einer veränderten Syntheserate der Antigenrezeptoren hindeutet. Durch eine verstärkte BCR-Oberflächenexpression sind Auswirkungen auf nachgeschaltete Vorgänge wie z. B. der Antigenaufnahme, -prozessierung oder -präsentation denkbar. B-Lymphocyten gehören zur Gruppe der APC. Sie können jedoch im Vergleich zu DC eine nach Antigenaufnahme vermittelte T-Zell-Aktivierung nicht so erfolgreich induzieren (zur Übersicht: Bell *et al.*, 1999). Aus diesem Grund wurden letztgenannte für Analysen zur Antigenaufnahme bzw. -präsentation sowie T-Zell-Stimulation verwendet.

Um DC aus dem Knochenmark von Mäusen zu generieren, wurden diese isoliert und für sieben Tage *in vitro* unter Anwesenheit von GM-CSF- und IL4 kultiviert. Eine Aktivierung der DC zu reifen APC erfolgte durch Stimulation der Zellen mit LPS für 24 h (vgl. Abb. 5.22).

Nach acht Tagen wurden die Knochenmarkzellen auf die Oberflächenexpression des DC-Markerproteins CD11c und der Aktivierungsmarker CD86 bzw. MHC II untersucht. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD11c, CD86 bzw. MHC II inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert.

Der Anteil CD11c-positiver Knochenmarkzellen an wildtypischen bzw. mAbp1-defizienten Knochenmarkzellen war nahezu identisch (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu betrug der Anteil der aktivierten DC, die neben CD11c auch CD86 und MHC II auf der Oberfläche exprimierten, bei mAbp1-defizienten DC 70 % im Vergleich zu allen DC (Abb. 5.21, A). Der Anteil wildtypischer, aktivierter DC an sämtlichen CD11c-positiven DC betrug 85 % und lag um 15 % höher als bei aktivierten DC aus mutierten Mäusen (Abb. 5.21, A).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Differenzierung von Knochenmarkszellen zu CD11c-positiven DC in *mAbp1*-defizienten Mäusen nicht gestört ist. Die Daten deuteten jedoch darauf hin, dass, aufgrund der geringeren Oberflächenexpression von CD86 und MHC II, die Reifung zu aktivierten DC gestört ist.

Da Endocytosedefekte in anderen Zelltypen *mAbp1*-defizienter Mäuse bereits nachgewiesen wurden (Connert *et al.*, 2006; Onabajo *et al.*, 2008), sollten in weiteren Experimente die Endocytoseraten wildtypischer bzw. *mAbp1*-defizienter DC verglichen werden. Für die Analysen wurden aktivierte DC aus Knochenmarkszellen wie oben beschrieben generiert und mit Alexa488-markiertem Ovalbumin (OVA) für 1 h inkubiert. Die Aufnahme an Fluorophor-markiertem OVA wurde durchflusszytometrisch untersucht.

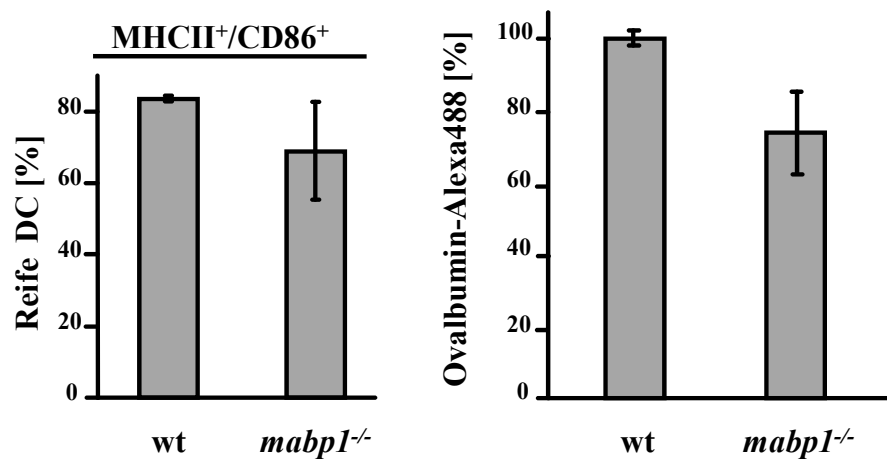


Abb. 5.21: Reduzierte Anzahl und Endocytoserate *mAbp1*-defizienter DC *ex vivo*

(A) Knochenmarkszellen wildtypischer und *mAbp1*-defizienter Mäuse wurden isoliert und differenzierten für 7 Tage *in vitro* unter GM-CSF- bzw. IL4-Zugabe und anschließender 24 h-Inkubation mit LPS zu reifen, aktivierten DC aus. Aktivierte DC wurden mit Fluorophor-markierten Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle CD11c, CD86 bzw. MHC II inkubiert und deren Oberflächenexpression durchflusszytometrisch analysiert. Der relative Prozentsatz MHCII⁺/CD86⁺ DC im Verhältnis zu CD11c-positiven DC wurde ermittelt.

(B) Knochenmarkszellen wildtypischer und *mAbp1*-defizienter Mäuse wurden isoliert und differenzierten für 7 Tage *in vitro* unter GM-CSF- bzw. IL4-Zugabe und anschließender 24 h-Inkubation mit LPS zu reifen, aktivierten DC aus. An Tag 1 nach LPS-Stimulation wurden DC für 1 h bei 37 °C mit 25 µg/mL Alexa488-konjugiertem OVA beladen, mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern gegen CD11c und CD86 markiert. Als Negativkontrolle wurden DC für 1 h auf Eis mit 25 µg/mL Alexa488-konjugiertem OVA inkubiert, mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern gegen CD11c und CD86 markiert. Die Endocytoserate CD11c- und CD86-positiver Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt und die Fluorophorintensität der Negativkontrolle von dem Wert nach 37 °C-Inkubation subtrahiert. Die Abbildungen spiegeln das Ergebnis von drei unabhängigen Messungen wider.

Ich konnte demonstrieren, dass die Endocytoserate in mAbp1-defizienten DC im Vergleich zu wildtypischen DC um 25 % herabgesetzt war (Abb. 5.21, B).

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass mAbp1-defiziente DC nach LPS-Stimulation eine verringerte Oberflächenexpression von CD86 bzw. MHC II und eine erniedrigte Internalisierungsrate aufwiesen.

5.15 Durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Proliferation nach Aktivierung durch wildtypische bzw. mAbp1-defiziente DC

Eine wichtige Funktion von DC besteht darin, Antigene aufzunehmen und diese auf der Zelloberfläche in Peptid/MHC II-Komplexen T-Zellen zu präsentieren. CD4⁺ T-Zellen mit spezifischen T-Zell-Antigenrezeptoren (TCR) erkennen diese Komplexe, werden aktiviert und proliferieren. Geringe Mengen an extrazellulären Antigenen können auch auf Peptid/MHC I-Komplexen kreuzpräsentiert werden (Albert *et al.*, 2001; Belz *et al.*, 2002; zur Übersicht: Ackerman und Cresswell, 2004). Diese Komplexe werden von spezifischen TCR auf CD8⁺ T-Zellen erkannt, was ebenfalls zur Proliferation der Zellen führen kann. Die Aktivierungsfähigkeit der DC und die Proliferationseigenschaften der T-Zellen werden in speziellen T-Zell-Proliferationstests *in vitro* kombiniert. Im Folgenden wird der generelle Versuchsverlauf beschrieben.

Für CD4⁺ T-Zell-Proliferationsanalysen stand die transgene Mauslinie Do11.10 zur Verfügung, deren CD4⁺ T-Zellen spezifisch ein Epitop (Aminosäuren 323 bis 339) auf dem Modellantigen OVA bei Präsentation durch MHC-II-IA_d-Moleküle erkennt (Murphy *et al.*, 1990; Robertson *et al.*, 2000). Für CD8⁺ T-Zell-Proliferationstest wurde die Mauslinie OT-I verwendet, die eine CD8⁺ T-Zell-transgene Linie darstellt, bei der der CD8⁺ T-Zell-Antigenrezeptor das Peptid SIINFEKL (Aminosäuren 257-264 aus OVA) nach Präsentation mit MHC-I-K_b wahrnimmt (Hogquist *et al.*, 1995; Sterry *et al.*, 1995).

Um wildtypische bzw. mAbp1-defiziente DC auf T-Zell-Aktivierung zu testen, wurden Knochenmarkzellen isoliert und für sieben Tage unter geeigneten GM-CSF bzw. IL4-Konzentrationen kultiviert. Eine LPS-Zugabe für 24 h führte zur Aktivierung der DC. In Zusammenarbeit mit Dr. P. Reichardt, Institut für Molekulare und Klinische Immunologie, Universitätsklinikum Magdeburg, wurden reife, aktivierte DC mit dem Modellantigen OVA oder OVA-Peptiden inkubiert. OVA-spezifische CD8⁺ oder CD4⁺ T-Zellen wurden intrazellulär mit CFSE, einem äußerst stabilen Fluorophor, markiert und für 72 h mit OVA-beladenen DC kokultiviert. Die Proliferation der T-Zellen wurde

durchflusszytometrisch anhand der Verteilung der CFSE-Fluoreszenz analysiert (Abb. 5.22).

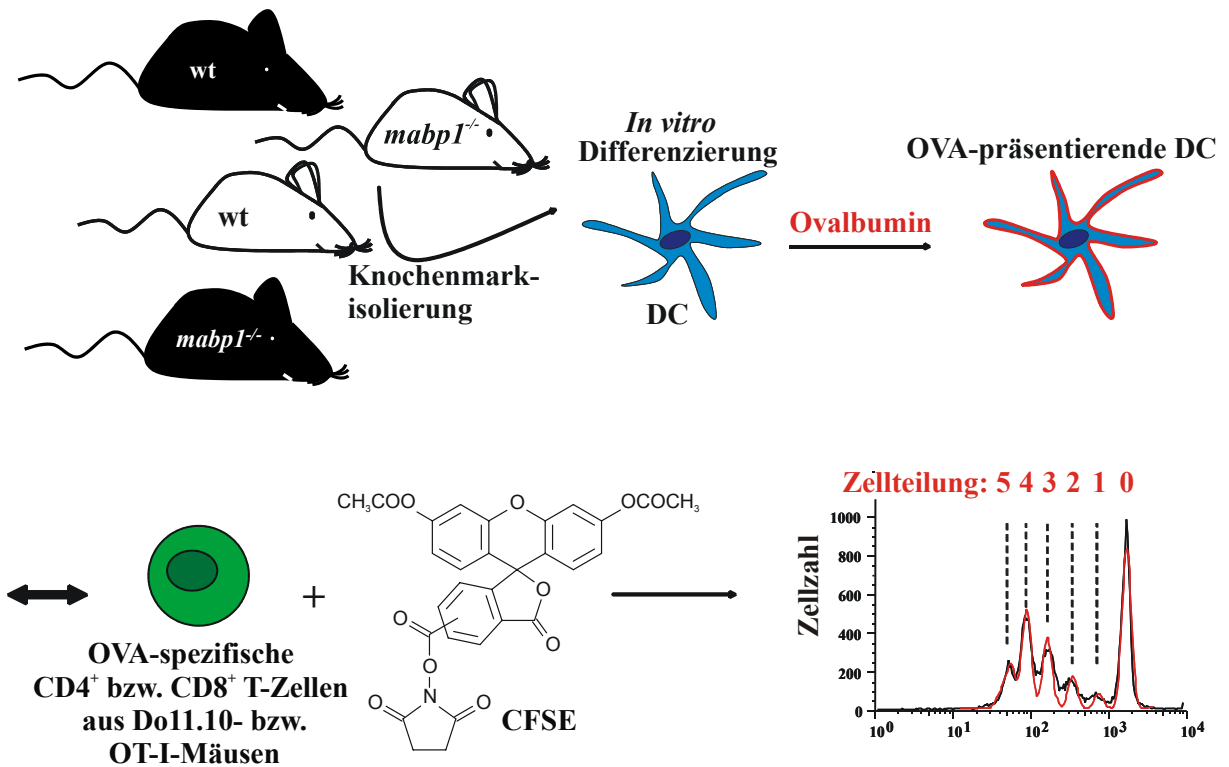


Abb. 5.22: Generierung von DC zur Verwendung in T-Zell-Proliferationstests

Knochenmarkszellen wildtypischer und mAbp1-defizienter Balb/c (weiß) bzw. C57BL/6 (schwarz) Mäuse wurden isoliert und *in vitro* durch 500 ng/L GM-CSF- bzw. 50 ng/L IL-4-Zugabe und 10-100 ng/mL LPS-Stimulation zu DC differenziert. Reife DC wurden mit OVA oder OVA-Peptid (CD4⁺ T-Zell-Aktivierung: AS 323 bis 339, CD8⁺ T-Zell-Aktivierung: AS 257 bis 264) inkubiert. OVA-spezifische CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen wurden mit CFSE beladen und mit OVA-präsentierenden DC für 72 h kokultiviert. Unterschiede in der Proliferation CFSE-beladener CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen konnten mittels durchflusszytometrischer Analysen ausgewertet werden.

CFSE: Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester.

Zur Analyse der CD8⁺ T-Zell-Antwort wurden wildtypische bzw. mAbp1-defiziente DC aus C57BL/6 Mäusen wie oben beschrieben generiert, mit unterschiedlichen Konzentrationen OVA bzw. OVA-Peptid (SIINFEKL) inkubiert, und mit CFSE beladen CD8⁺ T-Zellen kokultiviert. Eine durchflusszytometrische Analyse der T-Zellproliferation wurde im Anschluss durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl durch die OVA- als auch OVA-Peptid-Inkubation wildtypischer bzw. mAbp1-defizienter DC kein Unterschied in der Aktivierung cytotoxischer T-Zellen nachgewiesen werden konnte (Abb. 5.23). Der Anteil der proliferierten T-Zellen lag bei Beladung der wildtypischen bzw. mAbp1-defizienten DC mit 200, 2000 bzw. 20000 ng/mL OVA-Protein zwischen 75 % bis 97 %.

Eine noch stärkere Stimulation (89 % bis 98 %) wurde durch Inkubation der DC mit 0,002, 0,02 bzw. 0,2 ng/mL OVA-Peptid erzielt. Als Negativkontrolle wurden unbeladene DC mit CD8⁺ T-Zellen kokultiviert. OVA-negative DC waren in der Lage, über 40 % der cytotoxischen T-Zellen zu stimulieren.

Unabhängig von der hohen Grundstimulation durch unbeladene DC konnte gezeigt werden, dass OVA- bzw. OVA-Peptid-beladene DC CD8⁺ T-Zellen effizient aktivieren konnten. Die cytotoxische T-Zell-Antwort wurde durch die Abwesenheit von mAbp1 jedoch nicht beeinflusst.

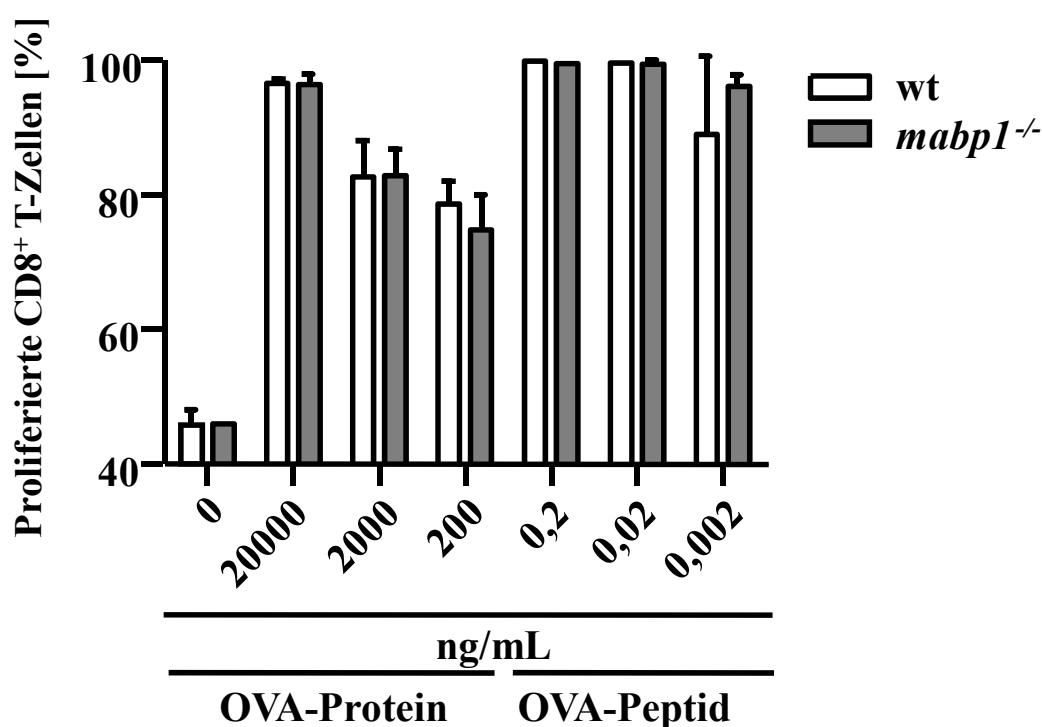


Abb. 5.23: Unveränderte CD8⁺ T-Zell-Proliferation durch mAbp1-defizienten DC *in vitro*

Knochenmark von wildtypischen und mAbp1-defizienten Mäusen wurde isoliert und aktivierte DC *in vitro* durch Cytokin- und LPS-Zugabe hergestellt. Nach 9 Tagen wurden jeweils 10000 DC mit 0, 200, 2000 oder 20000 ng/mL OVA bzw. 0,2, 0,02 oder 0,002 ng/mL OVA-Peptid (SIINFEKL, Aminosäuren 257 bis 264 aus OVA) inkubiert und mit je 200000 CFSE-beladenen, OVA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen für 72 h kokultiviert. Die Proliferation der T-Zellen wurde durchflusszytometrisch für jede angegebene OVA-Konzentration analysiert. Der Prozentsatz proliferierter T-Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl wurde im Diagramm dargestellt. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte CD8⁺ T-Zellen.

Um den Einfluss einer mAbp1-Defizienz in DC auf die CD4⁺ T-Zellproliferation zu untersuchen, wurden wildtypische bzw. mAbp1-defiziente DC aus Balb/c Mäusen wie

oben beschrieben generiert. Die DC wurden *in vitro* mit OVA bzw. OVA-Peptid (AS 323 bis 339) inkubiert und mit CFSE-beladenen CD4⁺ T-Zellen kokultiviert. Nach Ende der Kokultivierung erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der CD4⁺ T-Zellproliferation. Die Ergebnisse zeigen, dass nach Inkubation mit OVA-Peptid (Abb. 5.24, schwarz) für die 3120, 12500 bzw. 50000 pro Reaktionsansatz eingesetzten wildtypischen bzw. mAbp1-defizienten DC keine Unterschiede zu verzeichnen waren. Diese Daten stehen im Gegensatz zur Kokultivierung der DC mit Gesamt-OVA. Der Anteil nicht proliferierter T-Lymphocyten ergab nach Kokultivierung mit 12500 beladenen, wildtypischen DC (Abb. 5.24, rot) einen Wert von 26 %. Für die gleiche Anzahl OVA-behandelter, mAbp1-defizienter DC wurde lediglich ein Wert von 5 % ermittelt. Ein nahezu gleiches prozentuales Verhältnis wurde für die DC-Konzentration 3120 festgestellt. 48 % der CD4⁺ T-Zellen, die mit wildtypischen DC, und nur 12 % der T-Lymphocyten, die mit mAbp1-defizienten DC kokultiviert wurden, blieben unstimuliert und proliferierten nicht.

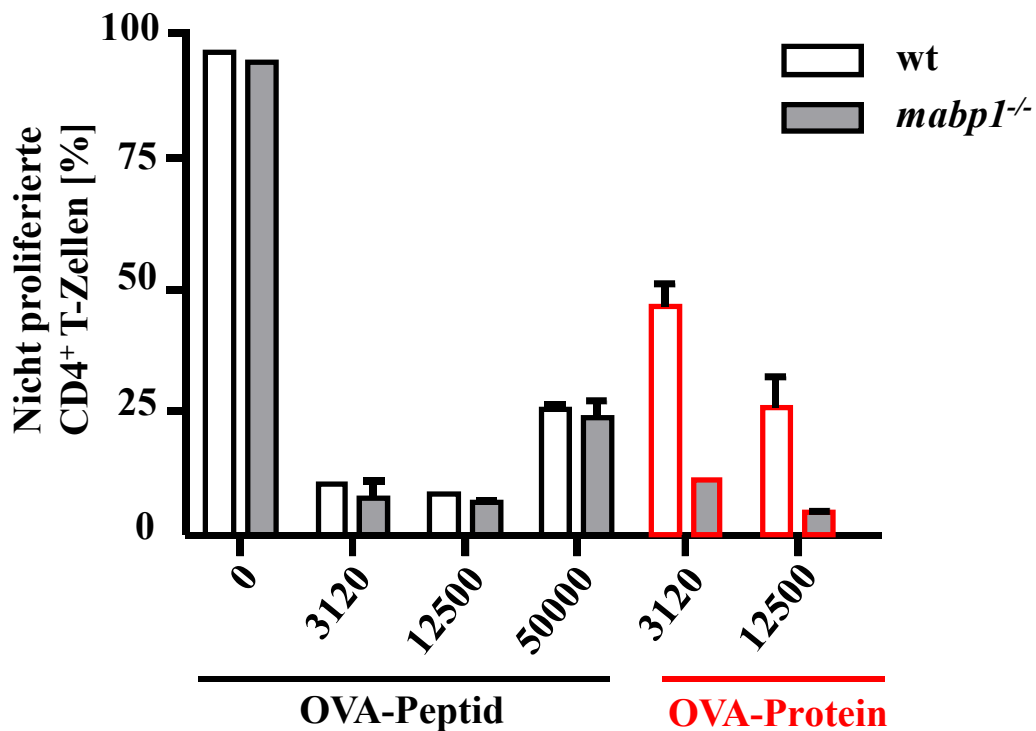


Abb. 5.24: Verstärkte CD4⁺ T-Zell-Proliferation durch mAbp1-defiziente DC *in vitro*
Knochenmark von wildtypischen und mAbp1-defizienten Mäusen wurde isoliert und DC *in vitro* durch Cytokin- und LPS-Zugabe hergestellt. Nach 9 Tagen wurden die DC mit 20 µg/mL OVA (rot) oder OVA-Peptid (schwarz) inkubiert und mit je 200000 CFSE-beladenen, OVA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen für 72 h kokultiviert. Die Proliferation der T-Zellen wurde durchflusszytometrisch für jede angegebene DC-Anzahl (siehe Diagramm) analysiert. Der Prozentsatz nicht proliferierter T-Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl

wurde im Diagramm dargestellt. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte CD4⁺ T-Zellen.

Eine T-Zell-Kultivierung ohne die Zugabe von DC diente als Negativkontrolle und wies einen sehr hohen Anteil an nicht proliferierten T-Zellen (93 % bis 97 %) auf (Abb. 5.24). Obwohl ein Aktivierungs- und Endocytosedefekt in mAbp1-defizienten DC nachgewiesen wurde (vgl. Abschnitt 5.14), konnte zusammenfassend gezeigt werden, dass eine mindestens 4fach stärkere T-Zellaktivierung durch OVA-beladene DC aus mAbp1-defizienten Mäusen im Vergleich zu wildtypischen Tieren erkennbar war. Die OT-II-Antwort war hingegen unbeeinflusst, wenn eine Vorinkubation wildtypischer bzw. mAbp1-defizienter DC mit OVA-Peptid erfolgte.

6 Diskussion

Während der Einleitung einer effektiven humoralen Immunantwort stellen die Endocytose, Prozessierung und Präsentation von Antigenen durch B-Lymphocyten wichtige Vorgänge dar. Diese Prozesse werden durch den BCR gesteuert. Ziel dieser Arbeit ist, die Bedeutung der Cytoskelett-assoziierten Adapterproteine mAbp1 und HS1 für die BCR-induzierte Signalweiterleitung zu untersuchen. Der BCR-Komplex kann nach Stimulation mit Antigenen sowohl an der Initiierung einer Signalkaskade ins Zellinnere beteiligt sein, als auch an Endocytose-Vorgängen teilnehmen, die für eine spätere Antigenpräsentation relevant sind. Die genaue räumliche und zeitliche Abfolge dieser Prozesse wird durch intrazelluläre Signaltransduktionsnetzwerke und der dynamischen Reorganisation des Cytoskeletts bestehend aus einer Vielzahl verschiedener Multiproteinkomplexe reguliert. Wichtige Bestandteile dieser Komplexe sind Adapterproteine, die Effektorproteine rekrutieren und in räumliche Nähe zu ihren Substraten bringen können. Zwei in Zellen hämatopoietischen Ursprungs exprimierte Adapter stellen die strukturell analogen Proteine mAbp1 und HS1 dar. Beide Proteine sind in BCR-initiierte Prozesse der Signaltransduktion in B-Lymphocyten involviert (Larbolette *et al.*, 1999; Yamanashi *et al.*, 1993). Im Fokus der Arbeit standen aufgrund dieser Befunde Studien zur BCR-vermittelten Ca^{2+} -Mobilisierung und B-Zell-Differenzierung in Abwesenheit von mAbp1, HS1- bzw. mAbp1/HS1, die zu zwei Kernaussagen führten (siehe unten: 1. bzw. 2.). Zudem wurde der Einfluss von mAbp1 auf die Antigenpräsentation in DC untersucht (Connert *et al.*, 2006; Onabajo *et al.*, 2008). Zwei weitere Aussagen konnten anhand der erhaltenen Daten getroffen werden (siehe unten: 3. bzw. 4.):

1. Die Adapterproteine mAbp1 und HS1 regulieren die BCR-induzierte Protein-Tyrosin-Phosphorylierung und Ca^{2+} -Mobilisierung.
2. Beide Proteine beeinflussen die Antigen-abhängige Zusammensetzung IgG-positiver Zell-Populationen.
3. Die Antigenaufnahme in DC ist in Abwesenheit von mAbp1 verlangsamt.
4. Das Adapterprotein mAbp1 wirkt negativ-regulatorisch auf die DC-vermittelte CD4^+ T-Zell-Aktivierung.

6.1 Funktion der Adapterproteine mAbp1 und HS1 in B-Lymphocyten

6.1.1 Funktionelle Relevanz der Interaktion von mAbp1 und HS1 in B-Lymphocyten

Muzio *et al.* konnten eine Interaktion von mAbp1 und HS1 erstmals in humanen B-Zellen nachweisen. Ein BCR-induzierter Verlauf der Bindung wurde nicht gezeigt (Muzio *et al.*,

2007). Ergänzend zu den Daten von Muzio *et al.* wurde im Rahmen dieser Arbeit die BCR-vermittelte Interaktion beider Moleküle in B-Lymphocyten der Maus mittels Koimmunpräzipitationen analysiert (siehe Abschnitt 5.1). Die Assoziation beider Proteine war sowohl vor als auch in leicht abgeschwächter Form nach BCR-Stimulation vorhanden. Die Daten weisen daher auf eine konstitutive Bindung beider Proteine während der BCR-initiierten Signalweiterleitung hin. Zusätzlich zu den zahlreichen funktionellen und strukturellen Ähnlichkeiten der Adapterproteine mAbp1 und HS1 (Chen *et al.*, 2001; Gomez *et al.*, 2006; Hao *et al.*, 2004; Hao *et al.*, 2005; Larbolette *et al.*, 1999; Le Bras *et al.*, 2004; Pinyol *et al.*, 2007; Yamanashi *et al.*, 1993; Yamanashi *et al.*, 1997; zur Übersicht: Daly, 2004; Weed und Parsons, 2001), deutet der Nachweis der Interaktion darauf hin, dass beide Proteine während der BCR-initiierten Signalweiterleitung bzw. der dynamischen Reorganisation des Cytoskeletts zur Ausübung ihrer Funktion einander benötigen. Eine direkte Interaktion von mAbp1 und HS1 könnte über die jeweilige SH3-Domäne mit potentiellen SH3-Domänen-Bindemotiven in mAbp1 (PxxP) und HS1 (PxxP, PxxxPR) erfolgen. Eine indirekte Bindung beider Proteine über Cytoskelett-assoziierte Proteine wie Aktin bzw. Clathrin kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden (Connert, 2003; Gomez *et al.*, 2006; Hao *et al.*, 2005; Kessels *et al.* 2000; Muzio *et al.*, 2007), so dass ergänzend Interaktionsstudien mit aufgereinigtem mAbp1 und HS1 nötig wären.

6.1.2 Bedeutung von mAbp1 und HS1 für die Antigen-unabhängige Entwicklung von B- und T-Lymphocyten

Die durchflusszytometrische Charakterisierung von B- bzw. T-Zell-Kompartimenten der Milz in HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten Mäusen zeigte keine Unterschiede in der Zusammensetzung von sowohl T1, T2 bzw. reifen B-Zellen als auch CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu wildtypischen Kontrollen. Daher scheinen mAbp1 und HS1 für die Antigen-unabhängige B- bzw. T-Zell-Entwicklung nicht notwendig zu sein. Diese Daten stehen im Einklang mit Analysen von Taniuchi *et al.*, die keine Auffälligkeiten bei der Analyse der Entwicklung lymphoider Zellen in HS1-defizienten Mäusen nachweisen konnten (Taniuchi *et al.*, 1995). Bestätigt werden diese Daten durch Untersuchungen an mAbp1-defizienten Mäusen, die keine B- bzw. T-Zell-Entwicklungsdefekte zeigten (Connert, 2003; Han *et al.*, 2005; Wienand, 2006). Obwohl mAbp1 und HS1 nach Antigenrezeptorstimulation Tyrosin-phosphoryliert werden (Han *et al.*, 2003; Larbolette *et al.*, 1999; Yamanashi *et al.*, 1993), und der Antigenrezeptor für die Entwicklung von

Lymphocyten entscheidende Funktionen übernimmt, ist ein Entwicklungsdefekt aufgrund der Abwesenheit von mAbp1 und HS1 nicht nachweisbar. Möglicherweise übernehmen mAbp1 bzw. HS1 nach Antigenrezeptor-Stimulation Funktionen, die erst in späten Aktivierungs- bzw. Differenzierungsstadien der Lymphocyten zum Tragen kommen.

6.1.3 Einfluss von mAbp1 und HS1 auf die BCR-initiierte Signalweiterleitung in primären B-Lymphocyten

Die Bedeutung der Interaktion von mAbp1 bzw. HS1 in der BCR-vermittelten Signalweiterleitung wurde durch Analysen der BCR-induzierten Protein-Tyrosin-Phosphorylierung in mAbp1-, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten B-Zellen untersucht. Diese Daten zeigen deutlich, dass die gesamte Protein-Tyrosin-Phosphorylierung nach BCR-Stimulation in mAbp1-, HS1- bzw. insbesondere in mAbp1/HS1-defizienten B-Zellen im Vergleich zur Kontrolle verstärkt war (siehe Abschnitt 5.5). Damit stellen die Daten aus den HS1-defizienten B-Lymphocyten eine Ergänzung der Studien von Taniuchi *et al.* dar, die in HS1-defizienten Milz-B-Zellen keine Unterschiede in der gesamten Protein-Tyrosin-Phosphorylierung feststellten (Taniuchi *et al.*, 1995).

Eine Komponente der proximalen BCR-induzierten Signalweiterleitung stellt Lyn dar. Lyn kann sowohl negativ als auch positiv-regulatorische Elemente der BCR-Signalweiterleitung aktivieren (zur Übersicht: Latour und Veillette, 2001; Sefton und Campbell, 1991). Ein negativ-regulatorisches Element, das durch Lyn Tyrosin-phosphoryliert wird, stellt die Inositol-Phosphatase SHIP dar (Phee *et al.*, 2000). SHIP reguliert durch seine katalytische Aktivität die Phosphoinositol-Zusammensetzung in der Plasmamembran. Proteine, wie PLC- γ 2 oder Btk, werden durch aktiviertes SHIP in ihrer Membranlokalisation destabilisiert. Daraus leitet sich eine verminderte IP3-Produktion und eine reduzierte Ca²⁺-Mobilisierung aus dem ER ab (Damen *et al.*, 1996; Hashimoto *et al.*, 1999; zur Übersicht: Engelke *et al.*, 2007, Rohrschneider *et al.*, 2000). In Abwesenheit von mAbp1, HS1 bzw. mAbp1/HS1 zeigte die detaillierte Analyse der Kinetik der SHIP- bzw. SLP-65-Tyrosin-Phosphorylierung in der ersten Minute nach BCR-Stimulation eine verstärkte SHIP-Aktivierung, die nach fünf Minuten wieder im Bereich der wildtypischen Kontrolle war. Dieser Zeitpunkt markierte gleichzeitig den Beginn der verlängerten SLP-65 Tyrosin-Phosphorylierung in mAbp1-, HS1-, bzw. mAbp1/HS1-defizienten B-Lymphocyten vergleichend zu wildtypischen Zellen (siehe Abschnitt 5.8). Auf Grundlage dieser Daten regeln sowohl mAbp1 als auch HS1 die Kinetik der Aktivierung von SHIP und SLP-65. SHIP interagiert mit mAbp1 über dessen SH3-Domäne in B-Zellen

(Larbolette, 2000). Zusätzlich konnte im Rahmen meiner Arbeit eine BCR-induzierte Interaktion von SHIP bzw. SLP-65 mit HS1 durch Koimmunpräzipitationen bzw. Affinitätsaufreinigungen nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 5.9). Möglicherweise regulieren mAbp1 bzw. HS1 durch die gemeinsame Interaktion mit SHIP dessen Lyn-abhängigen Aktivierungsstatus. Da auch mAbp1 bzw. HS1 zwei Substrate von Lyn darstellen und miteinander interagieren, wäre eine gemeinsame Lokalisation von Lyn, SHIP, mAbp1 bzw. HS1 an der Plasmamembran denkbar (Larbolette *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 1993; Yamanashi *et al.*, 1993). Auf der anderen Seite könnten durch Lyn indirekt positiv-regulatorische Elemente, wie SLP-65, aufgrund der mAbp1-, HS1- bzw. mAbp1/HS1-Defizienz mit einer veränderten Kinetik aktiviert werden.

In der aktuellen Forschung wird diskutiert, inwiefern die BCR-vermittelte Signalweiterleitung in definierten Membranbereichen initiiert wird (zur Übersicht: Engelke *et al.*, 2007). Erstens stellen PH-Domänen Bindemotive in Plasmamembran-ständigen Proteinen der BCR-Signalweiterleitung dar, die in der Plasmamembran weit verbreitete Phosphoinositole binden können (zur Übersicht: DiNitto und Lambright, 2006). Insbesondere in PLC- γ 2 und Btk dienen PH-Domänen zur Stabilisierung des Ca²⁺-Initiationskomplexes (Bolland *et al.*, 1998; Falasca *et al.*, 1998). Zweitens stellen *lipid rafts* einen definierten Membranbereich zur Initiierung BCR-proximaler Signale vorwiegend durch Lyn dar (zur Übersicht: Dykstra *et al.*, 2003; Simons und Toomre, 2000; Tsubata und Wienands, 2001). Für HS1 wurde beschrieben, dass die BCR-vermittelte HS1-Relokalisation in *lipid rafts* Syk-initiiert ist.

Aufgrund dieser Daten wäre es möglich, dass HS1 für die korrekte Lokalisation von SHIP speziell in *lipid rafts* verantwortlich ist. Eine HS1-Defizienz könnte zu einer verstärkten Aktivierung von SHIP in *lipid rafts* führen. Auch mAbp1, das ebenfalls mit SHIP interagiert, könnte eine Funktion bei der Lokalisation der Inositol-Phosphatase in *lipid rafts* übernehmen (Larbolette, 2000). Da mAbp1 von Lyn Tyrosin-phosphoryliert wird und mit HS1 interagiert, könnte in mAbp1- bzw. insbesondere in mAbp1/HS1-defizienten B-Zellen die mAbp1-abhängige Lokalisation von SHIP in *lipid rafts* ebenfalls gestört sein (Cheng *et al.*, 1999; Larbolette *et al.*, 1999; Petrie *et al.*, 2000). Diese Hypothese wird durch die Ca²⁺-Mobilisierungsdaten von mAbp1-, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten B-Zellen untermauert. Die räumliche Diskriminierung des Ca²⁺-Flux ließ eine Verminderung der Ca²⁺-Mobilisierung aus den Speichern des ER erkennen (siehe Abb. 5.1 bzw. Abschnitt 5.6).

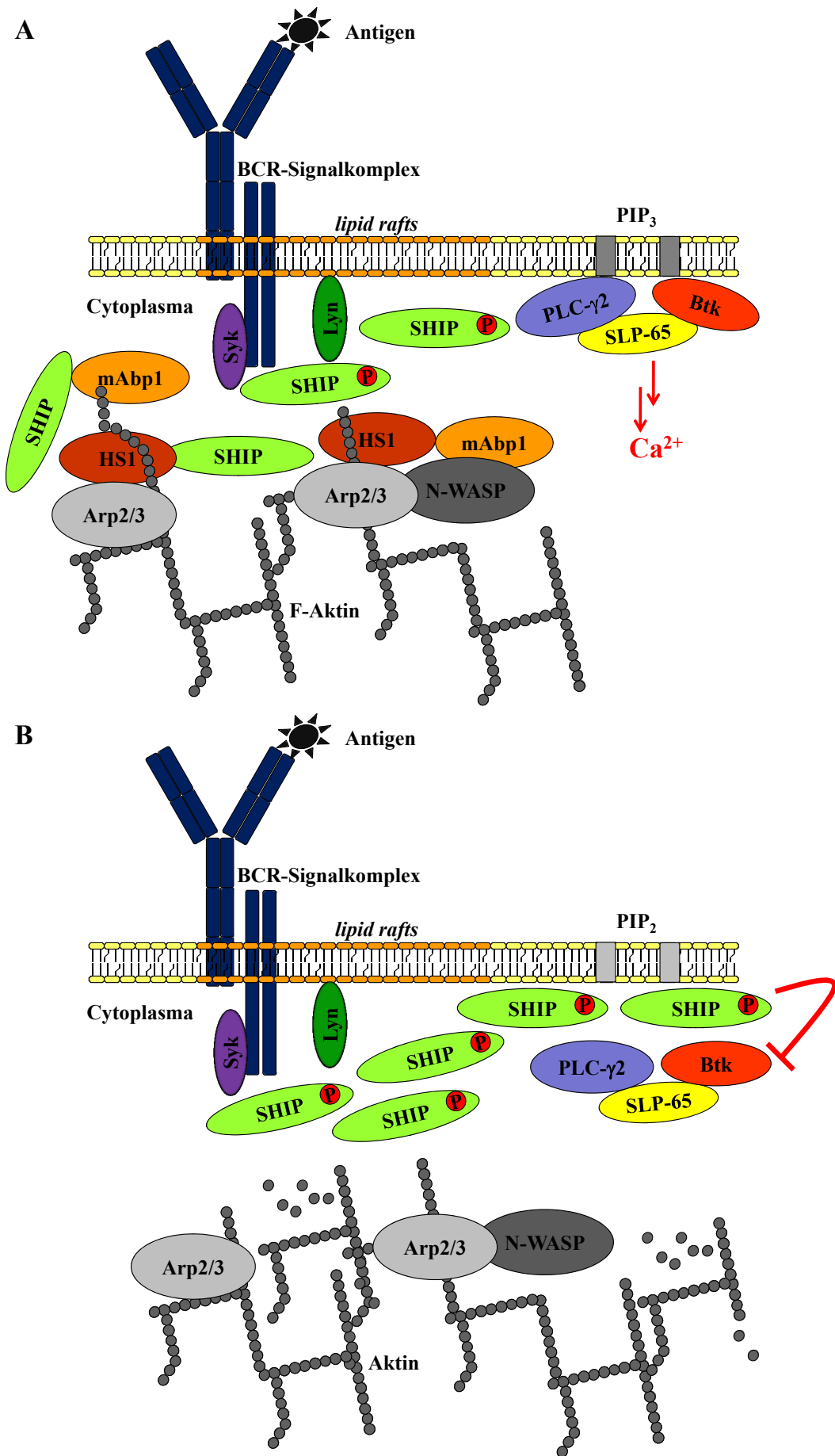


Abb. 6.1: Abbildungslegende siehe nächste Seite

Die Proteine mAbp1 bzw. HS1 beeinflussen die BCR-proximale Signalweiterleitung

(A) Die Adapter mAbp1 bzw. HS1 regulieren die Distribution und Tyrosin-Phosphorylierung (P) von SHIP durch Lyn nach BCR-Stimulation in *lipid rafts* bzw. an der Plasmamembran durch die gleichzeitige Interaktion mit Cytoskelett-assoziierten Proteinen. Dadurch wird der Ca^{2+} -Flux aus dem Speichern des ER gesteuert (rote Pfeile). (B) Eine mAbp1- bzw. HS1-Defizienz führt zur Deregulierung der Verteilung bzw. Tyrosin-Phosphorylierung von SHIP an der Plasmamembran. Dies kann eine Folge der defekten Ausbildung des kortikalen Aktin-Cytoskeletts darstellen. Eine verstärkte SHIP-Aktivierung inhibiert die Ca^{2+} -Mobilisierung aus dem ER.

Eine weitere Möglichkeit, wie mAbp1 bzw. HS1 BCR-initiierte Signale regulieren, könnte mit der Involvierung beider Proteine in die Reorganisation des Cytoskeletts erklärt werden. In Studien mit Aktin depolymerisierenden Substanzen wurde eine nach BCR-Stimulation verlängerte Ca^{2+} -Mobilisierung beobachtet (Hao und August, 2005), die mit einer verstärkten Protein-Tyrosin-Phosphorylierung korrelieren könnte. Sowohl mAbp1 als auch HS1 stellen gut charakterisierte Cytoskelett-assoziierte Proteine dar, die in dynamische Prozesse der Aktin-Cytoskelett-Reorganisation involviert sind (Connert *et al.*, 2006; Gomez *et al.*, 2006; Larbolette *et al.*, 1999; Kessels *et al.*, 2001; Muzio *et al.*, 2007; Onabajo *et al.*, 2008; Pinyol *et al.*, 2007). Eine Interaktion von mAbp1 mit N-WASP und die Assoziation von HS1 mit dem Arp2/3-Komplex bzw. F-Aktin wurde beschrieben (Hao *et al.*, 2005; Pinyol *et al.*, 2007; Uruno *et al.*, 2003; zur Übersicht: Machesky und Gould, 1999; Ramesh und Geha, 2009). Die Adapterproteine mAbp1 und HS1 könnten einerseits ihre Interaktion mit dem Cytoskelett für den Transport von positiv- als auch negativ-regulatorischen Proteinen der BCR-Signalweiterleitung, wie SLP-65 bzw. SHIP, aus dem Cytosol zum BCR-Signalkomplex und umgekehrt nutzen. Die Abwesenheit von mAbp1 bzw. HS1 würde zu einer fehlerhaften Distribution von Effektoren bei der Einleitung der BCR-initiierten Signalweiterleitung führen und ein verändertes Ca^{2+} -Signal hervorrufen. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass HS1 *in vitro* PIP_2 bindet (He *et al.*, 1998). So könnte HS1 während der BCR-Stimulation und katalytischen Spaltung von PIP_2 in IP_3 und DAG im Zusammenspiel mit dem Aktin-Cytoskelett für die Relokalisation von Effektorproteinen, wie z. B. SHIP, verantwortlich sein. Dieser Defekt würde zu einer deregulierten Ca^{2+} -Mobilisierung beitragen.

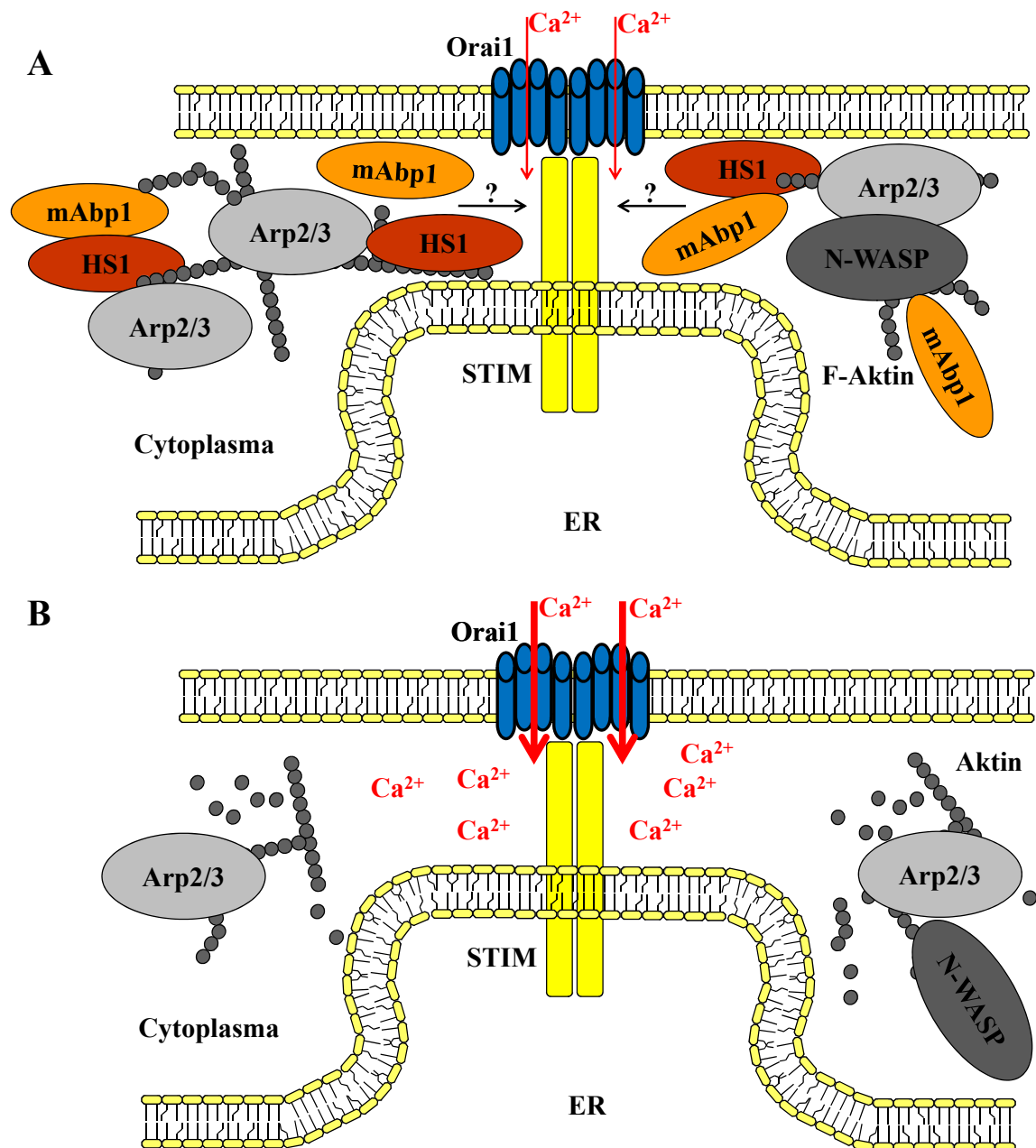


Abb. 6.2: mAbp1/HS1-regulierte ER-Plasmamembran-Konjugation während des STIM/Orai1-vermittelten Ca^{2+} -Flux

(A) Die Adapterproteine mAbp1 bzw. HS1 steuern über die Reorganisation des kortikalen F-Aktins die Assoziation von ER- bzw. Plasmamembran mittels der Cytoskelett-regulierenden Proteine Arp2/3 und N-WASP. Eine direkte Interaktion von Prolin-reichen Regionen in STIM/Orai1 mit den SH3-Domänen von mAbp1 bzw. HS1 ist während der Regulation dieses Prozesses möglich. (B) In Abwesenheit von mAbp1 bzw. HS1 ist die Dissoziation von STIM/Orai1 durch die deregulierte kortikale Cytoskelett-Maschinerie verlangsamt. Eine längere Assoziation der Ca^{2+} -regulierenden Proteine hat einen erhöhten Ca^{2+} -Flux zur Folge.

Eine Ursache für den verstärkten Einstrom von Ca^{2+} speziell aus dem extrazellulären Raum über die Plasmamembran könnte ebenfalls durch die fehlerhafte Organisation des Aktin-

Cytoskeletts bei der Abwesenheit von mAbp1 bzw. HS1 erklärt werden. Der Ca^{2+} -Flux über die Plasmamembran wird maßgeblich durch zwei Proteine gesteuert. Das im ER lokalisierte Transmembranprotein *stromal-interacting molecule* (STIM) besitzt eine Ca^{2+} -sensorische Domäne und interagiert nach Ca^{2+} -Depletion aus dem ER mit der Untereinheit des *calcium release-activated Ca^{2+} channel* (CRAC) Orai1 in der Plasmamembran (Feske *et al.*, 2006; Luik *et al.*, 2008; Prakriya *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2005). Beide Proteine regulieren den Ca^{2+} -Flux über die Plasmamembran (zur Übersicht: Barr *et al.*, 2009; Cahalan, 2009; Scharenberg *et al.*, 2007). Völlig ungeklärt ist jedoch, wie STIM und Orai1 in räumliche Nähe gebracht werden und komplexieren. Möglicherweise könnten Aktin-Cytoskelett-Reorganisationen zur Fusion und Neuordnung von ER und Plasmamembran beitragen. Eine direkte Interaktion der Cytoskelett-assoziierten Proteine mAbp1 bzw. HS1 mit sowohl STIM als auch Orai1 wäre über SH3-Domänen-Bindemotive (PxxP) in den beiden letztgenannten Proteinen möglich (Wissenbach *et al.*, 2007). Die Adapterproteine mAbp1 und HS1 könnten gleichzeitig die Reorganisation des Cytoskeletts steuern, so dass bei einer mAbp1/HS1-Defizienz ein veränderter Ca^{2+} -Flux aufgrund einer defekten ER-Plasmamembran-Fusion auftreten könnte. Möglicherweise bliebe die Interaktion von STIM und Orai1 länger intakt, da die Loslösung des ER von der Plasmamembran bei mAbp1-, HS1- bzw. mAbp1/HS1-Defizienz aufgrund des deregulierten kortikalen Aktin-Cytoskeletts mit einer verzögerten Kinetik vollzogen würde. Die Folge wäre eine verlängerte Ca^{2+} -Mobilisierung über die Plasmamembran (siehe Abb. 5.2).

Eine interessante Beobachtung konnte bei der Unterscheidung einzelner B-Zell-Subpopulationen bezüglich des Ca^{2+} -Signals in HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten Tieren dokumentiert werden. Tendenziell wiesen die Ca^{2+} -Signale in HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten T1, T2, MZ und reifen (R) B-Zellen ähnliche Unterschiede zum Ca^{2+} -Profil wildtypischer Zellen auf, wie dies bereits anhand der Ca^{2+} -Mobilisierung der Gesamtheit B220-positiver B-Zellen gezeigt werden konnte. Dies unterstreicht eine nahezu allgemein gültige Involvierung von mAbp1 bzw. HS1 in die BCR-induzierte Signalweiterleitung in den untersuchten B-Zell-Populationen.

In T2 bzw. MZ B-Zellen waren die Ca^{2+} -Mobilisierungsprofile von HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten Tieren bezogen auf den Ca^{2+} -Flux über die Plasmamembran ähnlich (siehe Abschnitt 5.6). Diese Besonderheit trat in ähnlicher Weise in Analysen im Rahmen der Arbeit von Dr. S. Wienand in mAbp1-defizienten T2 bzw. MZ B-Zellen auf, die im Vergleich zu wildtypischen Zellen eine vergleichbare Ca^{2+} -Mobilisierung über die

Plasmamembran zeigten (Wienand, 2006). Möglicherweise führen Expressionsunterschiede von mAbp1 in den betroffenen Zellen zu einer leicht veränderten Ca^{2+} -Antwort, wodurch eventuell die Differenzierung bzw. Funktion von T2 bzw. MZ B-Zellen beeinflusst wird.

Zusammenfassend zeigen meine Daten, dass mAbp1 bzw. HS1 die Effizienz BCR-induzierter Signale steuern. Beide Proteine könnten den wichtigen Regulator SHIP in die Nähe des BCR transportieren und durch eine Beteiligung an der Reorganisation des Cytoskeletts BCR-induzierte Signale regulieren.

6.2 Einfluss von mAbp1 und HS1 auf die Antigen-vermittelte Differenzierung IgG-positiver B-Zell-Populationen

Meine Analysen der B-Zell-Subpopulationen in Milzen HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienter Mäuse zeigten keine Hinweise, die eine Beteiligung von mAbp1 bzw. HS1 an der Antigen-unabhängigen Entwicklung von B-Zellen nahe legt. Eine veränderte Signalweiterleitung nach BCR-Stimulation in mAbp1-, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten B-Lymphocyten konnte allerdings nachgewiesen werden. Daher stellt sich die Frage, in welchem Zusammenhang diese Daten mit der Einleitung oder dem Aufrechterhalten der humoralen Immunantwort stehen?

Beobachtungen in HS1-defizienten Mäusen zeigten einen Defekt in der klonalen Expansion von B- und T-Lymphocyten in der Milz nach Antigenrezeptorstimulation. HS1-defiziente B-Zellen aus dem Peritoneum waren resistent gegen die Induktion BCR-vermittelter Apoptose (Taniuchi *et al.*, 1995). Varianten von WEHI-231 Zellen, in denen nach BCR-Stimulation keine Apoptose induziert wird, konnten durch die Expression von HS1 wieder für Apoptose-initiiierende Signale sensibilisiert werden (Fukuda *et al.*, 1995). Des Weiteren stellen sowohl mAbp1 als auch HS1 zwei direkte Substrate für die Caspase 3-vermittelte Spaltung dar (Chen *et al.*, 2001). Da die Apoptose ein wichtiger Prozess bei der Keimzentrumsreaktion darstellt (zur Übersicht: Guzman-Rojas *et al.*, 2002; Wolniak *et al.*, 2004), wurde im Rahmen meiner Arbeit ein Schwerpunkt auf die Analyse der Entstehung ausdifferenzierter B-Zellen, die durch somatische Hypermutation und Ig-Isotypwechsel selektioniert wurden, gelegt (zur Übersicht: McHeyzer-Williams *et al.*, 2001). Besonderes Augenmerk fiel auf eine IgG-positive B-Zell-Population, die durchflusszytometrisch als $\text{B220}^{\text{low/-}}/\text{CD19}^{\text{low/-}}$ charakterisiert wurde (siehe Abschnitt 5.12). Diese Population wurde mit Hilfe der mAbp1-defizienten Maus identifiziert. Der initiale Nachweis gelang mit diesen Tieren, da mAbp1-defiziente $\text{B220}^{\text{low/-}}/\text{CD19}^{\text{low/-}}$ -

Zellen eine fünffach erhöhte Expression von IgG im Vergleich zur wildtypischen Kontrolle aufwiesen. Dadurch wurde eine FACS-basierte Abgrenzung gegenüber anderen Zell- Populationen erst möglich. Die B220^{low/-}/CD19^{low/-}/IgG⁺-Population konnte des Weiteren in HS1-defizienten Tieren nachgewiesen werden. In mAbp1/HS1-defizienten Tieren gibt es diese B-Zell-Population nicht.

Eine Ursache für die unterschiedliche Expression von IgG in mAbp1-defizienten Zellen, könnte durch die Beteiligung von mAbp1 an der Antigenrezeptor-vermittelten Endocytose erklärt werden (Onabajo *et al.*, 2008). Eine verminderte Endocytose-Rate könnte zur Akkumulation von Antigenrezeptoren auf der Oberfläche der IgG-positiven, mAbp1-defizienten Population führen. Eine ähnliche Erklärung könnte auch für das Fehlen dieser Population in mAbp1/HS1-defizienten Milzzellen herangezogen werden. Da auch HS1 die Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts beeinflusst (Gomez *et al.*, 2006; Hao *et al.*, 2005; Uruno *et al.*, 2003), könnte durch eine veränderte Expression eine gegensätzliche Verschiebung der Population während der durchflusszytometrischen Analyse hervorgerufen werden, die in der FACS-Analyse zu einer Überlagerung mit anderen B-Zell-Populationen führt.

Die Involvierung von mAbp1 bzw. HS1 in der Regulation sowohl proliferativer als auch apoptotischer Vorgänge könnte eine Erklärung für die unterschiedliche Ausprägung der Population in mAbp1/HS1-defizienten Tieren im Vergleich zur wildtypischen Kontrolle liefern (Chen *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2005; Taniuchi *et al.*, 1995; Yamanashi *et al.*, 1997). Da Milz-B-Zellen HS1-defizienter Mäuse keine klonale Expansion nach BCR-Stimulation zeigten und auch die T-Zell-Proliferation in mAbp1-defizienten Tieren reduziert ist (Han *et al.*, 2005; Taniuchi *et al.*, 1995), könnten ähnliche Effekte auch in mAbp1/HS1-defizienten B-Zellen aus dem Knochenmark auftreten. Die Folge wäre möglicherweise das Fehlen der B220^{low/-}/CD19^{low/-}/IgG⁺-Population in mAbp1/HS1-defizienten Tieren durch eine defekte Proliferation dieser Zellen. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, zu untersuchen, ob möglicherweise eine gestörte Keimzentrumsreaktion in mAbp1/HS1-defizienten Tieren vorliegt.

Eine Erkrankung, die mit der Entwicklung autoreaktiver B-Zellen einhergeht, stellt die Autoimmunerkrankung SLE dar. B-Zellen SLE erkrankter Patienten besitzen einen Defekt der BCR-abhängigen Signalweiterleitung, die allgemein zur Ausprägung autoreaktiver B-Lymphocyten beiträgt (zur Übersicht: Renaudineau *et al.*, 2004). In B-Zellen einer SLE-Patientin konnte die Expression einer verkürzten Variante von HS1 nachgewiesen werden (Sawabe *et al.*, 2003). Außerdem wurde kürzlich die Anhäufung apoptotischer Zellen in

Keimzentren bei Patienten, die unter SLE leiden, gezeigt (Gaipl *et al.*, 2007). So könnte das Fehlen der B220^{low/-}/CD19^{low/-}/IgG⁺-Population in mAbp1/HS1-defizienten Milzzellen auf eine Akkumulation dieser Zellen in Keimzentren zurückzuführen sein.

Eine wichtige Frage, die bei der Analyse von B220^{low/-}/CD19^{low/-}/IgG⁺-Zellen aufgeworfen wird, ist die Klärung ihrer Funktion. Durch Blutanalysen von Mäusen, deren BCR aus einem V-Gen-Segment und einer leichten λ -Kette besteht, konnten mittels durchflusszytometrischer Methoden Zellen detektiert werden, die kein B220 bzw. CD19 auf ihrer Oberfläche exprimierten, dafür aber IgG-positiv waren (Cascalho *et al.*, 1996; Cascalho *et al.*, 2000). Die Sequenzierung der cDNA der schweren bzw. leichten λ -Ketten ergab viele Punktmutationen, zeigte jedoch keine V-Gen-Rekombination. Aufgrund dieser Daten wurde postuliert, dass es sich um eine Gedächtnis-B-Zellfraktion handeln könnte. Die in dieser Arbeit charakterisierte Population unterscheidet sich von der von Cascalho *et al.* entdeckten Population durch die auf einem Teil der Zellen vorhandene Expression von B220 bzw. CD19. Da die Zellen auch IgG exprimieren, könnte eine neue B-Zell-Gedächtnis-Fraktion erstmals durchflusszytometrisch charakterisiert worden sein. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Charakterisierung einer IgG-positiven, B220- und CD19-negativen B-Zell-Population durch Driver *et al.*, die 5-7 Tage nach der primären Immunisierung der Mäuse detektiert wurden (Driver *et al.*, 2001; McHeyzer-Williams *et al.*, 2000). Driver *et al.* postulierten aufgrund der zellulären Dynamik und der molekularen Attribute der B-Zellen, wie das Fehlen des Plasmazell-Markers CD138, Zellen mit B-Zell-Gedächtnis-Charakter beschrieben zu haben.

In dieser Arbeit konnte in ersten vergleichenden Analysen von wildtypischen und mAbp1-defizienten B220^{low/-}/CD19^{low/-}/IgG⁺-Populationen gezeigt werden, dass diese Zellen nach Hapten-Konjugat-Immunisierung der Tiere eine hohe Affinität zum immunisierenden Antigen aufwiesen (siehe Abschnitt 5.13). Neuste Daten, die aufgrund der noch ausstehenden statistischen Absicherung in diese Arbeit nicht implementiert wurden, zeigen, dass fünf Wochen nach der letzten Immunisierung eine hohe Affinität der Antigenrezeptoren zum verwendeten Antigen bestand. Diese Daten geben einen weiteren Hinweis darauf, dass die oben beschriebene B220^{low/-}/CD19^{low/-}/IgG⁺-Population Gedächtnis-B-Zellen darstellen. Aufgrund der Expression von B220 und CD19 auf Zellen der IgG⁺-Population erfolgt eine Abgrenzung gegenüber den von Bell und Gray beschriebenen B220- und CD19-negativen Zellen. Diese Zellen wiesen aufgrund ihrer Morphologie und Analyse der Oberflächenproteine einen monocytären Charakter auf und konnten über Fc γ R1 monomeres Serum-Ig binden. Der Zelltyp war im Knochenmark und

der Milz über sechs Monate nachweisbar (Bell und Gray, 2003). Die Daten von Bell und Gray zeigen, dass bei der vollständigen Abwesenheit B-Zell-spezifischer Marker mit der Klassifizierung IgG-positiver Zellen sorgfältig verfahren werden muss.

Interessanterweise zeigten immunisierte mAbp1-defiziente bzw. wildtypische Mäuse bei der Analyse der B220^{low/-}/CD19^{low/-}/IgG⁺-Populationen keine Unterschiede in der IgG-Oberflächenexpression. Möglicherweise wird die Stärke einer Immunreaktion übersetzt in eine unterschiedlich ausgeprägte Expression von Antigenrezeptoren auf Gedächtnis-B-Zellen. Da die B220^{low/-}/CD19^{low/-}/IgG⁺-Population kaum kostimulatorische Moleküle exprimiert, könnte mit der Steuerung der BCR-Oberflächenexpression eine probate Immunreaktion bei sekundärem Antigenkontakt erfolgen. Bei der experimentell sehr stark optimierten Immunisierungsreaktion der Mäuse im Rahmen meiner Arbeit könnten möglicherweise Unterschiede in der BCR-Expression in wildtypischen bzw. mAbp1-defizienten Tieren nicht mehr detektiert werden. Die Immunisierungsreaktion diene in erster Linie der Klärung einer Antigen-Spezifität der B220^{low/-}/CD19^{low/-}/IgG⁺-Populationen gegenüber einem Hapten-Protein-Konjugat. In unbehandelten, wildtypischen bzw. mAbp1-defizienten Tieren finden spontan auftretende Immunreaktionen auf physiologischem Niveau statt, die zu einer unterschiedlichen Antigenrezeptor-Expression führen könnten. Daten, die für diese Hypothese sprechen, wurden kürzlich durch Analysen mit früher Gedächtnis-B-Zellen gezeigt. Wang und Diamond konnten eine BCR-Revision bzw. Inhibierung nach Immunisierung von Mäusen mit löslichem Antigen nachweisen. Die Autoren postulierten, dass eine Antigen-Toleranz auch nach Aktivierung der B-Zelle zur Verhinderung der Entstehung möglicher autoreaktiver Zellen durch Regulierung der Antigenrezeptor-Expression denkbar wäre (Wang und Diamond, 2008).

6.3 Regulatorische Funktion von mAbp1 in DC

6.3.1 Beeinflussung der Aktivierung von DC durch mAbp1

DC gehören zur Gruppe der APC, zu denen auch B-Zellen und Makrophagen zählen und wurden in dieser Arbeit für Analysen der Antigenaufnahme, -prozessierung und -präsentation herangezogen (zur Übersicht: Knight und Stagg, 1993; Bryant und Ploegh, 2004). Die Differenzierung von DC aus Knochenmarkzellen von Mäusen mittels IL4- und GM-CSF-Stimulation war in mAbp1-defizienten Mäusen nicht verändert. Die Cytokinstimulation erfolgte über den IL4- bzw. GM-CSF-Rezeptor. Die Weiterleitung der Signale bei Assoziation des jeweiligen Cytokins mit seinem Rezeptor verläuft über den JAK/STAT-Signalweg (zur Übersicht: Chomarat und Banchereau, 1997; Geijsen *et al.*,

2001; Hershey, 2003), auf die mAbp1 keinen Einfluss hat. Durch die Stimulation unreifer DC mit LPS traten hingegen Unterschiede in der Expression des kostimulatorischen Proteins CD86 in mAbp1-defizienten DC im Vergleich zu wildtypischen DC auf. CD86 wurde als kostimulatorisches Molekül bei der Induktion der T-Zell-Proliferation identifiziert (Freeman *et al.*, 1993a; Freeman *et al.*; 1993b). Eine mögliche Erklärung für die oben beschriebenen Unterschiede könnten Erkenntnisse über die LPS-vermittelte Stimulation von DC über CD14 und TLR 4 liefern. Das im Plasma befindliche LPS-bindende Protein (LBP) bindet LPS, wodurch dieser Komplex mit dem Glykoprotein CD14 interagieren kann. In einem weiteren Schritt wird der LPS:LBP:CD14-Komplex mit TLR-4 ligiert (Rhee und Hwang, 2000; Takeuchi *et al.*, 1999; zur Übersicht: Beutler, 2000). Der CD14:TLR-4-Komplex liegt nach LPS-Stimulation in *lipid rafts* vor (Cuschieri *et al.*, 2006; Epelman *et al.*, 2008). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine LPS-vermittelte CD14-Internalisierung durch die Zerstörung von CCP inhibiert wird (Kitchens *et al.*, 1998). Da mAbp1 mit Clathrin interagiert (Connert, 2003; Wienand, 2006), könnte in Abwesenheit von mAbp1 erstens eine verminderte Internalisierungsrate des LPS:LBP:CD14-Komplexes durch ineffiziente Formierung von CCP und CCV die Folge sein, zweitens wäre eine verzögerte Assemblierung von TLR-4 mit dem CD14:LBP-Komplex denkbar. Eine effiziente Internalisierung des Komplexes würde nur erfolgen, wenn, ähnlich wie bei der BCR-Internalisierung, die dynamische Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts nicht gestört wäre und Clathrin assoziiert in *lipid rafts* vorliegen kann (Stoddart *et al.*, 2002; Yarar *et al.*, 2005). Beide Möglichkeiten hätten im Fall einer mAbp1-Defizienz eine verminderte Sensitivität gegenüber LPS und demnach eine reduzierte Expression von CD86 zur Folge.

6.3.2 Beeinflussung der Antigenaufnahme von DC durch mAbp1

Die Antigenaufnahme des Modellantigens OVA durch DC kann über Pinocytose oder die Einbeziehung von MR erfolgen (Burgdorf *et al.*, 2006; Burgdorf *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2002). Eine Involvierung von mAbp1 in Vorgänge der BCR-vermittelten Antigenaufnahme wurde parallel zu dieser Arbeit beschrieben (Onabajo *et al.*, 2008). Die Proteinstruktur von mAbp1, die hauptsächlich aus zwei unabhängigen Aktin-bindenden Domänen, einer SH3-Domäne und einer Prolin-reichen Domäne aufgebaut ist, erlaubt die Verknüpfung verschiedener zellulärer Mechanismen (Ensenat *et al.*, 1999; Kessels *et al.*, 2000; Larbolette *et al.*, 1999). So wurde gezeigt, dass mAbp1 einen Einfluss auf die konstitutive Rezeptor-vermittelte Aufnahme von Transferrin und dem synaptischen

Vesikel-Recycling hat (Connert *et al.*, 2006; Kessels *et al.*, 2001; Mise-Omata *et al.*, 2003). Des Weiteren interagiert mAbp1 mit wichtigen Molekülen des Endocytose-Mechanismus wie der GTPase Dynamin, N-WASP sowie Clathrin (Kessels *et al.*, 2001; Onabajo *et al.*, 2008; Pinyol *et al.*, 2007; Wienand, 2006). Da auch die Aufnahme von OVA durch DC von der Rezeptor-vermittelten Endocytose abhängig ist, könnte eine verlangsamte Internalisierung von OVA in Abwesenheit von mAbp1 auftreten (siehe Abb. 5.3).

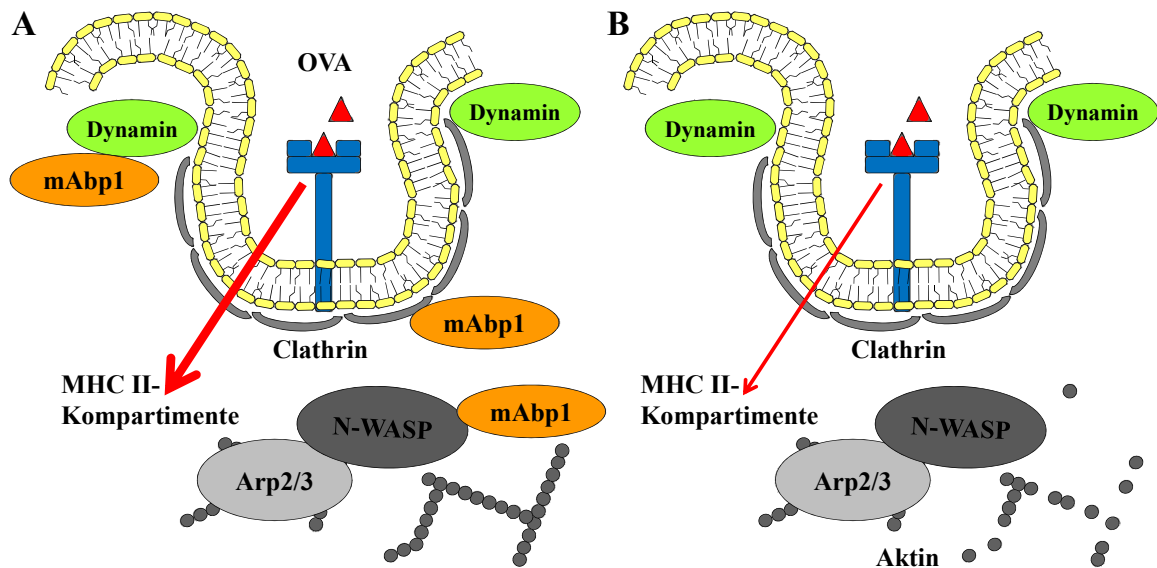


Abb. 6.3: Verringerte Rezeptor-vermittelte Endocytose in mAbp1-defizienten DC

(A) Das Adapterprotein mAbp1 steuert die Rezeptor-vermittelte Aufnahme löslichen Antigens (rotes Dreieck) durch die Interaktion mit den Endocytose-regulierenden Proteinen Dynamin und Clathrin bzw. mit den an der F-Aktin-Polymerisierung beteiligten Proteinen Arp2/3 und N-WASP. (B) Eine mAbp1-Defizienz führt bedingt durch eine deregulierte Cytoskelett-Reorganisation zu einer geringeren Endocytoserate (roter Pfeil) in MHC II-Kompartimente.

Auch die Pinocytose erfordert sowohl ein hohes Maß an Plasmamembran-Reorganisation als auch eine ausgeprägte Flexibilität des Aktin-Netzwerkes. An der Steuerung dieser Prozesse hat der Aktivierungsstatus der kleinen GTPasen Rac1, Rho und Cdc42 erheblichen Einfluss (Garrett *et al.*, 2000; zur Übersicht: Ellis und Mellor, 2000; Nobes und Marsh, 2000). So könnte mAbp1 über die Steuerung von Cdc42 an der Pinocytose von löslichem Antigen beteiligt sein (siehe Abb. 5.4). Eine Interaktion von mAbp1 mit dem GEF Fgd1, der spezifisch Cdc42 aktiviert, sowie eine Arp2/3-Komplex überlappende Kollokalisierung von mAbp1 in Verbindung mit einer Rac-vermittelten Aktivierung lassen diesen Schluss zu (siehe Abb. 5.4) (Hou *et al.*, 2003; Kessels *et al.*, 2000; zur Übersicht: Hall, 1998; Nobes und Marsh, 2000).

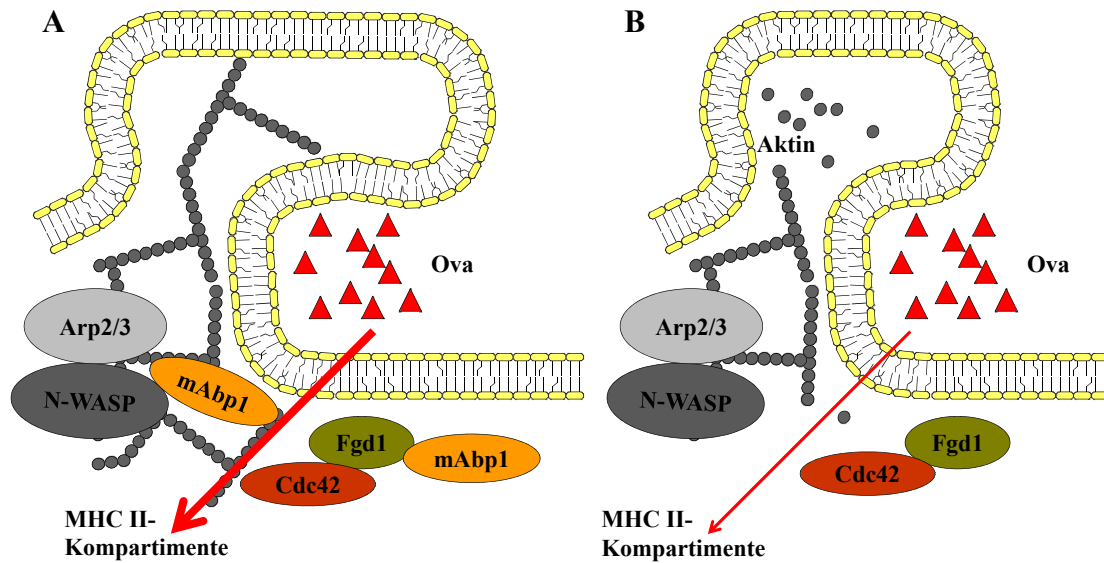


Abb. 6.4: Reduzierte Pinocytose von löslichem Antigen in mAbp1-defizienten DC

(A) Das Adapterprotein mAbp1 reguliert die Antigenaufnahme (OVA) durch Pinocytose über die Interaktion mit den Cytoskelett-regulierenden Proteinen Arp2/3, N-WASP bzw. Fgd1/Cdc42. Pinocytirtes OVA gelangt zur Prozessierung in MHC II-Kompartimente (roter Pfeil). (B) Eine deregulierte kortikale Aktin-Cytoskelett-Reorganisation infolge der mAbp1-Defizienz führt zu einer verringerten Aufnahme von OVA durch Pinocytose in MHC II-Kompartimente. Eine effiziente Ausbildung von Membranausstülpungen während der Pinocytose ist in Abwesenheit von mAbp1 defekt.

6.3.3 Regulation der Aktivierung von CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen durch dendritische Zellen in Abhängigkeit von mAbp1

Auf Grundlage der beobachteten verringerten Expression von CD86 und einer reduzierten Endozytoserate von OVA in mAbp1-defizienten DC könnte eine verringerte T-Zell-Aktivierungsrate durch mAbp1-defiziente DC vermutet werden. Überraschenderweise wurde im Gegensatz dazu eine dramatisch verstärkte MHC II:OVA-Peptid-vermittelte CD4⁺ T-Zell-Proliferation beobachtet. Eine extrazelluläre passive MHC II-Beladung mAbp1-defizienter DC mit OVA-Peptiden zeigte im Vergleich zur Kontrolle keine Unterschiede im Hinblick auf CD4⁺ T-Zell-stimulatorische Fähigkeiten. Die CD8⁺ T-Zell-Aktivierung durch Kreuzpräsentation von OVA-Peptiden durch MHC I:Peptid-Komplexe in mAbp1-defizienten Zellen blieb im Vergleich zu wildtypischen Zellen ebenfalls unbeeinflusst. Aus diesen Beobachtungen ergeben sich zwei Fragen. Erstens, welche Unterschiede in der Antigenprozessierung könnten zu einer im Gegensatz zur CD4⁺ T-Zell-Stimulation unveränderten CD8⁺-Aktivierung in mAbp1-defizienten DC im Vergleich zu wildtypischen Kontrollen führen? Zweitens, wie könnte es aufgrund geringerer kostimulatorischer Kompetenz und Antigenendozytoserate dennoch zu einer

verstärkten CD4⁺ T-Zell-Aktivierung kommen, obwohl die extrazelluläre Beladung mit OVA-Peptiden keine Unterschiede in der CD4⁺ T-Zell-Stimulation zwischen mAbp1-defizienten und wildtypischen DC aufwies?

Zur Klärung der ersten Frage muss zunächst berücksichtigt werden, dass der Weg der Kreuzpräsentation von MHC I:OVA-Peptid-Komplexen im Vergleich zur Beladung und zum Recycling von MHC II-Molekülen stark abweichend ist. Lösliches OVA, das über den MR internalisiert wird, gelangt in stabile, frühe endosomale Kompartimente (Burgdorf *et al.*, 2006; Burgdorf *et al.*, 2007). Diese Kompartimente haben keinen Zugang zum ER, in dem endogenes Antigen prozessiert und auf MHC I-Molekülen präsentiert wird. Aus diesen Kompartimenten wird der MHC I:OVA-Komplex an die Zelloberfläche rekrutiert (Burgdorf *et al.*, 2008). Der Weg kreuzpräsentierten Antigens vom extrazellulären Raum hin zu MHC I:Peptid-Komplexen auf der Oberfläche von DC ist im Verhältnis zur Antigenaufnahme, -prozessierung und -präsentation in MHC II:Peptid-Komplexen relativ kurz, und erfordert möglicherweise weniger Vesikeltransport und dynamische Cytoskelett-Reorganisation. Ein genauer molekularer Mechanismus der Kreuzpräsentation von exogenem Antigen in MHC I-Molekülen und eine damit verbundene Charakterisierung beteiligter cytoskeletaler Effektoren wurde bisher nicht beschrieben. Die Detektion von exogenem Antigen, das von MHC I:Peptid-Molekülen kreuzpräsentiert wird, kann bereits nach 30 min erfolgen (Kurotaki *et al.*, 2007). Die Menge an exogenem OVA, die für eine effiziente Induktion der Kreuzpräsentation benötigt wird, liegt im Nanogramm-Bereich, während durch die extrazelluläre Inkubation von DC mit SIINFEKL-Peptiden eine nahezu 100 %ige CD8⁺ T-Zell-Proliferation bereits im Picogramm-Bereich induziert werden konnte (siehe Abschnitt 5.15). Möglicherweise werden Endocytose- bzw. Prozessierungsdefekte in mAbp1-defizienten DC durch die äußerst effiziente Induktion der CD8⁺ T-Zell-Proliferation durch wenige MHC I:Peptid-Komplexe, die durch Kreuzpräsentation hervorgegangen sind, überlagert.

Um auf die Frage des vermeintlichen Widerspruchs zwischen kostimulatorischer Kompetenz und Antigenendocytose auf der einen Seite und verstärkte CD4⁺ T-Zell-Aktivierung auf der andere Seite einzugehen, wären zwei Szenarien vorstellbar:

Erstens könnte ein Defekt in der Recycling-Kapazität beladener MHC II:Peptid-Komplexe in mAbp1-defizienten DC vorliegen, wodurch T-Zellen durch die längere Verweildauer der Komplexe an der Plasmamembran effizienter stimuliert würden. Frühere Arbeiten lassen den Schluss zu, dass das Recycling von beladenen MHC II:Peptid-Komplexen in aktivierten DC über einen Clathrin-, AP-2- und Dynamin-unabhängigen Endocytoseweg

gesteuert wird. MHC II:Peptid-Komplexe werden auf reifen humanen DC über tubuläre Endosomen unter Involvierung der kleinen GTPase Arf6 internalisiert (Walseng *et al.*, 2008; zur Übersicht: Donaldson und Honda, 2005). Da klassische Clathrin-assoziierte Proteine unbeteiligt sind, erscheint auch eine Involvierung von mAbp1 in diesem Prozess als fraglich. Eine Beteiligung an der korrekten Ausprägung tubulärer Endosomen ausgehend von lysosomalen MHC II-Kompartimenten hin zur Plasmamembran wäre aufgrund des Einflusses von mAbp1 auf dynamische Aktin-Cytoskelett-Umordnung und der Beteiligung am Vesikel-Recycling dennoch denkbar (Barois *et al.*, 2002; Boes *et al.*, 2002; Chow *et al.*, 2002; Connert *et al.*, 2006; Kessels *et al.*, 2001; Kleijmeer *et al.*, 2001). Zweitens könnten prozessierte Peptide in Abwesenheit von mAbp1 länger in Kompartimenten der MHC II-Beladung, die vornehmlich in Lysosomen oder späten Endosomen stattfindet, verweilen. Die Formierung neuer Lysosomen könnte in mAbp1-defizienten DC einer verlangsamten Kinetik unterliegen, so dass neu synthetisierte MHC:II-Komplexe länger Zugriff auf prozessiertes Antigen besäßen. Eine verlangsamte Kinetik des synaptisches Vesikel-Recycling in mAbp1-defizienten Neuronen untermauert diese Hypothese (Connert *et al.*, 2006). Auch eine inhibierte Lokalisation von MHC II-Molekülen in Lysosomen bzw. späte Endosomen in Abwesenheit von mAbp1 könnte postuliert werden. Die Folge wäre ebenfalls eine längere Exposition von MHC II:Peptid-Komplexen auf der Plasmamembran, was zu einer dramatisch verstärkten CD4⁺ T-Zell-Aktivierung führen könnte. Eine Beteiligung von mAbp1 an der Ausbildung von Aktin-Strukturen, die mit Golgi-Vesikel-Proteinen interagieren, wurde gezeigt (Fucini *et al.*, 2002), so dass diese Beobachtungen ebenfalls zur Postulierung eines möglichen Defekts in mAbp1-defizienten DC während des Vesikel-Transports ausgehend von lysosomalen Kompartimenten zur Plasmamembran herangezogen werden könnten.

Mit dem etablierten Modell der T-Zell-Stimulation durch aktivierte DC ließ sich erstmals eine direkte Auswirkung der mAbp1-Defizienz auf die Immunantwort beschreiben. Ergänzende Studien mit HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten DC zur Klärung redundanter Funktionen beider Proteine bezüglich der T-Zell-Aktivierung in Kombination mit Rekonstitutionsexperimenten sollten durchgeführt werden und würden zum Verständnis der Abläufe während der Antigenaufnahme bis zur T-Zell-Aktivierung beitragen.

7 Literatur

- Ackerman, A. L. und Cresswell, P. (2004). Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat Immunol* **5**(7): 678-684.
- Aderem, A. und Underhill, D. M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* **17**: 593-623.
- Ahmed, R. und Gray, D. (1996). Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* **272**(5258): 54-60.
- Albert, M. L., Jegathesan, M. und Darnell, R. B. (2001). Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8⁺ T cells. *Nat Immunol* **2**(11): 1010-1017.
- Allen, D., Cumano, A., Dildrop, R., Kocks, C., Rajewsky, K., Rajewsky, N., Roes, J., Sablitzky, F. und Siekevitz, M. (1987). Timing, genetic requirements and functional consequences of somatic hypermutation during B-cell development. *Immunol Rev* **96**: 5-22.
- Anderson, S. M., Tomayko, M. M., Ahuja, A., Haberman, A. M. und Shlomchik, M. J. (2007). New markers for murine memory B cells that define mutated and unmutated subsets. *J Exp Med* **204**(9): 2103-2114.
- Andreason, G. L. und Evans, G. A. (1988). Introduction and expression of DNA molecules in eukaryotic cells by electroporation. *Biotechniques* **6**(7): 650-660.
- Baba, T. W., Giroir, B. P. und Humphries, E. H. (1985). Cell lines derived from avian lymphomas exhibit two distinct phenotypes. *Virology* **144**(1): 139-151.
- Baba, T. W. und Humphries, E. H. (1984). Differential response to avian leukosis virus infection exhibited by two chicken lines. *Virology* **135**(1): 181-188.
- Baba, Y., Hashimoto, S., Matsushita, M., Watanabe, D., Kishimoto, T., Kurosaki, T. und Tsukada, S. (2001). BLNK mediates Syk-dependent Btk activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(5): 2582-2586.
- Barois, N., de Saint-Vis, B., Lebecque, S., Geuze, H. J. und Kleijmeer, M. J. (2002). MHC class II compartments in human dendritic cells undergo profound structural changes upon activation. *Traffic* **3**(12): 894-905.
- Barr, V. A., Bernot, K. M., Shaffer, M. H., Burkhardt, J. K. und Samelson, L. E. (2009). Formation of STIM and Orai complexes: puncta and distal caps. *Immunol Rev* **231**(1): 148-159.
- Baumann, G., Maier, D., Freuler, F., Tschopp, C., Baudisch, K. und Wienands, J. (1994). In vitro characterization of major ligands for Src homology 2 domains derived from protein tyrosine kinases, from the adaptor protein SHC and from GTPase-activating protein in Ramos B cells. *Eur J Immunol* **24**(8): 1799-1807.

- Bell, D., Young, J. W. und Banchereau, J. (1999). Dendritic cells. *Adv Immunol* **72**: 255-324.
- Bell, J. und Gray, D. (2003). Antigen-capturing cells can masquerade as memory B cells. *J Exp Med* **197**(10): 1233-1244.
- Belz, G. T., Behrens, G. M., Smith, C. M., Miller, J. F., Jones, C., Lejon, K., Fathman, C. G., Mueller, S. N., Shortman, K., Carbone, F. R. und Heath, W. R. (2002). The CD8alpha(+) dendritic cell is responsible for inducing peripheral self-tolerance to tissue-associated antigens. *J Exp Med* **196**(8): 1099-1104.
- Benaroch, P., Yilla, M., Raposo, G., Ito, K., Miwa, K., Geuze, H. J. und Ploegh, H. L. (1995). How MHC class II molecules reach the endocytic pathway. *EMBO J* **14**(1): 37-49.
- Berek, C., Berger, A. und Apel, M. (1991). Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell* **67**(6): 1121-1129.
- Beutler, B. (2000). Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr Opin Immunol* **12**(1): 20-26.
- Bevan, M. J. (1976). Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med* **143**(5): 1283-1288.
- Bevan, M. J. (1976). Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming. *J Immunol* **117**(6): 2233-2238.
- Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L. und Wiley, D. C. (1987). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* **329**(6139): 506-512.
- Boes, M., Cerny, J., Massol, R., Op den Brouw, M., Kirchhausen, T., Chen, J. und Ploegh, H. L. (2002). T-cell engagement of dendritic cells rapidly rearranges MHC class II transport. *Nature* **418**(6901): 983-988.
- Bolland, S., Pearse, R. N., Kurosaki, T. und Ravetch, J. V. (1998). SHIP modulates immune receptor responses by regulating membrane association of Btk. *Immunity* **8**(4): 509-516.
- Bonifaz, L. C., Bonnyay, D. P., Charalambous, A., Darguste, D. I., Fujii, S., Soares, H., Brimnes, M. K., Moltedo, B., Moran, T. M. und Steinman, R. M. (2004). In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med* **199**(6): 815-824.
- Bremnes, B., Madsen, T., Gedde-Dahl, M. und Bakke, O. (1994). An LI and ML motif in the cytoplasmic tail of the MHC-associated invariant chain mediate rapid internalization. *J Cell Sci* **107** (Pt 7): 2021-2032.
- Brossart, P. und Bevan, M. J. (1997). Presentation of exogenous protein antigens on major histocompatibility complex class I molecules by dendritic cells: pathway of presentation and regulation by cytokines. *Blood* **90**(4): 1594-1599.

- Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Strominger, J. L. und Wiley, D. C. (1993). Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* **364**(6432): 33-39.
- Brunati, A. M., Deana, R., Folda, A., Massimino, M. L., Marin, O., Ledro, S., Pinna, L. A. und Donella-Deana, A. (2005). Thrombin-induced tyrosine phosphorylation of HS1 in human platelets is sequentially catalyzed by Syk and Lyn tyrosine kinases and associated with the cellular migration of the protein. *J Biol Chem* **280**(22): 21029-21035.
- Brunati, A. M., Donella-Deana, A., James, P., Quadroni, M., Contri, A., Marin, O. und Pinna, L. A. (1999). Molecular features underlying the sequential phosphorylation of HS1 protein and its association with c-Fgr protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* **274**(11): 7557-7564.
- Bryant, P. und Ploegh, H. (2004). Class II MHC peptide loading by the professionals. *Curr Opin Immunol* **16**(1): 96-102.
- Bullock, W. W. und Rittenberg, M. B. (1970). In vitro-initiated secondary anti-hapten response. II. Increasing cell avidity for antigen. *J Exp Med* **132**(5): 926-940.
- Burgdorf, S., Kautz, A., Bohnert, V., Knolle, P. A. und Kurts, C. (2007). Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science* **316**(5824): 612-616.
- Burgdorf, S., Lukacs-Kornek, V. und Kurts, C. (2006). The mannose receptor mediates uptake of soluble but not of cell-associated antigen for cross-presentation. *J Immunol* **176**(11): 6770-6776.
- Burgdorf, S., Scholz, C., Kautz, A., Tampe, R. und Kurts, C. (2008). Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation. *Nat Immunol* **9**(5): 558-566.
- Burnet, F. M. (1959). The clonal selection theory of acquired immunity. Vanderbilt Univ. Press, Nashville, TN.
- Butler, B., Kastendieck, D. H. und Cooper, J. A. (2008). Differently phosphorylated forms of the cortactin homolog HS1 mediate distinct functions in natural killer cells. *Nat Immunol* **9**(8): 887-897.
- Cahalan, M. D. (2009). STIMulating store-operated Ca(2+) entry. *Nat Cell Biol* **11**(6): 669-677.
- Caldwell, R. B., Kierzek, A. M., Arakawa, H., Bezzubov, Y., Zaim, J., Fiedler, P., Kutter, S., Blagodatski, A., Kostovska, D., Koter, M., Plachy, J., Carninci, P., Hayashizaki, Y. und Buerstedde, J. M. (2005). Full-length cDNAs from chicken bursal lymphocytes to facilitate gene function analysis. *Genome Biol* **6**(1): R6.
- Cannon, J. L., Labno, C. M., Bosco, G., Seth, A., McGavin, M. H., Siminovitch, K. A., Rosen, M. K. und Burkhardt, J. K. (2001). Wasp recruitment to the T cell:APC contact site occurs independently of Cdc42 activation. *Immunity* **15**(2): 249-259.

- Cantor, H. und Boyse, E. A. (1975). Functional subclasses of T-lymphocytes bearing different Ly antigens. I. The generation of functionally distinct T-cell subclasses is a differentiative process independent of antigen. *J Exp Med* **141**(6): 1376-1389.
- Carbone, F. R. und Heath, W. R. (2003). The role of dendritic cell subsets in immunity to viruses. *Curr Opin Immunol* **15**(4): 416-420.
- Cascalho, M., Ma, A., Lee, S., Masat, L. und Wabl, M. (1996). A quasi-monoclonal mouse. *Science* **272**(5268): 1649-1652.
- Cascalho, M., Wong, J., Brown, J., Jack, H. M., Steinberg, C. und Wabl, M. (2000). A B220(-), CD19(-) population of B cells in the peripheral blood of quasimonoclonal mice. *Int Immunol* **12**(1): 29-35.
- Chan, A. C., Irving, B. A., Fraser, J. D. und Weiss, A. (1991). The zeta chain is associated with a tyrosine kinase and upon T-cell antigen receptor stimulation associates with ZAP-70, a 70-kDa tyrosine phosphoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(20): 9166-9170.
- Chappell, C. P. und Jacob, J. (2007). Germinal-center-derived B-cell memory. *Adv Exp Med Biol* **590**: 139-148.
- Chen, Y. R., Kori, R., John, B. und Tan, T. H. (2001). Caspase-mediated cleavage of actin-binding and SH3-domain-containing proteins cortactin, HS1, and HIP-55 during apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **288**(4): 981-989.
- Cheng, P. C., Dykstra, M. L., Mitchell, R. N. und Pierce, S. K. (1999). A role for lipid rafts in B cell antigen receptor signaling and antigen targeting. *J Exp Med* **190**(11): 1549-1560.
- Chiu, C. W., Dalton, M., Ishiai, M., Kurosaki, T. und Chan, A. C. (2002). BLNK: molecular scaffolding through 'cis'-mediated organization of signaling proteins. *EMBO J* **21**(23): 6461-6472.
- Chomarat, P. und Banchereau, J. (1997). An update on interleukin-4 and its receptor. *Eur Cytokine Netw* **8**(4): 333-344.
- Chow, A., Toomre, D., Garrett, W. und Mellman, I. (2002). Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane. *Nature* **418**(6901): 988-994.
- Clark, J. M. (1988). Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* **16**(20): 9677-9686.
- Conner, S. D. und Schmid, S. L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **422**(6927): 37-44.
- Connert, S. (2003). Biochemical and genetic analysis of the adaptor protein SH3P7: insights from a newly generated knockout mouse. Dissertation.

- Connert, S., Wienand, S., Thiel, C., Krikunova, M., Glyvuk, N., Tsytsyura, Y., Hilfiker-Kleiner, D., Bartsch, J. W., Klingauf, J. und Wienands, J. (2006). SH3P7/mAbp1 deficiency leads to tissue and behavioral abnormalities and impaired vesicle transport. *EMBO J* **25**(8): 1611-1622.
- Cuschieri, J., Billgren, J. und Maier, R. V. (2006). Phosphatidylcholine-specific phospholipase C (PC-PLC) is required for LPS-mediated macrophage activation through CD14. *J Leukoc Biol* **80**(2): 407-414.
- da Silva, A. J., Li, Z., de Vera, C., Canto, E., Findell, P. und Rudd, C. E. (1997). Cloning of a novel T-cell protein FYB that binds FYN and SH2-domain-containing leukocyte protein 76 and modulates interleukin 2 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(14): 7493-7498.
- Daly, R. J. (2004). Cortactin signalling and dynamic actin networks. *Biochem J* **382**(Pt 1): 13-25.
- Damen, J. E., Liu, L., Rosten, P., Humphries, R. K., Jefferson, A. B., Majerus, P. W. und Krystal, G. (1996). The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetrakisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(4): 1689-1693.
- Dasgupta, S., Navarrete, A. M., Bayry, J., Delignat, S., Wootla, B., Andre, S., Christophe, O., Nascimbeni, M., Jacquemin, M., Martinez-Pomares, L., Geijtenbeek, T. B., Moris, A., Saint-Remy, J. M., Kazatchkine, M. D., Kaveri, S. V. und Lacroix-Desmazes, S. (2007). A role for exposed mannose in presentation of human therapeutic self-proteins to CD4⁺ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(21): 8965-8970.
- Dausset, J. (1958). [Iso-leuko-antibodies.]. *Acta Haematol* **20**(1-4): 156-166.
- Dausset, J. (1981). The major histocompatibility complex in man. *Science* **213**(4515): 1469-1474.
- de Hostos, E. L., Bradtke, B., Lottspeich, F. und Gerisch, G. (1993). Coactosin, a 17 kDa F-actin binding protein from *Dictyostelium discoideum*. *Cell Motil Cytoskeleton* **26**(3): 181-191.
- Delamarre, L., Holcombe, H. und Mellman, I. (2003). Presentation of exogenous antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II molecules is differentially regulated during dendritic cell maturation. *J Exp Med* **198**(1): 111-122.
- Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I. und Trombetta, E. S. (2005). Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* **307**(5715): 1630-1634.
- DiNitto, J. P. und Lambright, D. G. (2006). Membrane and juxtamembrane targeting by PH and PTB domains. *Biochim Biophys Acta* **1761**(8): 850-867.
- Donaldson, J. G. und Honda, A. (2005). Localization and function of Arf family GTPases. *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 4): 639-642.

- Doyle, H. A., Yan, J., Liang, B. und Mamula, M. J. (2001). Lupus autoantigens: their origins, forms, and presentation. *Immunol Res* **24**(2): 131-147.
- Driessen, C., Lennon-Dumenil, A. M. und Ploegh, H. L. (2001). Individual cathepsins degrade immune complexes internalized by antigen-presenting cells via Fc γ receptors. *Eur J Immunol* **31**(5): 1592-1601.
- Driver, D. J., McHeyzer-Williams, L. J., Cool, M., Stetson, D. B. und McHeyzer-Williams, M. G. (2001). Development and maintenance of a B220- memory B cell compartment. *J Immunol* **167**(3): 1393-1405.
- Drubin, D. G., Miller, K. G. und Botstein, D. (1988). Yeast actin-binding proteins: evidence for a role in morphogenesis. *J Cell Biol* **107**(6 Pt 2): 2551-2561.
- Dugast, M., Toussaint, H., Dousset, C. und Benaroch, P. (2005). AP2 clathrin adaptor complex, but not AP1, controls the access of the major histocompatibility complex (MHC) class II to endosomes. *J Biol Chem* **280**(20): 19656-19664.
- Duncan, M. C., Cope, M. J., Goode, B. L., Wendland, B. und Drubin, D. G. (2001). Yeast Eps15-like endocytic protein, Pan1p, activates the Arp2/3 complex. *Nat Cell Biol* **3**(7): 687-690.
- Dykstra, M., Cherukuri, A., Sohn, H. W., Tzeng, S. J. und Pierce, S. K. (2003). Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling. *Annu Rev Immunol* **21**: 457-481.
- Elgueta, R., Benson, M. J., de Vries, V. C., Wasiuk, A., Guo, Y. und Noelle, R. J. (2009). Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev* **229**(1): 152-172.
- Ellis, S. und Mellor, H. (2000). Regulation of endocytic traffic by rho family GTPases. *Trends Cell Biol* **10**(3): 85-88.
- Engelke, M., Engels, N., Dittmann, K., Stork, B. und Wienands, J. (2007). Ca²⁺ signaling in antigen receptor-activated B lymphocytes. *Immunol Rev* **218**: 235-246.
- Ensenat, D., Yao, Z., Wang, X. S., Kori, R., Zhou, G., Lee, S. C. und Tan, T. H. (1999). A novel src homology 3 domain-containing adaptor protein, HIP-55, that interacts with hematopoietic progenitor kinase 1. *J Biol Chem* **274**(48): 33945-33950.
- Epelman, S., Berenger, B., Stack, D., Neely, G. G., Ma, L. L. und Mody, C. H. (2008). Microbial products activate monocytic cells through detergent-resistant membrane microdomains. *Am J Respir Cell Mol Biol* **39**(6): 657-665.
- Falasca, M., Logan, S. K., Lehto, V. P., Baccante, G., Lemmon, M. A. und Schlessinger, J. (1998). Activation of phospholipase C gamma by PI 3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting. *EMBO J* **17**(2): 414-422.
- Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G. und Rammensee, H. G. (1991). Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* **351**(6324): 290-296.

- Feng, S., Kasahara, C., Rickles, R. J. und Schreiber, S. L. (1995). Specific interactions outside the proline-rich core of two classes of Src homology 3 ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(26): 12408-12415.
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S. H., Tanasa, B., Hogan, P. G., Lewis, R. S., Daly, M. und Rao, A. (2006). A mutation in *Orai1* causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* **441**(7090): 179-185.
- Fischer, U., Michel, A. und Meese, E. U. (2005). Expression of the gene for hematopoietic cell specific protein is not restricted to cells of hematopoietic origin. *Int J Mol Med* **15**(4): 611-615.
- Flaswinkel, H. und Reth, M. (1992). Molecular cloning of the Ig-alpha subunit of the human B-cell antigen receptor complex. *Immunogenetics* **36**(4): 266-269.
- Fleaton, M. N., Contractor, N., Leon, F., Wetzel, J. D., Dermody, T. S. und Kelsall, B. L. (2004). Peyer's patch dendritic cells process viral antigen from apoptotic epithelial cells in the intestine of reovirus-infected mice. *J Exp Med* **200**(2): 235-245.
- Floyd, R. und Wray, S. (2007). Calcium transporters and signalling in smooth muscles. *Cell Calcium* **42**(4-5): 467-476.
- Fonteneau, J. F., Larsson, M. und Bhardwaj, N. (2002). Interactions between dead cells and dendritic cells in the induction of antiviral CTL responses. *Curr Opin Immunol* **14**(4): 471-477.
- Freeman, G. J., Borriello, F., Hodes, R. J., Reiser, H., Gribben, J. G., Ng, J. W., Kim, J., Goldberg, J. M., Hathcock, K., und Laszlo, G. (1993a). Murine B7-2, an alternative CTLA4 counter-receptor that costimulates T cell proliferation and interleukin 2 production. *J Exp Med* **178**(6): 2185-2192.
- Freeman, G. J., Gribben, J. G., Boussiotis, V. A., Ng, J. W., Restivo, V. A., Jr., Lombard, L. A., Gray, G. S. und Nadler, L. M. (1993b). Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science* **262**(5135): 909-911.
- Fremont, D. H., Hendrickson, W. A., Marrack, P. und Kappler, J. (1996). Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides. *Science* **272**(5264): 1001-1004.
- Fu, C., Turck, C. W., Kurosaki, T. und Chan, A. C. (1998). BLNK: a central linker protein in B cell activation. *Immunity* **9**(1): 93-103.
- Fucini, R. V., Chen, J. L., Sharma, C., Kessels, M. M. und Starnes, M. (2002). Golgi vesicle proteins are linked to the assembly of an actin complex defined by mAbp1. *Mol Biol Cell* **13**(2): 621-631.
- Fucini, R. V., Navarrete, A., Vadakkan, C., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. und Starnes, M. (2000). Activated ADP-ribosylation factor assembles distinct pools of actin on golgi membranes. *J Biol Chem* **275**(25): 18824-18829.

- Fukuda, T., Kitamura, D., Taniuchi, I., Maekawa, Y., Benhamou, L. E., Sarthou, P. und Watanabe, T. (1995). Restoration of surface IgM-mediated apoptosis in an anti-IgM-resistant variant of WEHI-231 lymphoma cells by HS1, a protein-tyrosine kinase substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(16): 7302-7306.
- Fusaki, N., Matsuda, S., Nishizumi, H., Umemori, H. und Yamamoto, T. (1996). Physical and functional interactions of protein tyrosine kinases, p59fyn and ZAP-70, in T cell signaling. *J Immunol* **156**(4): 1369-1377.
- Futterer, K., Wong, J., Grucza, R. A., Chan, A. C. und Waksman, G. (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): 523-537.
- Gaipl, U. S., Munoz, L. E., Grossmayer, G., Lauber, K., Franz, S., Sarter, K., Voll, R. E., Winkler, T., Kuhn, A., Kalden, J., Kern, P. und Herrmann, M. (2007). Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (SLE). *J Autoimmun* **28**(2-3): 114-121.
- Garrett, W. S., Chen, L. M., Kroschewski, R., Ebersold, M., Turley, S., Trombetta, S., Galan, J. E. und Mellman, I. (2000). Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42. *Cell* **102**(3): 325-334.
- Garside, P., Ingulli, E., Merica, R. R., Johnson, J. G., Noelle, R. J. und Jenkins, M. K. (1998). Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science* **281**(5373): 96-99.
- Geijsen, N., Koenderman, L. und Coffey, P. J. (2001). Specificity in cytokine signal transduction: lessons learned from the IL-3/IL-5/GM-CSF receptor family. *Cytokine Growth Factor Rev* **12**(1): 19-25.
- Goitsuka, R., Fujimura, Y., Mamada, H., Umeda, A., Morimura, T., Uetsuka, K., Doi, K., Tsuji, S. und Kitamura, D. (1998). BASH, a novel signaling molecule preferentially expressed in B cells of the bursa of Fabricius. *J Immunol* **161**(11): 5804-5808.
- Goley, E. D. und Welch, M. D. (2006). The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(10): 713-726.
- Gomez, T. S., McCarney, S. D., Carrizosa, E., Labno, C. M., Comiskey, E. O., Nolz, J. C., Zhu, P., Freedman, B. D., Clark, M. R., Rawlings, D. J., Billadeau, D. D. und Burkhardt, J. K. (2006). HS1 functions as an essential actin-regulatory adaptor protein at the immune synapse. *Immunity* **24**(6): 741-752.
- Good, K. L., Avery, D. T. und Tangye, S. G. (2009). Resting human memory B cells are intrinsically programmed for enhanced survival and responsiveness to diverse stimuli compared to naive B cells. *J Immunol* **182**(2): 890-901.
- Gorer, P. A. (1936). The detection of antigenic differences in mouse erythrocytes by the employment of immune sera. *Br. J. Exp. Path.* **17**(42-50).
- Grez, M., Akgun, E., Hilberg, F. und Ostertag, W. (1990). Embryonic stem cell virus, a recombinant murine retrovirus with expression in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(23): 9202-9206.

- Griffiths, E. K. und Penninger, J. M. (2002). Communication between the TCR and integrins: role of the molecular adapter ADAP/Fyb/Slap. *Curr Opin Immunol* **14**(3): 317-322.
- Guzman-Rojas, L., Sims-Mourtada, J. C., Rangel, R. und Martinez-Valdez, H. (2002). Life and death within germinal centres: a double-edged sword. *Immunology* **107**(2): 167-175.
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**(5350): 509-514.
- Han, J., Kori, R., Shui, J. W., Chen, Y. R., Yao, Z. und Tan, T. H. (2003). The SH3 domain-containing adaptor HIP-55 mediates c-Jun N-terminal kinase activation in T cell receptor signaling. *J Biol Chem* **278**(52): 52195-52202.
- Han, J., Shui, J. W., Zhang, X., Zheng, B., Han, S. und Tan, T. H. (2005). HIP-55 is important for T-cell proliferation, cytokine production, and immune responses. *Mol Cell Biol* **25**(16): 6869-6878.
- Hansen, T. H. und Bouvier, M. (2009). MHC class I antigen presentation: learning from viral evasion strategies. *Nat Rev Immunol* **9**(7): 503-513.
- Hao, J. J., Carey, G. B. und Zhan, X. (2004). Syk-mediated tyrosine phosphorylation is required for the association of hematopoietic lineage cell-specific protein 1 with lipid rafts and B cell antigen receptor signalosome complex. *J Biol Chem* **279**(32): 33413-33420.
- Hao, J. J., Zhu, J., Zhou, K., Smith, N. und Zhan, X. (2005). The coiled-coil domain is required for HS1 to bind to F-actin and activate Arp2/3 complex. *J Biol Chem* **280**(45): 37988-37994.
- Hashimoto, S., Iwamatsu, A., Ishiai, M., Okawa, K., Yamadori, T., Matsushita, M., Baba, Y., Kishimoto, T., Kurosaki, T. und Tsukada, S. (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): 2357-2364.
- Hata, D., Nakamura, T., Kawakami, T., Kawakami, Y., Herren, B. und Mayumi, M. (1994). Tyrosine phosphorylation of MB-1, B29, and HS1 proteins in human B cells following receptor crosslinking. *Immunol Lett* **40**(1): 65-71.
- Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M. und Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**(6832): 1099-1103.
- He, H., Watanabe, T., Zhan, X., Huang, C., Schuurings, E., Fukami, K., Takenawa, T., Kumar, C. C., Simpson, R. J. und Maruta, H. (1998). Role of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in Ras/Rac-induced disruption of the cortactin-actomyosin II complex and malignant transformation. *Mol Cell Biol* **18**(7): 3829-3837.

- He, L. Z., Crocker, A., Lee, J., Mendoza-Ramirez, J., Wang, X. T., Vitale, L. A., O'Neill, T., Petromilli, C., Zhang, H. F., Lopez, J., Rohrer, D., Keler, T. und Clynes, R. (2007). Antigenic targeting of the human mannose receptor induces tumor immunity. *J Immunol* **178**(10): 6259-6267.
- Hershey, G. K. (2003). IL-13 receptors and signaling pathways: an evolving web. *J Allergy Clin Immunol* **111**(4): 677-690; quiz 691.
- Hiltbold, E. M., Poloso, N. J. und Roche, P. A. (2003). MHC class II-peptide complexes and APC lipid rafts accumulate at the immunological synapse. *J Immunol* **170**(3): 1329-1338.
- Hinshaw, J. E. (2000). Dynamin and its role in membrane fission. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 483-519.
- Ho, F., Lortan, J. E., MacLennan, I. C. und Khan, M. (1986). Distinct short-lived and long-lived antibody-producing cell populations. *Eur J Immunol* **16**(10): 1297-1301.
- Hofmann, M. W., Honing, S., Rodionov, D., Dobberstein, B., von Figura, K. und Bakke, O. (1999). The leucine-based sorting motifs in the cytoplasmic domain of the invariant chain are recognized by the clathrin adaptors AP1 and AP2 and their medium chains. *J Biol Chem* **274**(51): 36153-36158.
- Hogquist, K. A., Jameson, S. C. und Bevan, M. J. (1995). Strong agonist ligands for the T cell receptor do not mediate positive selection of functional CD8⁺ T cells. *Immunity* **3**(1): 79-86.
- Hollowood, K. und Goodlad, J. R. (1998). Germinal centre cell kinetics. *J Pathol* **185**(3): 229-233.
- Honey, K., Nakagawa, T., Peters, C. und Rudensky, A. (2002). Cathepsin L regulates CD4⁺ T cell selection independently of its effect on invariant chain: a role in the generation of positively selecting peptide ligands. *J Exp Med* **195**(10): 1349-1358.
- Honey, K. und Rudensky, A. Y. (2003). Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nat Rev Immunol* **3**(6): 472-482.
- Honjo, T., Kinoshita, K. und Muramatsu, M. (2002). Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annu Rev Immunol* **20**: 165-196.
- Hostmann, A., Jacobi, A. M., Mei, H., Hiepe, F. und Dorner, T. (2008). Peripheral B cell abnormalities and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus* **17**(12): 1064-1069.
- Hou, P., Estrada, L., Kinley, A. W., Parsons, J. T., Vojtek, A. B. und Gorski, J. L. (2003). Fgd1, the Cdc42 GEF responsible for Faciogenital Dysplasia, directly interacts with cortactin and mAbp1 to modulate cell shape. *Hum Mol Genet* **12**(16): 1981-1993.
- Hsing, L. C. und Rudensky, A. Y. (2005). The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation. *Immunol Rev* **207**: 229-241.

- Huang, F. P., Platt, N., Wykes, M., Major, J. R., Powell, T. J., Jenkins, C. D. und MacPherson, G. G. (2000). A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J Exp Med* **191**(3): 435-444.
- Hutchcroft, J. E., Slavik, J. M., Lin, H., Watanabe, T. und Bierer, B. E. (1998). Uncoupling activation-dependent HS1 phosphorylation from nuclear factor of activated T cells transcriptional activation in Jurkat T cells: differential signaling through CD3 and the costimulatory receptors CD2 and CD28. *J Immunol* **161**(9): 4506-4512.
- Inaba, K., Turley, S., Yamaide, F., Iyoda, T., Mahnke, K., Inaba, M., Pack, M., Subklewe, M., Sauter, B., Sheff, D., Albert, M., Bhardwaj, N., Mellman, I. und Steinman, R. M. (1998). Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J Exp Med* **188**(11): 2163-2173.
- Ingle, E., Sarna, M. K., Beaumont, J. G., Tilbrook, P. A., Tsai, S., Takemoto, Y., Williams, J. H. und Klinken, S. P. (2000). HS1 interacts with Lyn and is critical for erythropoietin-induced differentiation of erythroid cells. *J Biol Chem* **275**(11): 7887-7893.
- Itano, A. A., McSorley, S. J., Reinhardt, R. L., Ehst, B. D., Ingulli, E., Rudensky, A. Y. und Jenkins, M. K. (2003). Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity* **19**(1): 47-57.
- Jacob, J., Kassir, R. und Kelsoe, G. (1991). In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations. *J Exp Med* **173**(5): 1165-1175.
- Jacob, J. und Kelsoe, G. (1992). In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. II. A common clonal origin for periarteriolar lymphoid sheath-associated foci and germinal centers. *J Exp Med* **176**(3): 679-687.
- Jacob, J., Kelsoe, G., Rajewsky, K. und Weiss, U. (1991). Intracлонаl generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* **354**(6352): 389-392.
- Janeway, C. A., Jr. (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* **13**(1): 11-16.
- Jensen, P. E. (2007). Recent advances in antigen processing and presentation. *Nat Immunol* **8**(10): 1041-1048.
- Jondal, M., Schirmbeck, R. und Reimann, J. (1996). MHC class I-restricted CTL responses to exogenous antigens. *Immunity* **5**(4): 295-302.
- Junt, T., Scandella, E. und Ludewig, B. (2008). Form follows function: lymphoid tissue microarchitecture in antimicrobial immune defence. *Nat Rev Immunol* **8**(10): 764-775.
- Katzmann, D. J., Babst, M. und Emr, S. D. (2001). Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* **106**(2): 145-155.

- Ke, Y. und Kapp, J. A. (1996). Exogenous antigens gain access to the major histocompatibility complex class I processing pathway in B cells by receptor-mediated uptake. *J Exp Med* **184**(3): 1179-1184.
- Kelsoe, G. (1995). The germinal center reaction. *Immunol Today* **16**(7): 324-326.
- Kessels, M. M., Engqvist-Goldstein, A. E. und Drubin, D. G. (2000). Association of mouse actin-binding protein 1 (mAbp1/SH3P7), an Src kinase target, with dynamic regions of the cortical actin cytoskeleton in response to Rac1 activation. *Mol Biol Cell* **11**(1): 393-412.
- Kessels, M. M., Engqvist-Goldstein, A. E., Drubin, D. G. und Qualmann, B. (2001). Mammalian Abp1, a signal-responsive F-actin-binding protein, links the actin cytoskeleton to endocytosis via the GTPase dynamin. *J Cell Biol* **153**(2): 351-366.
- Kimura, T., Sakamoto, H., Appella, E. und Siraganian, R. P. (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): 1471-1478.
- Kitamura, D., Kaneko, H., Miyagoe, Y., Ariyasu, T. und Watanabe, T. (1989). Isolation and characterization of a novel human gene expressed specifically in the cells of hematopoietic lineage. *Nucleic Acids Res* **17**(22): 9367-9379.
- Kitamura, D., Kaneko, H., Taniuchi, I., Akagi, K., Yamamura, K. und Watanabe, T. (1995). Molecular cloning and characterization of mouse HS1. *Biochem Biophys Res Commun* **208**(3): 1137-1146.
- Kitchens, R. L., Wang, P. und Munford, R. S. (1998). Bacterial lipopolysaccharide can enter monocytes via two CD14-dependent pathways. *J Immunol* **161**(10): 5534-5545.
- Kleijmeer, M., Ramm, G., Schuurhuis, D., Griffith, J., Rescigno, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Rudensky, A. Y., Ossendorp, F., Melief, C. J., Stoorvogel, W. und Geuze, H. J. (2001). Reorganization of multivesicular bodies regulates MHC class II antigen presentation by dendritic cells. *J Cell Biol* **155**(1): 53-63.
- Kleijmeer, M. J., Morkowski, S., Griffith, J. M., Rudensky, A. Y. und Geuze, H. J. (1997). Major histocompatibility complex class II compartments in human and mouse B lymphoblasts represent conventional endocytic compartments. *J Cell Biol* **139**(3): 639-649.
- Knight, S. C. und Stagg, A. J. (1993). Antigen-presenting cell types. *Curr Opin Immunol* **5**(3): 374-382.
- Koch, J. und Tampe, R. (2006). The macromolecular peptide-loading complex in MHC class I-dependent antigen presentation. *Cell Mol Life Sci* **63**(6): 653-662.
- Kodama, T., Freeman, M., Rohrer, L., Zabrecky, J., Matsudaira, P. und Krieger, M. (1990). Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature* **343**(6258): 531-535.

- Kodama, T., Reddy, P., Kishimoto, C. und Krieger, M. (1988). Purification and characterization of a bovine acetyl low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(23): 9238-9242.
- Krause, M., Sechi, A. S., Konradt, M., Monner, D., Gertler, F. B. und Wehland, J. (2000). Fyn-binding protein (Fyb)/SLP-76-associated protein (SLAP), Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) proteins and the Arp2/3 complex link T cell receptor (TCR) signaling to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* **149**(1): 181-194.
- Kurosaki, T. (2000). Functional dissection of BCR signaling pathways. *Curr Opin Immunol* **12**(3): 276-281.
- Kurosaki, T., Johnson, S. A., Pao, L., Sada, K., Yamamura, H. und Cambier, J. C. (1995). Role of the Syk autophosphorylation site and SH2 domains in B cell antigen receptor signaling. *J Exp Med* **182**(6): 1815-1823.
- Kurosaki, T., Takata, M., Yamanashi, Y., Inazu, T., Taniguchi, T., Yamamoto, T. und Yamamura, H. (1994). Syk activation by the Src-family tyrosine kinase in the B cell receptor signaling. *J Exp Med* **179**(5): 1725-1729.
- Kurosaki, T. und Tsukada, S. (2000). BLNK: connecting Syk and Btk to calcium signals. *Immunity* **12**(1): 1-5.
- Kurts, C., Heath, W. R., Carbone, F. R., Allison, J., Miller, J. F. und Kosaka, H. (1996). Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J Exp Med* **184**(3): 923-930.
- Kurts, C., Kosaka, H., Carbone, F. R., Miller, J. F. und Heath, W. R. (1997). Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J Exp Med* **186**(2): 239-245.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Landsteiner, K. (1921). Über heterogenetisches Antigen und Hapten. XV. Mitteilungen über Antigene. *Biochem. Zeitschr.* **119**: 294-306.
- Lanzavecchia, A. (1990). Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* **8**: 773-793.
- Lanzavecchia, A. und Bove, S. (1985). Specific B lymphocytes efficiently pick up, process and present antigen to T cells. *Behring Inst Mitt*(77): 82-87.
- Lanzavecchia, A. und Sallusto, F. (2009). Human B cell memory. *Curr Opin Immunol* **21**(3): 298-304.
- Larbolette, O. (2000). Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des Adapterproteins SH3P7. Dissertation.
- Larbolette, O., Wollscheid, B., Schweikert, J., Nielsen, P. J. und Wienands, J. (1999). SH3P7 is a cytoskeleton adapter protein and is coupled to signal transduction from lymphocyte antigen receptors. *Mol Cell Biol* **19**(2): 1539-1546.

- Latour, S. und Veillette, A. (2001). Proximal protein tyrosine kinases in immunoreceptor signaling. *Curr Opin Immunol* **13**(3): 299-306.
- Le Bouteiller, P. (1994). HLA class I chromosomal region, genes, and products: facts and questions. *Crit Rev Immunol* **14**(2): 89-129.
- Le Bras, S., Foucault, I., Foussat, A., Brignone, C., Acuto, O. und Deckert, M. (2004). Recruitment of the actin-binding protein HIP-55 to the immunological synapse regulates T cell receptor signaling and endocytosis. *J Biol Chem* **279**(15): 15550-15560.
- Le Clainche, C., Pauly, B. S., Zhang, C. X., Engqvist-Goldstein, A. E., Cunningham, K. und Drubin, D. G. (2007). A Hip1R-cortactin complex negatively regulates actin assembly associated with endocytosis. *EMBO J* **26**(5): 1199-1210.
- Lee, S. J., Evers, S., Roeder, D., Parlow, A. F., Risteli, J., Risteli, L., Lee, Y. C., Feizi, T., Langen, H. und Nussenzweig, M. C. (2002). Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis. *Science* **295**(5561): 1898-1901.
- Lehner, P. J. und Cresswell, P. (1996). Processing and delivery of peptides presented by MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol* **8**(1): 59-67.
- Leo, A., Wienands, J., Baier, G., Horejsi, V. und Schraven, B. (2002). Adapters in lymphocyte signaling. *J Clin Invest* **109**(3): 301-309.
- Liou, S. N., Kovacs, B., Dennis, G., Kammer, G. M. und Tsokos, G. C. (1996). B cells from patients with systemic lupus erythematosus display abnormal antigen receptor-mediated early signal transduction events. *J Clin Invest* **98**(11): 2549-2557.
- Liu, S. H., Marks, M. S. und Brodsky, F. M. (1998). A dominant-negative clathrin mutant differentially affects trafficking of molecules with distinct sorting motifs in the class II major histocompatibility complex (MHC) pathway. *J Cell Biol* **140**(5): 1023-1037.
- Loder, F., Mutschler, B., Ray, R. J., Paige, C. J., Sideras, P., Torres, R., Lamers, M. C. und Carsetti, R. (1999). B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J Exp Med* **190**(1): 75-89.
- Luik, R. M., Wang, B., Prakriya, M., Wu, M. M. und Lewis, R. S. (2008). Oligomerization of STIM1 couples ER calcium depletion to CRAC channel activation. *Nature* **454**(7203): 538-542.
- Lundberg, K. S., Shoemaker, D. D., Adams, M. W., Short, J. M., Sorge, J. A. und Mathur, E. J. (1991). High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* **108**(1): 1-6.
- Machesky, L. M. und Gould, K. L. (1999). The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer. *Curr Opin Cell Biol* **11**(1): 117-121.
- MacLennan, I. C. (2008). B cells: the follicular dimension of the marginal zone. *Immunol Cell Biol* **86**(3): 219-220.

- Madden, D. R. (1995). The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu Rev Immunol* **13**: 587-622.
- Madden, D. R., Gorga, J. C., Strominger, J. L. und Wiley, D. C. (1992). The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell* **70**(6): 1035-1048.
- Malissen, B., Price, M. P., Goverman, J. M., McMillan, M., White, J., Kappler, J., Marrack, P., Pierres, A., Pierres, M. und Hood, L. (1984). Gene transfer of H-2 class II genes: antigen presentation by mouse fibroblast and hamster B-cell lines. *Cell* **36**(2): 319-327.
- Manis, J. P., Tian, M. und Alt, F. W. (2002). Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol* **23**(1): 31-39.
- Matsuki, Y., Ohmura-Hoshino, M., Goto, E., Aoki, M., Mito-Yoshida, M., Uematsu, M., Hasegawa, T., Koseki, H., Ohara, O., Nakayama, M., Toyooka, K., Matsuoka, K., Hotta, H., Yamamoto, A. und Ishido, S. (2007). Novel regulation of MHC class II function in B cells. *EMBO J* **26**(3): 846-854.
- Mayer, B. J. und Eck, M. J. (1995). SH3 domains. Minding your p's and q's. *Curr Biol* **5**(4): 364-367.
- McHeyzer-Williams, L. J., Cool, M. und McHeyzer-Williams, M. G. (2000). Antigen-specific B cell memory: expression and replenishment of a novel b220(-) memory B cell compartment. *J Exp Med* **191**(7): 1149-1166.
- McHeyzer-Williams, L. J., Driver, D. J. und McHeyzer-Williams, M. G. (2001). Germinal center reaction. *Curr Opin Hematol* **8**(1): 52-59.
- McHeyzer-Williams, L. J. und McHeyzer-Williams, M. G. (2005). Antigen-specific memory B cell development. *Annu Rev Immunol* **23**: 487-513.
- McKean, D., Huppi, K., Bell, M., Staudt, L., Gerhard, W. und Weigert, M. (1984). Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(10): 3180-3184.
- McKenzie, E. J., Taylor, P. R., Stillion, R. J., Lucas, A. D., Harris, J., Gordon, S. und Martinez-Pomares, L. (2007). Mannose receptor expression and function define a new population of murine dendritic cells. *J Immunol* **178**(8): 4975-4983.
- Melchers, F. und Rolink, A. R. (2006). B cell tolerance--how to make it and how to break it. *Curr Top Microbiol Immunol* **305**: 1-23.
- Mellman, I. (1996). Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**: 575-625.
- Mellman, I., Turley, S. J. und Steinman, R. M. (1998). Antigen processing for amateurs and professionals. *Trends Cell Biol* **8**(6): 231-237.
- Miller, A. D. und Rosman, G. J. (1989). Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Biotechniques* **7**(9): 980-982, 984-986, 989-990.

- Mise-Omata, S., Montagne, B., Deckert, M., Wienands, J. und Acuto, O. (2003). Mammalian actin binding protein 1 is essential for endocytosis but not lamellipodia formation: functional analysis by RNA interference. *Biochem Biophys Res Commun* **301**(3): 704-710.
- Morita, S., Kojima, T. und Kitamura, T. (2000). Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* **7**(12): 1063-1066.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273.
- Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* **262**(4): 56-61, 64-55.
- Mullis, K. B. und Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350.
- Murphy, K. M., Heimberger, A. B. und Loh, D. Y. (1990). Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4⁺CD8⁺TCR^{lo} thymocytes in vivo. *Science* **250**(4988): 1720-1723.
- Muzio, M., Scielzo, C., Frenquelli, M., Bachi, A., De Palma, M., Alessio, M., Ghia, P. und Caligaris-Cappio, F. (2007). HS1 complexes with cytoskeleton adapters in normal and malignant chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia* **21**(9): 2067-2070.
- Nobes, C. und Marsh, M. (2000). Dendritic cells: new roles for Cdc42 and Rac in antigen uptake? *Curr Biol* **10**(20): R739-741.
- Noelle, R. J., Ledbetter, J. A. und Aruffo, A. (1992). CD40 and its ligand, an essential ligand-receptor pair for thymus-dependent B-cell activation. *Immunol Today* **13**(11): 431-433.
- Nolz, J. C., Gomez, T. S., Zhu, P., Li, S., Medeiros, R. B., Shimizu, Y., Burkhardt, J. K., Freedman, B. D. und Billadeau, D. D. (2006). The WAVE2 complex regulates actin cytoskeletal reorganization and CRAC-mediated calcium entry during T cell activation. *Curr Biol* **16**(1): 24-34.
- Norbury, C. C. (2006). Drinking a lot is good for dendritic cells. *Immunology* **117**(4): 443-451.
- Norbury, C. C., Chambers, B. J., Prescott, A. R., Ljunggren, H. G. und Watts, C. (1997). Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* **27**(1): 280-288.
- Norbury, C. C., Hewlett, L. J., Prescott, A. R., Shastri, N. und Watts, C. (1995). Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages. *Immunity* **3**(6): 783-791.
- Nunez, G., Hockenbery, D., McDonnell, T. J., Sorensen, C. M. und Korsmeyer, S. J. (1991). Bcl-2 maintains B cell memory. *Nature* **353**(6339): 71-73.

- Obukhanych, T. V. und Nussenzweig, M. C. (2006). T-independent type II immune responses generate memory B cells. *J Exp Med* **203**(2): 305-310.
- Ohmura-Hoshino, M., Goto, E., Matsuki, Y., Aoki, M., Mito, M., Uematsu, M., Hotta, H. und Ishido, S. (2006). A novel family of membrane-bound E3 ubiquitin ligases. *J Biochem* **140**(2): 147-154.
- Okada, H., Bolland, S., Hashimoto, A., Kurosaki, M., Kabuyama, Y., Iino, M., Ravetch, J. V. und Kurosaki, T. (1998). Role of the inositol phosphatase SHIP in B cell receptor-induced Ca²⁺ oscillatory response. *J Immunol* **161**(10): 5129-5132.
- Olazabal, I. M. und Machesky, L. M. (2001). Abp1p and cortactin, new hand-holds for actin. *J Cell Biol* **154**(4): 679-682.
- Onabajo, O. O., Seeley, M. K., Kale, A., Qualmann, B., Kessels, M., Han, J., Tan, T. H. und Song, W. (2008). Actin-binding protein 1 regulates B cell receptor-mediated antigen processing and presentation in response to B cell receptor activation. *J Immunol* **180**(10): 6685-6695.
- Ong, G. L., Goldenberg, D. M., Hansen, H. J. und Mattes, M. J. (1999). Cell surface expression and metabolism of major histocompatibility complex class II invariant chain (CD74) by diverse cell lines. *Immunology* **98**(2): 296-302.
- Opferman, J. T. (2008). Apoptosis in the development of the immune system. *Cell Death Differ* **15**(2): 234-242.
- Otsuka, J., Horiuchi, T., Yoshizawa, S., Tsukamoto, H., Sawabe, T., Kikuchi, Y., Himeji, D., Koyama, T., Mitoma, H., Watanabe, T. und Harada, M. (2004). Association of a four-amino acid residue insertion polymorphism of the HS1 gene with systemic lupus erythematosus: molecular and functional analysis. *Arthritis Rheum* **50**(3): 871-881.
- Patterson, R. L., Boehning, D. und Snyder, S. H. (2004). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors as signal integrators. *Annu Rev Biochem* **73**: 437-465.
- Payne, R., Tripp, M., Weigle, J., Bodmer, W. und Bodmer, J. (1964). A New Leukocyte Isoantigen System in Man. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **29**: 285-295.
- Peters, P. J., Raposo, G., Neefjes, J. J., Oorschot, V., Leijendekker, R. L., Geuze, H. J. und Ploegh, H. L. (1995). Major histocompatibility complex class II compartments in human B lymphoblastoid cells are distinct from early endosomes. *J Exp Med* **182**(2): 325-334.
- Peterson, E. J., Woods, M. L., Dmowski, S. A., Derimanov, G., Jordan, M. S., Wu, J. N., Myung, P. S., Liu, Q. H., Pribila, J. T., Freedman, B. D., Shimizu, Y. und Koretzky, G. A. (2001). Coupling of the TCR to integrin activation by Slap-130/Fyb. *Science* **293**(5538): 2263-2265.
- Petrie, R. J., Schnetkamp, P. P., Patel, K. D., Awasthi-Kalia, M. und Deans, J. P. (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): 1220-1227.

- Phee, H., Jacob, A. und Coggeshall, K. M. (2000). Enzymatic activity of the Src homology 2 domain-containing inositol phosphatase is regulated by a plasma membrane location. *J Biol Chem* **275**(25): 19090-19097.
- Pinyol, R., Haeckel, A., Ritter, A., Qualmann, B. und Kessels, M. M. (2007). Regulation of N-WASP and the Arp2/3 complex by Abp1 controls neuronal morphology. *PLoS One* **2**(5): e400.
- Piper, R. C. und Katzmann, D. J. (2007). Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**: 519-547.
- Poloso, N. J., Muntasell, A. und Roche, P. A. (2004). MHC class II molecules traffic into lipid rafts during intracellular transport. *J Immunol* **173**(7): 4539-4546.
- Potter, H. (1993). Application of electroporation in recombinant DNA technology. *Methods Enzymol* **217**: 461-478.
- Prakriya, M., Feske, S., Gwack, Y., Srikanth, S., Rao, A. und Hogan, P. G. (2006). Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature* **443**(7108): 230-233.
- Quintero-Monzon, O., Rodal, A. A., Strokopytov, B., Almo, S. C. und Goode, B. L. (2005). Structural and functional dissection of the Abp1 ADFH actin-binding domain reveals versatile in vivo adapter functions. *Mol Biol Cell* **16**(7): 3128-3139.
- Radbruch, A., Muehlinghaus, G., Luger, E. O., Inamine, A., Smith, K. G., Dorner, T. und Hiepe, F. (2006). Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol* **6**(10): 741-750.
- Rajewsky, K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* **381**(6585): 751-758.
- Ramesh, N. und Geha, R. (2009). Recent advances in the biology of WASP and WIP. *Immunol Res* **44**(1-3): 99-111.
- Rammensee, H. G. (1995). Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr Opin Immunol* **7**(1): 85-96.
- Ravichandran, K. S. (2003). Recruitment signals from apoptotic cells: invitation to a quiet meal. *Cell* **113**(7): 817-820.
- Reinherz, E. L., Kung, P. C., Goldstein, G. und Schlossman, S. F. (1979). Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(8): 4061-4065.
- Reis e Sousa, C., Stahl, P. D. und Austyn, J. M. (1993). Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J Exp Med* **178**(2): 509-519.
- Renaudineau, Y., Pers, J. O., Bendaoud, B., Jamin, C. und Youinou, P. (2004). Dysfunctional B cells in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* **3**(7-8): 516-523.

- Ressing, M. E., Sette, A., Brandt, R. M., Ruppert, J., Wentworth, P. A., Hartman, M., Oseroff, C., Grey, H. M., Melief, C. J. und Kast, W. M. (1995). Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A*0201-binding peptides. *J Immunol* **154**(11): 5934-5943.
- Reth, M. und Wienands, J. (1997). Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* **15**: 453-479.
- Rhee, S. H. und Hwang, D. (2000). Murine TOLL-like receptor 4 confers lipopolysaccharide responsiveness as determined by activation of NF kappa B and expression of the inducible cyclooxygenase. *J Biol Chem* **275**(44): 34035-34040.
- Robadey, C., Wallny, H. J. und Demotz, S. (1996). Cell type-specific processing of the I-E_d-restricted hen egg lysozyme determinant 107-116. *Eur J Immunol* **26**(7): 1656-1659.
- Robertson, J. M., Jensen, P. E. und Evavold, B. D. (2000). DO11.10 and OT-II T cells recognize a C-terminal ovalbumin 323-339 epitope. *J Immunol* **164**(9): 4706-4712.
- Roche, P. A., Marks, M. S. und Cresswell, P. (1991). Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature* **354**(6352): 392-394.
- Roche, P. A., Teletski, C. L., Stang, E., Bakke, O. und Long, E. O. (1993). Cell surface HLA-DR-invariant chain complexes are targeted to endosomes by rapid internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(18): 8581-8585.
- Rock, K. L., Gamble, S. und Rothstein, L. (1990). Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules. *Science* **249**(4971): 918-921.
- Rodionov, D. G. und Bakke, O. (1998). Medium chains of adaptor complexes AP-1 and AP-2 recognize leucine-based sorting signals from the invariant chain. *J Biol Chem* **273**(11): 6005-6008.
- Rodriguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P. und Amigorena, S. (1999). Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol* **1**(6): 362-368.
- Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T. und Kirschner, M. W. (1999). The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* **97**(2): 221-231.
- Rohrschneider, L. R., Fuller, J. F., Wolf, I., Liu, Y. und Lucas, D. M. (2000). Structure, function, and biology of SHIP proteins. *Genes Dev* **14**(5): 505-520.
- Romagnoli, P. und Germain, R. N. (1994). The CLIP region of invariant chain plays a critical role in regulating major histocompatibility complex class II folding, transport, and peptide occupancy. *J Exp Med* **180**(3): 1107-1113.
- Roosendaal, R., Mebius, R. E. und Kraal, G. (2008). The conduit system of the lymph node. *Int Immunol* **20**(12): 1483-1487.

- Rowley, R. B., Burkhardt, A. L., Chao, H. G., Matsueda, G. R. und Bolen, J. B. (1995). Syk protein-tyrosine kinase is regulated by tyrosine-phosphorylated Ig alpha/Ig beta immunoreceptor tyrosine activation motif binding and autophosphorylation. *J Biol Chem* **270**(19): 11590-11594.
- Rudensky, A., Preston-Hurlburt, P., Hong, S. C., Barlow, A. und Janeway, C. A., Jr. (1991). Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* **353**(6345): 622-627.
- Ruzzene, M., Brunati, A. M., Marin, O., Donella-Deana, A. und Pinna, L. A. (1996). SH2 domains mediate the sequential phosphorylation of HS1 protein by p72syk and Src-related protein tyrosine kinases. *Biochemistry* **35**(16): 5327-5332.
- Ruzzene, M., Brunati, A. M., Sarno, S., Donella-Deana, A. und Pinna, L. A. (1999). Hematopoietic lineage cell specific protein 1 associates with and down-regulates protein kinase CK2. *FEBS Lett* **461**(1-2): 32-36.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**(4839): 487-491.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. und Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**(4732): 1350-1354.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. und Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* **182**(2): 389-400.
- Samuels, A. L., Klinken, S. P. und Ingley, E. (2009). Liar, a novel Lyn-binding nuclear/cytoplasmic shuttling protein that influences erythropoietin-induced differentiation. *Blood* **113**(16): 3845-3856.
- Sanchez, M., Misulovin, Z., Burkhardt, A. L., Mahajan, S., Costa, T., Franke, R., Bolen, J. B. und Nussenzweig, M. (1993). Signal transduction by immunoglobulin is mediated through Ig alpha and Ig beta. *J Exp Med* **178**(3): 1049-1055.
- Sandoval, I. V. und Bakke, O. (1994). Targeting of membrane proteins to endosomes and lysosomes. *Trends Cell Biol* **4**(8): 292-297.
- Sandvig, K., Torgersen, M. L., Raa, H. A. und van Deurs, B. (2008). Clathrin-independent endocytosis: from nonexisting to an extreme degree of complexity. *Histochem Cell Biol* **129**(3): 267-276.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-5467.
- Sauvonnet, N., Dujancourt, A. und Dautry-Varsat, A. (2005). Cortactin and dynamin are required for the clathrin-independent endocytosis of gammac cytokine receptor. *J Cell Biol* **168**(1): 155-163.

- Sawabe, T., Horiuchi, T., Koga, R., Tsukamoto, H., Kojima, T., Harashima, S., Kikuchi, Y., Otsuka, J., Mitoma, H., Yoshizawa, S., Niho, Y. und Watanabe, T. (2003). Aberrant HS1 molecule in a patient with systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* **4**(2): 122-131.
- Scharenberg, A. M., Humphries, L. A. und Rawlings, D. J. (2007). Calcium signalling and cell-fate choice in B cells. *Nat Rev Immunol* **7**(10): 778-789.
- Schneider, S. C. und Sercarz, E. E. (1997). Antigen processing differences among APC. *Hum Immunol* **54**(2): 148-158.
- Schuuring, E., Verhoeven, E., Mooi, W. J. und Michalides, R. J. (1992). Identification and cloning of two overexpressed genes, U21B31/PRAD1 and EMS1, within the amplified chromosome 11q13 region in human carcinomas. *Oncogene* **7**(2): 355-361.
- Schymeinsky, J., Gerstl, R., Mannigel, I., Niedung, K., Frommhold, D., Panthel, K., Heesemann, J., Sixt, M., Quast, T., Kolanus, W., Mocsai, A., Wienands, J., Sperandio, M. und Walzog, B. (2009). A fundamental role of mAbp1 in neutrophils: impact on beta(2) integrin-mediated phagocytosis and adhesion in vivo. *Blood* **114**(19): 4209-4220.
- Scielzo, C., Ghia, P., Conti, A., Bachi, A., Guida, G., Geuna, M., Alessio, M. und Caligaris-Cappio, F. (2005). HS1 protein is differentially expressed in chronic lymphocytic leukemia patient subsets with good or poor prognoses. *J Clin Invest* **115**(6): 1644-1650.
- Sefton, B. M. und Campbell, M. A. (1991). The role of tyrosine protein phosphorylation in lymphocyte activation. *Annu Rev Cell Biol* **7**: 257-274.
- Shiku, H., Kisielow, P., Bean, M. A., Takahashi, T., Boyse, E. A., Oettgen, H. F. und Old, L. J. (1975). Expression of T-cell differentiation antigens on effector cells in cell-mediated cytotoxicity in vitro. Evidence for functional heterogeneity related to the surface phenotype of T cells. *J Exp Med* **141**(1): 227-241.
- Shin, J. S., Ebersold, M., Pypaert, M., Delamarre, L., Hartley, A. und Mellman, I. (2006). Surface expression of MHC class II in dendritic cells is controlled by regulated ubiquitination. *Nature* **444**(7115): 115-118.
- Shirao, T., Kojima, N., Kato, Y. und Obata, K. (1988). Molecular cloning of a cDNA for the developmentally regulated brain protein, drebrin. *Brain Res* **464**(1): 71-74.
- Sigal, L. J., Crotty, S., Andino, R. und Rock, K. L. (1999). Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature* **398**(6722): 77-80.
- Simons, K. und Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**(1): 31-39.
- Smith, K. G., Light, A., Nossal, G. J. und Tarlinton, D. M. (1997). The extent of affinity maturation differs between the memory and antibody-forming cell compartments in the primary immune response. *EMBO J* **16**(11): 2996-3006.

- Snell, G. D. (1948). Methods for the study of histocompatibility genes. *J Genet* **49**(2): 87-108.
- Somsel Rodman, J. und Wandinger-Ness, A. (2000). Rab GTPases coordinate endocytosis. *J Cell Sci* **113 Pt 2**: 183-192.
- Sparks, A. B., Hoffman, N. G., McConnell, S. J., Fowlkes, D. M. und Kay, B. K. (1996). Cloning of ligand targets: systematic isolation of SH3 domain-containing proteins. *Nat Biotechnol* **14**(6): 741-744.
- Sprent, J. und Tough, D. F. (1994). Lymphocyte life-span and memory. *Science* **265**(5177): 1395-1400.
- Steinman, R. M., Inaba, K., Turley, S., Pierre, P. und Mellman, I. (1999). Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies. *Hum Immunol* **60**(7): 562-567.
- Sterry, S. J., Kelly, J. M., Turner, S. J. und Carbone, F. R. (1995). T cell receptor V alpha bias can be determined by TCR-contact residues within an MHC-bound peptide. *Immunol Cell Biol* **73**(1): 89-94.
- Stockinger, B., Pessara, U., Lin, R. H., Habicht, J., Grez, M. und Koch, N. (1989). A role of Ia-associated invariant chains in antigen processing and presentation. *Cell* **56**(4): 683-689.
- Stoddart, A., Dykstra, M. L., Brown, B. K., Song, W., Pierce, S. K. und Brodsky, F. M. (2002). Lipid rafts unite signaling cascades with clathrin to regulate BCR internalization. *Immunity* **17**(4): 451-462.
- Strehler, E. E. und Treiman, M. (2004). Calcium pumps of plasma membrane and cell interior. *Curr Mol Med* **4**(3): 323-335.
- Taddie, J. A., Hurley, T. R., Hardwick, B. S. und Sefton, B. M. (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): 13529-13535.
- Takemoto, Y., Furuta, M., Li, X. K., Strong-Sparks, W. J. und Hashimoto, Y. (1995). LckBP1, a proline-rich protein expressed in haematopoietic lineage cells, directly associates with the SH3 domain of protein tyrosine kinase p56lck. *EMBO J* **14**(14): 3403-3414.
- Takemoto, Y., Furuta, M., Sato, M., Kubo, M. und Hashimoto, Y. (1999). Isolation and characterization of a novel HS1 SH3 domain binding protein, HS1BP3. *Int Immunol* **11**(12): 1957-1964.
- Takemoto, Y., Sato, M., Furuta, M. und Hashimoto, Y. (1996). Distinct binding patterns of HS1 to the Src SH2 and SH3 domains reflect possible mechanisms of recruitment and activation of downstream molecules. *Int Immunol* **8**(11): 1699-1705.
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K. und Akira, S. (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* **11**(4): 443-451.

- Tangye, S. G., Avery, D. T., Deenick, E. K. und Hodgkin, P. D. (2003). Intrinsic differences in the proliferation of naive and memory human B cells as a mechanism for enhanced secondary immune responses. *J Immunol* **170**(2): 686-694.
- Taniuchi, I., Kitamura, D., Maekawa, Y., Fukuda, T., Kishi, H. und Watanabe, T. (1995). Antigen-receptor induced clonal expansion and deletion of lymphocytes are impaired in mice lacking HS1 protein, a substrate of the antigen-receptor-coupled tyrosine kinases. *EMBO J* **14**(15): 3664-3678.
- Toyama, H., Okada, S., Hatano, M., Takahashi, Y., Takeda, N., Ichii, H., Takemori, T., Kuroda, Y. und Tokuhisa, T. (2002). Memory B cells without somatic hypermutation are generated from Bcl6-deficient B cells. *Immunity* **17**(3): 329-339.
- Traub, L. M. (2009). Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(9): 583-596.
- Tsubata, T. (2001). Molecular mechanisms for apoptosis induced by signaling through the B cell antigen receptor. *Int Rev Immunol* **20**(6): 791-803.
- Tsubata, T. und Wienands, J. (2001). B cell signaling. Introduction. *Int Rev Immunol* **20**(6): 675-678.
- Turner, M. und Billadeau, D. D. (2002). VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* **2**(7): 476-486.
- Urano, T., Liu, J., Zhang, P., Fan, Y., Egile, C., Li, R., Mueller, S. C. und Zhan, X. (2001). Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin. *Nat Cell Biol* **3**(3): 259-266.
- Urano, T., Zhang, P., Liu, J., Hao, J. J. und Zhan, X. (2003). Haematopoietic lineage cell-specific protein 1 (HS1) promotes actin-related protein (Arp) 2/3 complex-mediated actin polymerization. *Biochem J* **371**(Pt 2): 485-493.
- van Niel, G., Wubbolts, R., Ten Broeke, T., Buschow, S. I., Ossendorp, F. A., Melief, C. J., Raposo, G., van Balkom, B. W. und Stoorvogel, W. (2006). Dendritic cells regulate exposure of MHC class II at their plasma membrane by oligoubiquitination. *Immunity* **25**(6): 885-894.
- van Rood, J. J. und van Leeuwen, A. (1963). Leukocyte Grouping. A Method and Its Application. *J Clin Invest* **42**: 1382-1390.
- van Rossum, A. G., Schuurin-Scholtes, E., van Buuren-van Seggelen, V., Kluin, P. M. und Schuurin, E. (2005). Comparative genome analysis of cortactin and HS1: the significance of the F-actin binding repeat domain. *BMC Genomics* **6**(1): 15.
- Veale, M., Raab, M., Li, Z., da Silva, A. J., Kraeft, S. K., Weremowicz, S., Morton, C. C. und Rudd, C. E. (1999). Novel isoform of lymphoid adaptor FYN-T-binding protein (FYB-130) interacts with SLP-76 and up-regulates interleukin 2 production. *J Biol Chem* **274**(40): 28427-28435.
- Villadangos, J. A., Heath, W. R. und Carbone, F. R. (2007). Outside looking in: the inner workings of the cross-presentation pathway within dendritic cells. *Trends Immunol* **28**(2): 45-47.

- Vogt, A. B., Spindeldreher, S. und Kropshofer, H. (2002). Clustering of MHC-peptide complexes prior to their engagement in the immunological synapse: lipid raft and tetraspan microdomains. *Immunol Rev* **189**: 136-151.
- Walseng, E., Bakke, O. und Roche, P. A. (2008). Major histocompatibility complex class II-peptide complexes internalize using a clathrin- and dynamin-independent endocytosis pathway. *J Biol Chem* **283**(21): 14717-14727.
- Wang, Y. H. und Diamond, B. (2008). B cell receptor revision diminishes the autoreactive B cell response after antigen activation in mice. *J Clin Invest* **118**(8): 2896-2907.
- Warmerdam, P. A., Long, E. O. und Roche, P. A. (1996). Isoforms of the invariant chain regulate transport of MHC class II molecules to antigen processing compartments. *J Cell Biol* **133**(2): 281-291.
- Weber, K. und Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* **244**(16): 4406-4412.
- Weed, S. A., Karginov, A. V., Schafer, D. A., Weaver, A. M., Kinley, A. W., Cooper, J. A. und Parsons, J. T. (2000). Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex. *J Cell Biol* **151**(1): 29-40.
- Weed, S. A. und Parsons, J. T. (2001). Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly. *Oncogene* **20**(44): 6418-6434.
- West, M. A., Prescott, A. R., Eskelinen, E. L., Ridley, A. J. und Watts, C. (2000). Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation. *Curr Biol* **10**(14): 839-848.
- Weston, S. A. und Parish, C. R. (1990). New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy. *J Immunol Methods* **133**(1): 87-97.
- Wienand, S. (2006). Die mAbp1-defiziente Maus: ein Modellsystem für kardiale und neuronale Erkrankungen. Dissertation.
- Wienands, J. (2000). The B-cell antigen receptor: formation of signaling complexes and the function of adaptor proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* **245**(1): 53-76.
- Wienands, J., Schweikert, J., Wollscheid, B., Jumaa, H., Nielsen, P. J. und Reth, M. (1998). SLP-65: a new signaling component in B lymphocytes which requires expression of the antigen receptor for phosphorylation. *J Exp Med* **188**(4): 791-795.
- Wissenbach, U., Philipp, S. E., Gross, S. A., Cavalie, A. und Flockerzi, V. (2007). Primary structure, chromosomal localization and expression in immune cells of the murine ORAI and STIM genes. *Cell Calcium* **42**(4-5): 439-446.
- Wolniak, K. L., Shinall, S. M. und Waldschmidt, T. J. (2004). The germinal center response. *Crit Rev Immunol* **24**(1): 39-65.

- Wu, H. und Parsons, J. T. (1993). Cortactin, an 80/85-kilodalton pp60src substrate, is a filamentous actin-binding protein enriched in the cell cortex. *J Cell Biol* **120**(6): 1417-1426.
- Wu, W. J., Erickson, J. W., Lin, R. und Cerione, R. A. (2000). The gamma-subunit of the coatamer complex binds Cdc42 to mediate transformation. *Nature* **405**(6788): 800-804.
- Xu, W. und Stamnes, M. (2006). The actin-depolymerizing factor homology and charged/helical domains of drebrin and mAbp1 direct membrane binding and localization via distinct interactions with actin. *J Biol Chem* **281**(17): 11826-11833.
- Yamamoto, T., Yamanashi, Y. und Toyoshima, K. (1993). Association of Src-family kinase Lyn with B-cell antigen receptor. *Immunol Rev* **132**: 187-206.
- Yamanashi, Y., Fukuda, T., Nishizumi, H., Inazu, T., Higashi, K., Kitamura, D., Ishida, T., Yamamura, H., Watanabe, T. und Yamamoto, T. (1997). Role of tyrosine phosphorylation of HS1 in B cell antigen receptor-mediated apoptosis. *J Exp Med* **185**(7): 1387-1392.
- Yamanashi, Y., Okada, M., Semba, T., Yamori, T., Umemori, H., Tsunasawa, S., Toyoshima, K., Kitamura, D., Watanabe, T. und Yamamoto, T. (1993). Identification of HS1 protein as a major substrate of protein-tyrosine kinase(s) upon B-cell antigen receptor-mediated signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(8): 3631-3635.
- Yamazaki, H., Takahashi, H., Aoki, T. und Shirao, T. (2001). Molecular cloning and dendritic localization of rat SH3P7. *Eur J Neurosci* **14**(6): 998-1008.
- Yarar, D., Waterman-Storer, C. M. und Schmid, S. L. (2005). A dynamic actin cytoskeleton functions at multiple stages of clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell* **16**(2): 964-975.
- Yuan, M., Mogemark, L. und Fallman, M. (2005). Fyn binding protein, Fyb, interacts with mammalian actin binding protein, mAbp1. *FEBS Lett* **579**(11): 2339-2347.
- Zeng, R., Cannon, J. L., Abraham, R. T., Way, M., Billadeau, D. D., Bubeck-Wardenberg, J. und Burkhardt, J. K. (2003). SLP-76 coordinates Nck-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein recruitment with Vav-1/Cdc42-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein activation at the T cell-APC contact site. *J Immunol* **171**(3): 1360-1368.
- Zhang, S. L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J. A., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Stauderman, K. A. und Cahalan, M. D. (2005). STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane. *Nature* **437**(7060): 902-905.
- Zhong, G., Reis e Sousa, C. und Germain, R. N. (1997). Antigen-unspecific B cells and lymphoid dendritic cells both show extensive surface expression of processed antigen-major histocompatibility complex class II complexes after soluble protein exposure in vivo or in vitro. *J Exp Med* **186**(5): 673-682.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: Schematische Darstellung der MHC I- bzw. MHC II-Moleküle.....	7
Abb. 2.2: Schematische Darstellung des Adapterproteins mAbp1	12
Abb. 2.3: Schematische Darstellung des Adapterproteins HS1	16
Abb. 4.1: Schema zur Immunisierung von Mäusen	36
Abb. 4.2: Durchflusszytometrische Auswertung eines CFSE-basierten T-Zell-Proliferationstests.....	41
Abb. 5.1: Interaktion von mAbp1 und HS1 vor und nach BCR-Stimulation.....	57
Abb. 5.2: Kreuzungsschema zur Generierung mAbp1/HS1-defizienter Mäuse	58
Abb. 5.3: Gleiche Zusammensetzung des B-Zell-Kompartiments in wildtypischen, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten Milzen	59
Abb. 5.4: Ähnliche Verteilung von CD4 ⁺ bzw. CD8 ⁺ T-Zellen in wildtypischen, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten Milzen.....	61
Abb. 5.5: Verstärkte Protein-Tyrosin-Phosphorylierung nach BCR-Stimulation in mAbp1-, HS1-, mAbp1/HS1-defizienten B-Zellen	63
Abb. 5.6: Differentieller Verlauf der Ca ²⁺ -Mobilisierung aus dem ER und über die Plasmamembran in Abwesenheit von HS1 bzw. mAbp1/HS1	65
Abb. 5.7: Diametral verlaufendes Ca ²⁺ -Signal in HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten B-Zell-Subpopulationen.....	66
Abb. 5.8: Ca ²⁺ -Mobilisierung nach Hemmung von Ca ²⁺ -ATPasen in der Plasmamembran	68
Abb. 5.9: Ca ²⁺ -Mobilisierung nach ER-Depletion durch Thapsigargin	70
Abb. 5.10: Verstärkte anfängliche SHIP Tyrosin-Phosphorylierung in mAbp1-, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten B-Zellen	72
Abb. 5.11: Verstärkte späte SLP-65 Tyrosin-Phosphorylierung in mAbp1-, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten B-Lymphocyten	74
Abb. 5.12: Stimulationsabhängige Interaktion von HS1 mit SHIP in Ramos B-Zellen	76
Abb. 5.13: Die SH3-Domäne von HS1 interagiert mit SHIP	77
Abb. 5.14: Stimulationsabhängige Interaktion von HS1 mit Cit-SLP-65 in Ramos B-Zellen	79
Abb. 5.15: Die SH2-Domäne von SLP-65 interagiert mit HS1	80
Abb. 5.16: Generierung chAbp1-defizienter DT40-Zellen	82
Abb. 5.17: Erhöhter Ca ²⁺ -Flux in <i>chabp1</i> ^{-/-} DT40 Zellen	84

Abb. 5.18: Unterschiede in der Zusammensetzung IgG-positiver Populationen in mAbp1-, HS1- bzw. mAbp1/HS1-defizienten Mäusen	85
Abb. 5.19: B220 ^{low/-} /CD19 ^{low/-} /IgG ⁺ -Knochenmarkzellen bilden eine Zell-Population	87
Abb. 5.20: Nachweis hochaffiner, NIP-spezifischer BCR auf B220 ^{low/-} /CD19 ^{low/-} /IgG ⁺ -Zell-Populationen.....	89
Abb. 5.21: Reduzierte Anzahl und Endocytoserate mAbp1-defizienter DC <i>ex vivo</i>	91
Abb. 5.22: Generierung von DC zur Verwendung in T-Zell-Proliferationstests	93
Abb. 5.23: Unveränderte CD8 ⁺ T-Zell-Proliferation durch mAbp1-defizienten DC <i>in vitro</i>	94
Abb. 5.24: Verstärkte CD4 ⁺ T-Zell-Proliferation durch mAbp1-defiziente DC <i>in vitro</i>	95
Abb. 6.1: Die Proteine mAbp1 bzw. HS1 beeinflussen die BCR-proximale Signalweiterleitung.....	101
Abb. 6.2: mAbp1/HS1-regulierte ER-Plasmamembran-Konjugation während des STIM/Orai1-vermittelten Ca ²⁺ -Flux	103
Abb. 6.3: Verringerte Rezeptor-vermittelte Endocytose in mAbp1-defizienten DC	110
Abb. 6.4: Reduzierte Pinocytose von löslichem Antigen in mAbp1-defizienten DC	111

8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 4.1.6.1: Verwendete Primär-Antikörper.....	28
Tab. 4.1.6.2: Sekundäre Antikörper	29
Tab. 4.1.10: Verwendete Oligonukleotide.....	31
Tab. 4.1.11.1: Vektoren.....	32
Tab. 4.1.11.2: cDNA-Konstrukte	32
Tab. 4.1.12: Bakterienstämme.....	33
Tab. 4.1: DNA-Polymerasen und Einsatzgebiet.....	51

8.3 Aminosäuresequenzen

mAbp1 aus der Maus

MAVNLSRNGPALQEAYVRVVTEKSPTDWALFTYEGNSNDIRVAGTGEGGL	50
EELVEELNSGKVMYAFCRVKDPNSGLPKFVLINWTGEGVNDVRKGACANH	100
VSTMANFLKGAHVTINARAEEDVEPECIMEKVAKASGANYSFHKESTSFO	150
DVGPQAPVGSVYQKTNAISEIKRVGKDNFWAKAEKEEENRRLEEKRAEE	200
ERQRLEEERRERELQEAARREQRYQEQRHSAGAPSRTGEPEQEAVSRTRQ	250
EWESAGQQAPHPREIFKQKERAMSTTSVTSSQPGKLRSPFLQKQLTQPET	300
SYGREPTAPVSRPAAGVCEEPA PSTLSSAQTEEEPTYEVPPEQDTLYEEP	350
PLVQQQGAGSEHIDNYMQSQGFSGQGLCARALYDYQAADDTEISFDPENL	400
ITGIEVIDEGWWRGYGPDGHFGMFPANYVELIE*	

HS1 aus der Maus

MWKSVVGHDSVSVETQGDDWDTPDFVNDISEKEQRWGAKTIEGSGRTE	50
HINIHQLRNKVSEEHDI LKKKELES GPKASHGYGGRFGVERDRMDKSAVG	100
HEYVADVEKHSSQTDAARGFGGKYGVERDRADKSAVGF DYKGEVEKHASQ	150
KDYSHGFGGRYGV EKDKRDKAALGYDYKGETEKHESQRDYAKGFGGQYGI	200
QKDRVDKSAVGFNEMEAPTTAYKKTTP IEAASSGARGLKAKFESLAE EKR	250
KREEEKAQQMARQQERKAVVKMSREVQQPSMPVEEPAAPAQLPKKISS	300
EVWPPAESHLPPESQPVR SRREYPVPSLPTRQSPLQNHLEDNEEPPALPP	350
RTPEGLQVVVEEPVYEAPELEPEPEPDYEPETEPDYEDVGELDRQDED	400
AEGDYEDVLEPEDTPSLSYQAGPSAGAGGAGISAIALYDYQGE GSDELSF	450
DPDDIITDIEMVDEGWWRGQCRGHFGLFPANYVKLL*	

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter unter ausschließlicher Nutzung der aufgeführten Materialien, Methoden und Literaturquellen an der Universität Bielefeld und an der Georg-August-Universität Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. J. Wienands angefertigt habe. Die Dissertation wurde in der gegenwärtigen oder einer anderen Fassung an keiner Fakultät oder Hochschule zur Begutachtung eingereicht.

Göttingen, den 01.03.2010

Alexander Hennemann