

# **Studien zur subzellulären Navigation von Signalmolekülen der $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort in aktivierten B-Lymphocyten**

Dissertation  
zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades

der Fakultät für Chemie  
der Universität Bielefeld

vorgelegt von  
**Ingo Goldbeck**

November 2007

## Danksagung

Bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Jürgen Wienands möchte ich mich für die Betreuung und Unterstützung in den vergangenen Jahren bedanken. Besonders seine stetige Diskussions- und Hilfsbereitschaft, das entgegengebrachte Vertrauen und die freundliche Arbeitsatmosphäre haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

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

Allen Freunden, aktuellen und ehemaligen Kollegen und Praktikanten in Göttingen und Bielefeld danke ich für die gute Zusammenarbeit und das tolle Arbeitsklima. Die vielen lustigen Momente im Laboralltag und darüber hinaus, sowie uighurische Weisheiten mit häufig unterschätztem Tiefgang werden mir in Erinnerung bleiben.

Mein besonderer Dank gilt Ines, Michael und Gökhan. Ihre praktische, theoretische und moralische Unterstützung hat entscheidenden Anteil an der Entstehung dieser Arbeit. Insbesondere bei Euch, Michael und Gökhan, möchte ich mich für die perfekte Zusammenarbeit, Eure vielen guten Ideen und die ständige Hilfsbereitschaft in jeglicher Hinsicht bedanken!

Der größte Dank gilt meiner Familie und Wiebke. Ihr habt mich immer unterstützt und mir Mut gemacht. Euch ist diese Arbeit gewidmet.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2003 bis August 2007 in der Abteilung Biochemie I der Fakultät für Chemie an der Universität Bielefeld und der Abteilung Zelluläre und Molekulare Immunologie der Universität Göttingen unter wissenschaftlicher Leitung von Prof. Dr. Jürgen Wienands angefertigt. Die Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (FOR 521) unterstützt.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

Stork, B.\* , Neumann, K.\* , Goldbeck, I.\* , Alers, S., Kahne, T., Naumann, M., Engelke, M., and Wienands, J. (2007). Subcellular localization of Grb2 by the adaptor protein Dok-3 restricts the intensity of Ca<sup>2+</sup> signaling in B cells. *Embo J* **26**, 1140-1149.

\*These authors contributed equally to this work

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

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b> .....	<b>2</b>
2.1 Struktur und Funktion des BCRs.....	3
2.2 Initiation der BCR-Signalleitung.....	5
2.3 Intrazelluläre Organisation der BCR-Signalleitung.....	6
2.4 Das Adapterprotein SLP-65 koordiniert BCR-Signalfunktionen.....	8
2.5 Organisation und Funktion des Ca <sup>2+</sup> -Initiationskomplexes.....	9
2.6 Subzelluläre Organisation Ca <sup>2+</sup> -Flux-regulierender Signalmodule.....	13
<b>3. Ziele der Arbeit</b> .....	<b>18</b>
<b>4. Material</b> .....	<b>19</b>
4.1 Materialien.....	19
4.2 Geräte.....	19
4.3 Software.....	20
4.4 Sonstige Materialien.....	20
4.5 Lösungen, Puffer und Medien.....	21
4.6 Enzyme.....	21
4.7 Antikörper.....	21
4.8 Vektoren.....	23
4.9 Oligonucleotide.....	24
4.10 cDNA-Konstrukte.....	27
4.11 Bakterienstämme.....	29
4.12 Zelllinien.....	30
<b>5. Methoden</b> .....	<b>31</b>
5.1 Molekularbiologische Methoden.....	31
5.1.1 Restriktionsspaltung von DNA.....	31
5.1.2 Agarose-Gelelektrophorese.....	31
5.1.3 DNA-Isolierung aus Agarose-Gelen.....	31

## 5. Methoden

5.1.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	32
5.1.5 5'-Dephosphorylierung von Vektor-DNA.....	32
5.1.6 Auffüllen 3'-rezessiver DNA-Enden.....	32
5.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten.....	32
5.1.8 Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien.....	33
5.1.9 Transformation kompetenter Bakterien.....	34
5.1.10 Isolierung von Plasmid-DNA.....	34
5.1.11 Langzeitaufbewahrung von Bakterienstämmen.....	35
5.1.12 RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen.....	35
5.1.13 Reverse Transkription.....	35
5.1.14 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	36
5.1.14.1 Zielgerichtete Mutagenese.....	37
5.1.14.2 <i>Megaprime</i> -PCR.....	37
5.1.15 T/A-Klonierung von PCR-Produkten.....	38
5.1.16 DNA-Sequenzierung.....	38
5.2 Zellbiologische Methoden.....	38
5.2.1 Kulturbedingungen.....	38
5.2.2 Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen.....	39
5.2.3 Transfektion von DT40-Zellen durch Elektroporation.....	39
5.2.4 Transfektion von DT40-Zellen mit rekombinanten Retroviren (STORK et al., 2004).....	39
5.2.4.1 Transfektion von Plat-E-Zellen mit FuGENE®.....	40
5.2.4.2 Retrovirale Infektion von DT40-Zellen.....	41
5.2.5 Expressionsanalyse von Fluorophorfusionsproteinen und Oberflächen-IgM am Durchflusscytometer (FACS).....	41
5.2.6 Ca <sup>2+</sup> -Fluxanalyse (STORK et al., 2004).....	41
5.2.7 Confocale <i>Laserscanning</i> -Mikroskopie (CLSM).....	43
5.3 Proteinbiochemische Methoden.....	44
5.3.1 BCR-Stimulation von DT40 B-Lymphocyten.....	44
5.3.2 Immunpräzipitation (IP).....	44
5.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	45
5.3.4 Western-Blotting.....	45

---

<b>5. Methoden</b>	
5.3.5 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	46
5.3.6 Lipidbindungsanalyse von GST-Fusionsproteinen mit <i>PIP Strips</i> <sup>TM</sup>	47
<b>6. Ergebnisse</b>	<b>49</b>
6.1 Morphologische Merkmale der DT40 B-Zelllinie	49
6.2 Subzelluläre Lokalisation von SLP-65	50
6.2.1 Fluorophormarkiertes SLP-65 rekonstituiert Signalfunktionen	51
6.2.2 SLP-65 unterliegt einer BCR-induzierten Plasmamembranrekrutierung in DT40 B-Lymphocyten	53
6.2.3 C-terminal fluorophormarkiertes SLP-65 ist Ca <sup>2+</sup> -kompetent und unterliegt einer BCR-induzierten Plasmamembranrekrutierung	55
6.3 Die Negativregulation der Ca <sup>2+</sup> -Mobilisierung durch Grb2 ist mit seiner Plasmamembranrekrutierung verbunden	59
6.4 Das Adapterprotein Dok-3 vermittelt die subzelluläre Organisation von Grb2	63
6.4.1 Tyrosinphosphoryliertes Dok-3 rekrutiert Grb2	64
6.4.2 Dok-3 ist ein Negativregulator der BCR-induzierten Ca <sup>2+</sup> -Mobilisierung	67
6.4.3 Dok-3 ist ein plasmamembranassoziiertes Adapterprotein	69
6.4.4 Plasmamembranlokalisierendes Dok-3 rekrutiert Grb2	74
6.4.5 Dok-3 unterliegt einer BCR-induzierten Oligomerisierung	75
6.4.6 Die C-terminale Grb2-SH3-Domäne und Dok-3 $\Delta$ YENI bilden eine funktionelle Chimäre	77
6.4.7 <i>Lipid raft-targeting</i> rekonstituiert die Funktion der Dok-3-PH-Domäne	81
<b>7. Diskussion</b>	<b>87</b>
7.1 SLP-65 wird BCR-induziert an die Plasmamembran rekrutiert	88
7.2 Dok-3 und Grb2 bilden ein Ca <sup>2+</sup> -inhibitorisches Signalmodul	94
<b>8. Literatur</b>	<b>102</b>

---

<b>9. Anhang</b> .....	<b>121</b>
9.1 Abbildungsverzeichnis.....	121
9.2 Tabellenverzeichnis.....	123
9.3 Aminosäuresequenzen von SLP-65, Grb2, Dok-3 und Fusionsproteinen.....	124



## I Abkürzungen

ALL	Akute Lymphoblastoide Leukämie
ALV	<i>avian leucosis virus</i>
AM	Acetoxymethylester
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BASH	<i>B cell adaptor containing an SH2 domain</i>
BCR	<i>B cell antigen receptor</i>
Blk	<i>B cell lymphoma kinase</i>
BLNK	<i>B cell linker protein</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
Btk	<i>Bruton's tyrosine kinase</i>
C2	<i>conserved 2 domain</i>
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre $Ca^{2+}$ -Konzentration
CCL	<i>cleared cellular lysate</i>
cDNA	<i>complementary DNA/copy DNA</i>
CDR	<i>complementarity deterring region</i>
CIP	<i>calf intestine phosphatase</i>
Cit	Citrin
Clnk	<i>cytokine-dependent hemopoietic linker</i>
CLSM	confocale <i>Laserscanning</i> -Mikroskopie
CS	<i>chicken serum</i>
Csk	<i>C-terminal Src kinase</i>
$\Delta$	Deletion
DAG	Diacylglycerin
ddH <sub>2</sub> O	doppelt deionisiertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
Dok	<i>downstream of tyrosine kinase</i>

---

DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECFP	<i>enhanced cyan fluorescent protein</i>
ECL	<i>enhanced chemical luminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
<i>env</i>	<i>envelope</i> ; Gen codierend für Glycoprotein160
ER	endoplasmatisches Reticulum
Erk	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorter</i>
Fc	<i>fragment crystalline</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
Fyn	<i>fgr/yes-related novel PTK</i>
Gads	<i>Grb2-related adaptor downstream of Shc</i>
<i>gag</i>	Gen codierend für p55 ( <i>core protein</i> )
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GEM	<i>glycophospholipid-enriched microdomain</i>
Grb2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
GRP	<i>guanine nucleotide releasing protein</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Hämagglutinin
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HPK1	<i>hematopoietic progenitor kinase 1</i>
HRPO	<i>horseradish peroxidase</i>
IB	Immunoblot
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation

---

IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP3-R	IP3-Rezeptor
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
LAT	<i>linker for activation of T cells</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
Lyn	<i>Ick/yes-related novel kinase</i>
LZ	<i>leucine zipper</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MHCII	<i>major histocompatibility complex II</i>
mlg	membranständiges Ig
MIST	<i>mast cell immunoreceptor signal transducer</i>
MMLV	<i>moloney murine leukemia virus</i>
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Nck	<i>non-catalytic region of tyrosine kinase</i>
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor for <math>\kappa</math> gene in B lymphocytes</i>
NP-40	Nonidet P40
NTAL	<i>non-T cell activation linker</i>
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PH	<i>pleckstrin homology domain</i>
PI3K	<i>phosphatidylinositol 3'-kinase</i>
PI(3,4)P2	<i>phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate</i>
PI(4,5)P2	<i>phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>
PI(3,4,5)P3	<i>phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate</i>
PKC	<i>protein kinase C</i>
PLC $\delta$ 1	<i>phospholipase C<math>\delta</math>1</i>

---

PLC $\gamma$ 1	<i>phospholipase Cy1</i>
PLC $\gamma$ 2	<i>phospholipase Cy2</i>
<i>pol</i>	Gen codierend für retrovirale Protease, Reverse Transkriptase und Integrase
pS	Phosphoserin
PTB	<i>phosphotyrosine binding domain</i>
PTK	<i>protein tyrosine kinase</i>
PTP	<i>protein tyrosine phosphatase</i>
PTP1B	<i>protein tyrosine phosphatase 1B</i>
pTyr	Phosphotyrosin
pY	Phosphotyrosin
Rho	<i>Ras homology</i>
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Reverse Transkription/Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i>
Shc	<i>SH2 domain-containing adaptor protein</i>
SH	<i>Src homology domain</i>
SHIP	<i>SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase</i>
SLP-65	<i>SH2 domain-containing leukocyte adaptor protein of 65 kDa</i>
SLP-76	<i>SH2 domain-containing leukocyte adaptor protein of 76 kDa</i>
SOC	<i>store-operated Ca<sup>2+</sup> channel</i>
SOS	<i>son of sevenless</i>
<i>src</i>	<i>rous sarcoma oncogene</i>
STIM1	<i>stromal interaction molecule 1</i>
Syk	<i>spleen tyrosine kinase</i>
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TCR	<i>T cell antigen receptor</i>
Tec	<i>Tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TH	<i>tec homology domain</i>
TIRAP	<i>TIR domain-containing adaptor protein</i>

T <sub>M</sub>	<i>melting temperature</i>
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett
Vav	<i>vav oncogene</i> /Adapterprotein mit GEF-Aktivität
VSV-G	<i>vesicular stomatitis virus glycoprotein</i>
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
wt	Wildtyp
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
Xid	X-gekoppelte Immundefizienz
XLA	X-gekoppelte Agammaglobulinämie

## II Aminosäuren

Aminosäure	Abkürzung	Ein-Buchstaben-Code
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 Nucleotide

Nucleotid	Abkürzung
Desoxyadenylat	A
Desoxycytidylat	C
Desoxyguanylat	G
Desoxythymidylat	T

### IV Einheiten und Präfixe

<b>k</b>	kilo	<b>min</b>	Minute	<b>V</b>	Volt
<b>c</b>	centi	<b>s</b>	Sekunde	<b>A</b>	Ampere
<b>m</b>	milli	<b>m</b>	Meter	<b>F</b>	Farad
<b>μ</b>	micro	<b>L</b>	Liter	<b>rpm</b>	<i>rounds per minute</i>
<b>n</b>	nano	<b>M</b>	molar	<b>g</b>	Erdbeschleunigung
<b>p</b>	pico	<b>g</b>	Gramm	<b>U</b>	<i>Unit/Enzymeinheit</i>
<b>t</b>	Zeit	<b>b</b>	Base	<b>Da</b>	Dalton
<b>h</b>	Stunde	<b>bp</b>	Basenpaar	<b>°C</b>	Grad Celsius

## 1. Zusammenfassung

Die intrazelluläre Prozessierung BCR-vermittelter Signale ist essentiell für die Entwicklung und Immunfunktionen von B-Lymphocyten. Ein zentrales Element der B-Zell-Signalleitung ist die BCR-induzierte Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Die molekulare Basis dieses Vorgangs ist die Bildung des als  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplex bezeichneten Signalosoms um das Adapterprotein SLP-65. Obgleich die Struktur des Signalmoduls und das funktionelle Zusammenspiel der Proteinkomponenten weitgehend charakterisiert sind, ist eine wesentliche Frage seiner Funktion unverstanden. Wie organisiert das cytosolische Adapterprotein SLP-65 als Kern des  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes die räumliche Einbindung des Signalmoduls in die BCR-proximale Signalkaskade an der Plasmamembran? In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Vorgang mit Hilfe bildgebender Verfahren erstmalig *in vivo* dokumentiert werden: In Abhängigkeit der konzertierten Funktion des N-terminalen *leucine zipper*-Motivs und der C-terminalen SH2-Domäne transloziert SLP-65 BCR-induziert aus dem Cytosol an die Plasmamembran. Eine Tyrosinphosphorylierung von SLP-65 ist dabei nicht erforderlich. Auch die Negativregulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort durch das Adapterprotein Grb2 bedingt eine Einbindung dieses cytosolischen Proteins in die BCR-Signalleitung. Jedoch ist weder die subzelluläre Organisation noch die Funktionsweise des  $\text{Ca}^{2+}$ -inhibitorischen Grb2-Signalmoduls bekannt. Ebenfalls über den Einsatz von *in vivo*-Lokalisationsstudien konnte hier gezeigt werden, dass die Negativregulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort durch Grb2 in unreifen B-Zellen mit der BCR-induzierten Plasmamembranassoziation des Adapterproteins verbunden ist. Als Basis der lokalisationsabhängigen Grb2-Funktion wurde in dieser Arbeit die phosphotyrosinvermittelte Rekrutierung von Grb2 an das konstitutiv plasmamembranassoziierte Adapterprotein Dok-3 identifiziert. Entscheidend für den  $\text{Ca}^{2+}$ -regulatorischen Effekt des Dok-3/Grb2-Signalmoduls ist das Zusammenspiel der C-terminalen Grb2-SH3-Domäne mit Dok-3-intrinsischen Eigenschaften an der Plasmamembran. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dokumentieren die dynamisch räumliche Organisation von zentralen Signalmodulen der BCR-Signalleitung *in vivo*. Die darüber hinaus aufgezeigte Verknüpfung der subzellulären Lokalisation und signalleitenden Funktion der Proteinmodule unterstreicht die essentielle Bedeutung der räumlichen Koordination von Signalprozessen durch Adapterproteine.

## 2. Einleitung

Der Organismus der Vertebraten ist durch die Ausbildung hochspezialisierter Gewebe und Organe gekennzeichnet. Diese Aufgabenteilung erlaubt den effizienten Ablauf unterschiedlichster Stoffwechselfvorgänge und die Ausführung komplexer Körperfunktionen. Gleichzeitig erfordert eine derartige Arbeitsteilung die effektive und sinnvolle Koordination der verschiedenen Gewebefunktionen innerhalb eines Organismus. Die interzelluläre Kommunikation ist somit eine Voraussetzung für die Existenz hochentwickelter Organismen. Interessanterweise spiegelt sich die Notwendigkeit vielfältigster Kommunikationsmechanismen nicht im genetischen Informationsgehalt wider. So umfasst beispielsweise das menschliche Genom mit 20000-30000 Genen nur unwesentlich mehr Gene als das Genom einfacher Organismen, wie etwa das des Fadenwurms (*C. elegans*,  $\geq 20000$  Gene). Offensichtlich erfolgt die zelluläre Kommunikation über molekulare Signalleitungsmechanismen nicht nach dem Prinzip „ein Genprodukt gleich ein Signal“. Vielmehr basiert die Signaltransduktion auf dem Zusammenspiel einer begrenzten Anzahl von signalleitenden Proteinen, deren Funktion durch gegenseitige Beeinflussungen im Kontext komplexer Netzwerke variabel gesteuert wird. Ein hochentwickeltes, lebenswichtiges Zellsystem der Vertebraten, welches strikt von der extrazellulären Signalerkennung und interzellulären Kommunikation abhängig ist, ist das Immunsystem: Ein wirksamer, spezifischer Schutz des Organismus vor Pathogenen ist untrennbar mit der Erkennung der Pathogene durch die Zellen des Immunsystems verbunden. Erst die Detektion des Signals „körperfremd“ und eine entsprechende zelluläre Umsetzung erlaubt die Einleitung einer angemessenen Immunabwehr von Pathogenen durch den Zellverband des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Insbesondere die Initiation der erworbenen Immunreaktion ist von der Kommunikation verschiedener Immunzellen geprägt. Ein begrenztes Spektrum pathogenassoziiierter Strukturmerkmale wird bereits durch Rezeptoren invarianter Spezifität auf der Oberfläche von Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt. Die spezifische Erkennung eines beliebigen Pathogens (Antigens) ermöglicht jedoch erst das nahezu unbegrenzte Rezeptorrepertoire auf den Zellen des erworbenen (adaptiven) Immunsystems. Grundlage des adaptiven Immunsystems bilden B- und T-Lymphocyten, die sich



wie sämtliche Zellen des Immunsystems aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark entwickeln (YE and GRAF, 2007). Die Spezifitätsvielfalt der Antigenrezeptoren (*B cell antigen receptor*, BCR; *T cell antigen receptor*, TCR) resultiert aus der zufälligen somatischen Rekombination verschiedener Rezeptor-Gensegmente im Verlauf der Lymphocytenentwicklung (WEIGERT et al., 1980; TONEGAWA, 1983; SCHATZ et al., 1992; ROWEN et al., 1996). Dabei werden die Lymphocyten auf das Vorhandensein eines signalkompetenten, nicht autoreaktiven Antigenrezeptors selektioniert (MOMBAERTS et al., 1992; RAJEWSKY, 1996; NEMAZEE, 2000; NEMAZEE et al., 2000; SIGGS et al., 2006). Dieser Vorgang unterstreicht die essentielle Bedeutung der Rezeptoren als Kommunikationselement für die Immunfunktionen der Lymphocyten. Jeder der reifen B- und T-Lymphocyten trägt eine unterschiedliche, monospezifische Variante des entsprechenden Antigenrezeptor-Prototyps auf der Zelloberfläche (NUSSENZWEIG et al., 1987; MALISSEN et al., 1992; CORCORAN, 2005). Die Bandbreite der antigenrezeptorvermittelten Signale umfasst in Abhängigkeit der nachgeschalteten Netzwerke signalleitender Proteine die Aktivierung und Regulation der Effektorfunktionen von B- und T-Lymphocyten, ebenso wie die positive und negative Selektion der Lymphocyten während ihrer Entwicklung (NIIRO and CLARK, 2002; WANG and CLARK, 2003; DAL PORTO et al., 2004; FUENTES-PANANA et al., 2004; MIOSGE and ZAMOYSKA, 2007). Wie die Mehrzahl molekularer Signalleitungsmechanismen erfolgt auch die Signaltransduktion durch die Antigenrezeptoren nicht nach dem simplen Schema „ein Rezeptor gleich ein Signal“.

## 2.1 Struktur und Funktion des BCRs

Die Hauptaufgabe von B-Lymphocyten in der Immunabwehr besteht in der Erzeugung spezifischer Antikörper, die die selektive Elimination eines beliebigen Pathogens einleiten. Die dazu erforderliche Erkennung des Antigens durch den BCR einer geeigneten Spezifität ist elegant an die Produktion eines Antikörpers identischer Spezifität gekoppelt. Der Antikörper stellt die sekretierte Variante der spezifitätsbestimmenden Proteinkomponente des BCRs auf der Oberfläche von B-Lymphocyten dar. Der BCR reifer Lymphocyten besteht aus einem Multiproteinkomplex, dessen Polypeptidkomponenten eine antigenbindende und

eine signalleitende Untereinheit formieren (RETH, 1992; RETH and WIENANDS, 1997). Die Erkennung und Bindung extrazellulärer Antigene wird von einem membranständigen Immunglobulin (mIg) vermittelt. Immunglobuline (Ig) sind tetramere Proteine aus je zwei identischen Ig-leichten und zwei Ig-schweren Ketten, die über Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden sind. Die Antigenbindungsspezifität wird durch die räumlich benachbarten komplementaritätsbestimmenden Bereiche (*complementarity determining regions*, CDRs) je einer leichten und schweren Kette definiert (RETH, 1992). Entsprechend der fünf Isoformen schwerer Immunglobulin-Ketten ( $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$ ) werden fünf Klassen von Immunglobulinen unterschieden: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Die Ig-leichten Ketten treten in zwei Isoformen,  $\kappa$  und  $\lambda$ , auf (VENKITARAMAN et al., 1991; RETH, 1992; NEUBERGER et al., 1993). Die signalleitende Untereinheit des BCRs bildet ein disulfidverbrücktes Heterodimer der Transmembranproteine Ig- $\alpha$  (CD79a) und Ig- $\beta$  (CD79b) (CAMPBELL and CAMBIER, 1990; HOMBACH et al., 1990; WIENANDS et al., 1990). Über die in 1:1-Stöchiometrie erfolgende, nicht-kovalente Assoziation mit dem membranständigen Immunglobulin verknüpft die Ig- $\alpha$ /Ig- $\beta$ -Signaleinheit die extrazelluläre Reizerfassung mit der intrazellulären Signalprozessierung (SCHAMEL and RETH, 2000).

Die Antigenbindung an den BCR initiiert zwei für die Bildung antikörpersezernierender Plasmazellen wesentliche Vorgänge. Zum einen löst die BCR-Stimulation intrazelluläre Signaltransduktions-Kaskaden aus, die über die Transkription diverser Gene die Aktivierung und Differenzierung der Zelle zu einer antikörpersezernierenden Plasmazelle einleiten können (GOLD, 2002; KUROSAKI, 2002). Zum anderen werden BCR-gebundene Fremdproteine internalisiert, proteolytisch zu Peptidfragmenten degradiert und in Form von Peptid/MHCII-Komplexen (*major histocompatibility complex II*) auf der Zelloberfläche T-Helferzellen präsentiert (SALAMERO et al., 1990; DRAKE et al., 1997; WAGLE et al., 2000). Bei spezifischer Erkennung des Peptid/MHCII-Komplexes liefern T-Helferzellen den B-Lymphocyten costimulatorische Signale, die die Aktivierung und Differenzierung der B-Zellen zu antikörpersezernierenden Plasmazellen induzieren (CLARK and LEDBETTER, 1994). Neben der Antigenerkennung und Aktivierung von B-Lymphocyten vermittelt der BCR wichtige Signale für die Entwicklung und das Überleben der B-Zellen. Bereits der auf sich entwickelnden B-Zellen exprimierte

prä-BCR erzeugt essentielle Signale für die weitere Reifung der Zellen (MELCHERS et al., 1994; MELCHERS, 1995; LOFFERT et al., 1996; STODDART et al., 2000). Ein antigenunabhängiges *maintenance signal* durch den BCR reifer B-Lymphocyten ist für das Überleben der Zellen in der Peripherie des Körpers erforderlich (LAM et al., 1997; NEUBERGER, 1997; RETH and WIENANDS, 1999). Die Bindung körpereigener Strukturen (Autoantigene) an den BCR unreifer B-Zellen induziert hingegen erneute Umordnungen der Rezeptorgene (*receptor editing*) oder den programmierten Zelltod (Apoptose), so dass autoreaktive B-Lymphocyten während ihrer Entwicklung eliminiert werden (NEMAZEE and BURKI, 1989; TIEGS et al., 1993; CARSETTI et al., 1995; MELAMED et al., 1998; PELANDA and TORRES, 2006). Reife B-Lymphocyten, die in der Peripherie an Autoantigen binden, können in den Zustand der Anergie übergehen; anergische B-Lymphocyten sind nicht mehr stimulierbar (NOSSAL and PIKE, 1980; CORNALL et al., 1995; GAULD et al., 2006).

## 2.2 Initiation der BCR-Signalleitung

Basis der intrazellulären Signalgebung durch den BCR bildet das in den cytoplasmatischen Domänen von Ig- $\alpha$  und Ig- $\beta$  vorhandene ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) (SANCHEZ et al., 1993; FLASWINKEL and RETH, 1994; TADDIE et al., 1994a; TADDIE et al., 1994b). Dieses durch die Konsensussequenz D/Ex<sub>7</sub>D/ExxYxxI/Lx<sub>7</sub>YxxI/L (Ein-Buchstaben-Code für Aminosäuren, x steht für einen beliebigen Aminosäurerest) charakterisierte Aminosäuresequenzmotiv wird in den signalleitenden Untereinheiten zahlreicher Multiprotein-Immunrezeptoren gefunden, so auch in den cytoplasmatischen Einheiten des T-Zell-Antigenrezeptors (TCR), der gemeinsamen  $\gamma$ -Kette vieler Fc-Rezeptoren und der  $\beta$ -Kette des Fc $\epsilon$ -Rezeptors (RETH, 1989; CAMBIER, 1995). Sämtliche ITAM-basierte Rezeptoren sind durch das Fehlen einer intrinsischen Enzymaktivität gekennzeichnet, sie werden über die Phosphorylierung der ITAM-Tyrosine durch rezeptorassoziierte Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK) an die intrazelluläre Signalleitung gekoppelt (MONROE, 2006).

Nach antigeninduzierter Vernetzung des BCRs werden die zwei Tyrosinreste der Ig- $\alpha$ /Ig- $\beta$ -ITAMs durch die colokalisierten, membranassoziierten PTKs der Src-Familie (Lyn, Fyn und Blk) phosphoryliert (SEFTON and CAMPBELL, 1991; CHENG et

al., 1999; SOHN et al., 2006). Die doppelt phosphorylierten ITAM-Tyrosine stellen Bindungsmotive für die tandemartig angeordnete SH2-Domäne (*src homology 2 domain*, SH2) der cytosolischen PTK Syk dar (WIENANDS et al., 1995; FUTTERER et al., 1998). Die Rekrutierung von Syk an ein doppelt tyrosinphosphoryliertes ITAM resultiert in Kombination mit einer Autophosphorylierung und der Src-Kinasen-vermittelten Transphosphorylierung in der vollständigen Aktivierung der Kinasefunktion (KUROSAKI et al., 1994; KUROSAKI et al., 1995; ROWLEY et al., 1995; KIMURA et al., 1996).

### 2.3 Intrazelluläre Organisation der BCR-Signalleitung

Die mit der Aktivierung der BCR-rekrutierten PTK Syk einhergehende Tyrosinphosphorylierung von Proteinen bildet die Grundlage für stimulationsabhängige, reversible Protein-Proteininteraktionen (LIU et al., 2006). Wie auch die Kinasen der Src-Familie und Syk verfügen zahlreiche an der Signalleitung beteiligte Proteine über SH2-Domänen (*src homology 2 domain*). SH2-Domänen sind aus etwa 100 Aminosäuren bestehende, funktionell eigenständige Proteinmodule, die eine sequenzspezifische Bindung an tyrosinphosphorylierte Peptidmotive des Interaktionspartners vermitteln (SONGYANG et al., 1993). Die Reversibilität der Phosphotyrosin/SH2-Interaktion beruht auf dem stimulationsabhängigen Gleichgewicht von PTK- und entgegengesetzter Proteintyrosinphosphatase (PTP)-Aktivität (VEILLETTE et al., 2002). Neben SH2-Domänen ist eine Vielzahl weiterer modularer Interaktionsdomänen an der Bildung von Multiprotein-Signalleitungsnetzwerken beteiligt. SH3-Domänen (*src homology 3 domain*) erlauben eine konstitutive Assoziation von Proteinen über die Bindungen prolinreicher Motive der Minimalsequenz PxxP (SPARKS et al., 1996; SPARKS et al., 1998; MAYER, 2001). Die verschiedenen identifizierten SH3-Bindungsmotive wurden in bislang acht Klassen für SH3-Liganden unterteilt (CESARENI et al., 2002; TONG et al., 2002). Die Familie der PH/PTB-Domänen (*pleckstrin homology domain*, PH; *phosphotyrosine binding domain*, PTB) kann die Bindung von Proteinen an Phospholipide der Zellmembran vermitteln (DINITTO and LAMBRIGHT, 2006). PH-Domänen erkennen die Kopfgruppen verschiedener Phosphoinositol-Derivate (MAYER et al., 1993; HARLAN et al., 1994; LEMMON et al., 1995). Entsprechend der großen Sequenzvariabilität der aus etwa 120

Aminosäuren gebildeten Domänen ist sowohl die Bindungsspezifität als auch die Bindungsaffinität der PH-Domänen hochgradig unterschiedlich. Die strukturell verwandte PTB-Domäne wurde ursprünglich als phosphotyrosinbindende Domäne identifiziert (BLAIKIE et al., 1994). Das Konsensusmotiv xNPx(p)Y wird jedoch ebenso in nicht-phosphorylierter Form von PTB-Domänen gebunden (TRUB et al., 1995; ZHOU et al., 1995; HOWELL et al., 1999). Darüber hinaus ist auch die Bindung von PTB-Domänen an Phosphoinositole beschrieben (RAVICHANDRAN et al., 1997; LEMMON and FERGUSON, 2000; DINITTO and LAMBRIGHT, 2006). Das Zusammenspiel der vielfältigen Interaktionsmodule resultiert in der geordneten Assoziation einzelner Signaltransduktionselemente zu einem komplexen Signalleitungsnetzwerk, welches die rezeptorvermittelte Signaldetektion mit intrazellulären Effektorsystemen verknüpft (PAWSON, 2003; PAWSON and NASH, 2003; PAWSON, 2004). Die Bildung von Multiproteinnetzwerken stellt ein zellübergreifendes Prinzip der Informationsverarbeitung dar und ist keinesfalls auf die Signalleitung von Lymphocyten beschränkt. So sind bis heute über 120 SH2-Domänen in über 100 Proteinen von Mensch und Maus identifiziert worden (LIU et al., 2006).

Von essentieller Bedeutung für die strukturelle und räumliche Organisation der Signalkomplexe sind Adapterproteine. In Abwesenheit einer intrinsischen Enzymaktivität fungieren sie über die bereitgestellten Interaktionsmodule als gerüstbildende Plattformen der Proteinnetzwerke (KUROSAKI, 2002; LEO et al., 2002). Effektorproteine werden so in räumliche Nähe zu Substraten und Regulatoren organisiert oder auch unmittelbar in ihrer Aktivität über konformationsabhängige Mechanismen durch die Bindung an Adapterproteine reguliert. Entsprechend wird der auf der enzymatischen Aktivität verschiedener Netzwerkelemente basierende Informationsfluss maßgeblich durch Adapterproteine beeinflusst. So bilden oftmals Adapterproteine die Grundlage einer zelltypspezifischen oder entwicklungsabhängigen Signalverarbeitung, indem sie universelle Elemente der intrazellulären Signaltransduktion an den signalgebenden Rezeptor koppeln und spezifisch modulieren (JORDAN et al., 2000; JORDAN et al., 2003).

## 2.4 Das Adapterprotein SLP-65 koordiniert BCR-Signalfunktionen

Das cytosolische Adapterprotein SLP-65 (*SH2-domain containing leukocyte protein of 65 kDa*), alternativ als BLNK (*B cell linker protein*) oder BASH (*B cell adapter containing an SH2-domain*) bezeichnet, wurde als zentraler Adapter der B-Zell-Signalleitung identifiziert (FU et al., 1998; GANGI-PETERSON et al., 1998; GOITSUKA et al., 1998; WIENANDS et al., 1998). Die Bedeutung von SLP-65 für die Entwicklung und Funktion von B-Lymphocyten zeigen die Untersuchungen SLP-65-defizienter Mäuse. Die B-Zellen dieser Mäuse unterliegen partiellen Entwicklungsblockaden in verschiedenen Prä-B-Zellstadien, was in einer erhöhten Anzahl von Prä-B-Zellen im Knochenmark und unreifen B-Zellen in peripheren Lymphorganen resultiert (JUMAA et al., 1999; PAPPU et al., 1999; HAYASHI et al., 2000). Der Phänotyp dieses Immundefektes ähnelt dem Krankheitsbild der X-gekoppelten Immundefizienz (*X-linked immunodeficiency, Xid*) bei Mäusen und der X-gekoppelten Agammaglobulinämie (*X-linked agammaglobulinemia, XLA*; Morbus Bruton) beim Menschen (MINEGISHI et al., 1999). XLA und Xid sind ebenfalls durch eine Entwicklungsblockade im Prä-B-Zellstadium gekennzeichnet, die in einem Mangel BCR-positiver Lymphocyten resultiert und folglich mit einer geringen Konzentration aller Ig-Klassen im Serum verbunden ist (RAWLINGS et al., 1993; THOMAS et al., 1993; TSUKADA et al., 1993; VETRIE et al., 1993). Darüber hinaus besitzt SLP-65 eine Funktion als Tumorsuppressor, der die Prä-B-Zellexpansion während der Lymphocytenentwicklung begrenzt. So ist die akute lymphoblastoide Leukämie (ALL) häufig mit geringer oder fehlender SLP-65-Expression assoziiert (FLEMMING et al., 2003; JUMAA et al., 2003; KERSSEBOOM et al., 2003).

Aufgrund der ausgeprägten Strukturhomologie zu dem T-Zell-Paralog SLP-76 wird das in B-Zellen und Makrophagen exprimierte SLP-65 gemeinsam mit dem Adapterprotein CLNK/MIST (*cytokine-dependent hemopoietic linker, CLNK* oder *mast cell immunoreceptor signal transducer, MIST*) der Familie der SLP-Adapter zugeordnet (JACKMAN et al., 1995; CAO et al., 1999; WU and KORETZKY, 2004). Die Aminosäuresequenz von SLP-65 bildet zahlreiche Protein-Protein-Interaktionsmodule. Einem N-terminalen *leucine zipper*-Motiv (KOHLER et al., 2005) schließen sich saure Bereiche mit fünf spezieübergreifend konservierten Tyrosinphosphorylierungsmotiven und potentielle SH3-Bindungsmotive in Form prolinreicher Regionen an. Eine C-terminale SH2-Domäne ermöglicht die

Interaktion mit Phosphotyrosinmotiven (FU et al., 1998; GOITSUKA et al., 1998; WIENANDS et al., 1998). Die relative molare Masse von SLP-65 liegt zwischen 65 kDa (Maus) und 80 kDa (Huhn). In humanen Leukocyten werden aufgrund alternativer Spleiß-Vorgänge zwei Isoformen der relativen molaren Massen von 68 und 70 kDa beobachtet (FU et al., 1998; GRABBE and WIENANDS, 2006).

Die zentrale Funktion von SLP-65 besteht in der Organisation des Btk (*Bruton's tyrosine kinase*), PLC $\gamma$ 2 (Phospholipase C $\gamma$ 2) und SLP-65 umfassenden Ca<sup>2+</sup>-Initiationskomplexes (vergl. Abb. 2.1). Als eines der ersten Substrate der BCR-regulierten PTK Syk unterliegt SLP-65 einer ausgeprägten, antigeninduzierten Phosphorylierung (FU et al., 1998; GOITSUKA et al., 1998; WIENANDS et al., 1998). Die Phosphotyrosinmotive ermöglichen die SH2-Domänen-vermittelte Bindung der PTK Btk (pY<sup>115</sup>EPP), PLC $\gamma$ 2 (pY<sup>103</sup>VVP, pY<sup>194</sup>IVP und pY<sup>205</sup>IEP), des Guanin-Nucleotid-Austauschfaktors Vav1 (*vav oncogene*, pY<sup>91</sup>ENP) und des Adapterproteins Nck (*non-catalytic region of tyrosin kinase*, pY<sup>91</sup>ENP) (FU et al., 1998; WIENANDS et al., 1998; HASHIMOTO et al., 1999; SU et al., 1999; ISHIAI et al., 1999a; ISHIAI et al., 1999b; CHIU et al., 2002). Das Adapterprotein Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) bindet über eine Assoziation mit den prolinreichen Regionen sowohl konstitutiv an SLP-65 als auch BCR-induziert über eine Grb2-SH2/Phosphotyrosin-Interaktion (FU et al., 1998; WIENANDS et al., 1998; FUSAKI et al., 2000; GRABBE and WIENANDS, 2006). Die SLP-65-SH2-Domäne ist in der Lage mit der Kinase HPK 1 (*hematopoietic progenitor kinase 1*) und Ig- $\alpha$  zu interagieren (ENGELS et al., 2001; SAUER et al., 2001; KABAK et al., 2002).

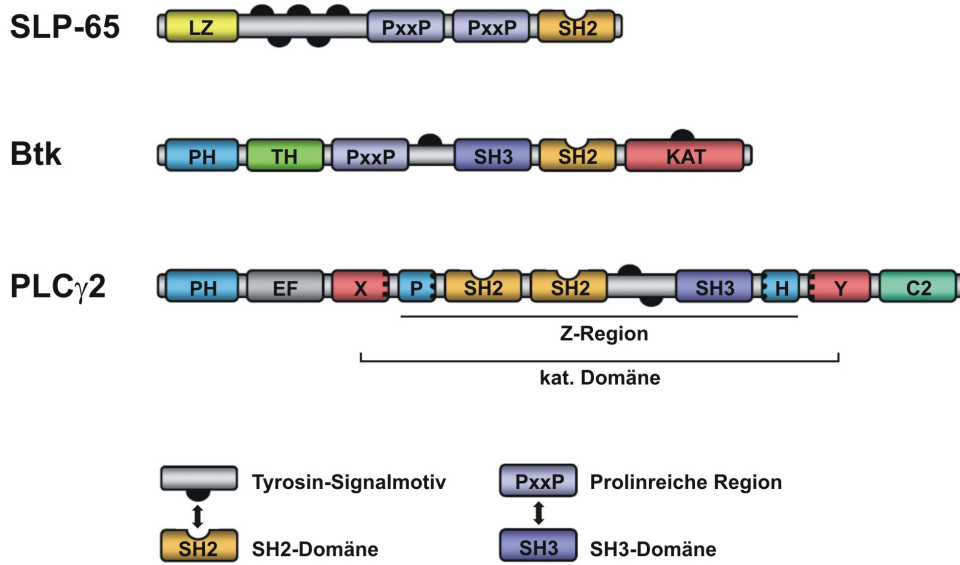
## 2.5 Organisation und Funktion des Ca<sup>2+</sup>-Initiationskomplexes

Die BCR-induzierte Mobilisierung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus intrazellulären Speichern und dem Extrazellularraum ist ein essentielles Element der B-Zellsignalleitung und vermittelt verschiedene zelluläre Reaktionen (ENGELKE et al., 2007). Das entscheidende regulatorische Enzym für die Initiation von Ca<sup>2+</sup>-Signalen in B-Lymphocyten ist PLC $\gamma$ 2 (HEMPEL et al., 1992; WANG et al., 2000). Gemeinsam mit der in T-Zellen hauptsächlich exprimierten Isoform PLC $\gamma$ 1 bildet sie die  $\gamma$ -Gruppe der sechs Phospholipase-Unterfamilien ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ; (PARK et al., 1991; SECRIST et al., 1991; RHEE and BAE, 1997; HASHIMOTO et al., 2000; IRVIN et al., 2000; RHEE,

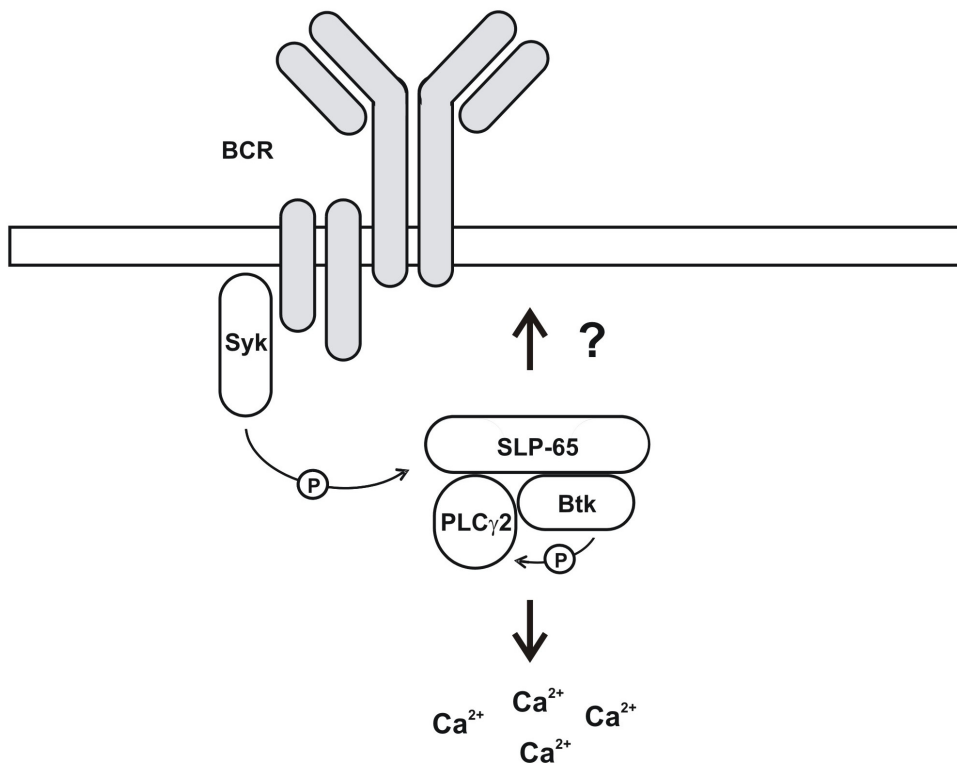
2001; HARDEN and SONDEK, 2006)). Die Struktur von PLC $\gamma$ 2 umfasst eine N-terminale PH-Domäne gefolgt von EF-Hand-Motiven, einen katalytischen Bereich und eine C-terminale C2-Domäne (*conserved 2 domain*). Der katalytische Bereich wird von zwei Regionen (X und Y) gebildet, die durch die sogenannte Z-Region voneinander getrennt sind. Die Z-Region beinhaltet eine weitere durch zwei SH2-Domänen und eine SH3-Domäne geteilte PH-Domäne (vergl. Abb. 2.1). Die Aktivierung von PLC $\gamma$ 2 erfolgt über einen vielschichtigen, bisher nicht vollständig aufgeklärten Prozess (REBECCHI and PENTYALA, 2000; HIKIDA and KUROSAKI, 2005). Eine Grundlage der PLC $\gamma$ 2-Aktivierung bildet die SH2-vermittelte, simultane Bindung von PLC $\gamma$ 2 und Btk an Phospho-SLP-65 (FU et al., 1998; HASHIMOTO et al., 1999; JUMAA et al., 1999; SU et al., 1999; SHIAI et al., 1999a; SHIAI et al., 1999b; KUROSAKI and TSUKADA, 2000; CHIU et al., 2002). Innerhalb dieses als Ca<sup>2+</sup>-Initiationskomplex bezeichneten Proteinmoduls gelangen PLC $\gamma$ 2 und Btk sowohl in räumliche Nähe untereinander als auch zu den rezeptoraktivierten PTKs Lyn und Syk an der Plasmamembran (KUROSAKI and TSUKADA, 2000). Die einhergehende Aktivierung von Btk resultiert in der Phosphorylierung der regulatorischen PLC $\gamma$ 2-Tyrosinmotive Y<sup>753</sup> und Y<sup>759</sup> (bezogen auf humane PLC $\gamma$ 2) (FLUCKIGER et al., 1998; BABA et al., 2001; RODRIGUEZ et al., 2001; WATANABE et al., 2001; HUMPHRIES et al., 2004; KIM et al., 2004). Neben der Tyrosinphosphorylierung über die Rekrutierung in den Ca<sup>2+</sup>-Initiationskomplex ist die Plasmamembranassoziation von Btk und PLC $\gamma$ 2 essentiell für die enzymatische Aktivität der Proteine. Die PH-Domänen beider Enzyme interagieren mit Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP3) in der Plasmamembran und stabilisieren den Ca<sup>2+</sup>-Initiationskomplex in der Nähe des PLC $\gamma$ 2-Substrates Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) (BOLLAND et al., 1998; FALASCA et al., 1998; SATTERTHWAITTE et al., 1998; VARNAI et al., 1999; MARSHALL et al., 2000). Die PLC $\gamma$ 2-vermittelte Hydrolyse des Membranlipids PIP2 resultiert in der Freisetzung der *second messenger* Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) (HIKIDA and KUROSAKI, 2005). Während das Membranlipid DAG die Rekrutierung und Aktivierung der Serin/Threonin-spezifischen PKC (*protein kinase C*) vermittelt, ist das lösliche IP3 zentraler Botenstoff der rezeptorinduzierten Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung (SPITALER and CANTRELL, 2004).



**A**



**B**



**Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Signalmoleküle des Ca<sup>2+</sup>-Initiationskomplexes**  
 Domänenstruktur der zentralen Komponenten des Ca<sup>2+</sup>-Initiationskomplexes: SLP-65, Btk und PLC $\gamma$ 2. Tyrosin-Bindungsmotive für SH2-Domänen sind als schwarze Halbkreise dargestellt, SH3-Domänen binden an prolinreiche Regionen (PxxP) (A). Die Stimulation des BCRs (in grau dargestellt) resultiert in der Aktivierung der PTK Syk. Das phosphorylierte Adapterprotein SLP-65 organisiert den Ca<sup>2+</sup>-Initiationskomplex an der Plasmamembran. Btk-aktivierte PLC $\gamma$ 2 initiiert eine intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Antwort durch die Hydrolyse von Phospholipiden der Plasmamembran (B).

LZ, *leucine zipper*; PxxP, prolinreiche Region; SH2, SH2-Domäne; PH, PH-Domäne (geteilte PH-Domäne bei PLC $\gamma$ 2, P und H); TH, TH-Domäne (*tec homology domain*); SH3, SH3-Domäne; KAT, katalytische Domäne (geteilt bei PLC $\gamma$ 2, X- und Y-Region); EF, EF-Hand; C2, C2-Domäne.

Die Bindung von IP3 an IP3-regulierte Ca<sup>2+</sup>-Kanäle der IP3-Rezeptorfamilie in der Membran des als Ca<sup>2+</sup>-Speicher fungierenden endoplasmatischen Retikulums (ER) induziert die intrazelluläre Freisetzung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen in das Cytosol (PATTERSON et al., 2004). Der resultierende Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und die Entleerung der Speicher lösen über sogenannte SOCs (*store-operated Ca<sup>2+</sup>-channels*) in der Plasmamembran den zusätzlichen Einstrom von Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus dem Extrazellulärraum in das Cytosol aus (PAREKH and PENNER, 1997; PUTNEY and MCKAY, 1999; PUTNEY et al., 2001; PAREKH and PUTNEY, 2005). Weder die molekulare Identität der SOCs noch die funktionelle Verknüpfung von Speicherentleerung und SOC-Aktivität konnte bislang eindeutig geklärt werden. Verschiedene Studien schlagen das Ca<sup>2+</sup>-bindende (Adapter)protein STIM1 (*stromal interaction molecule 1*) als Sensor der ER-Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und Regulator der Plasmamembran-SOCs vor (LIOU et al., 2005; ROOS et al., 2005; ZHANG et al., 2005; ONG et al., 2007). Über die BCR-induzierte Erhöhung der cytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration werden verschiedene Ca<sup>2+</sup>-abhängige Signalleitungsprozesse eingeleitet (WINSLOW et al., 2003). Basis der Signalfunktion von Ca<sup>2+</sup>-Ionen bildet die von Konformationsänderungen begleitete Bindung an Ca<sup>2+</sup>-sensitive Proteine. So resultiert die Bindung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen an die regulatorische Domäne der PKC im Zusammenspiel mit DAG in der Aktivierung der Kinasefunktion (OANCEA and MEYER, 1998). Die PKC-Aktivität mündet schließlich in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (*nuclear factor for  $\kappa$  gene in B-lymphocytes*) (BAEUERLE and HENKEL, 1994; SAIJO et al., 2002; SU et al., 2002). Der Ca<sup>2+</sup>-Sensor Calmodulin aktiviert infolge der Ca<sup>2+</sup>-Bindung die Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin, die über die Dephosphorylierung von Serin/Threonin-Resten die Kernlokalisierung des Transkriptionsfaktors NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) einleitet (CRABTREE and CLIPSTONE, 1994; SHIBASAKI et al., 1996; TIMMERMAN et al., 1996; CRABTREE and OLSON, 2002).

Die enge funktionelle Verknüpfung der Komponenten des  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes, SLP-65, Btk und  $\text{PLC}\gamma 2$ , sowie ihre zentrale Stellung in der BCR-Signalleitung verdeutlichen die ähnlichen B-Zellentwicklungstörungen und XLA/Xid-typischen Immundefekte der jeweilig defizienten Mäuse (KHAN et al., 1995; JUMAA et al., 1999; PAPPU et al., 1999; FRUMAN et al., 2000; WANG et al., 2000).

## 2.6 Subzelluläre Organisation $\text{Ca}^{2+}$ -Flux-regulierender Signalmodule

Die Stimulation des B-Zellrezeptors ist über die nachgeschalteten Signalleitungsnetzwerke an ein breites zelluläres Antwortspektrum von Proliferation, Differenzierung, Aktivierung der Effektorfunktion bis hin zur Apoptose gekoppelt (vergl. 2.1, (WANG and CLARK, 2003; DAL PORTO et al., 2004)). Über die Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Transkriptionsfaktoren bildet die BCR-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung ein zentrales regulatorisches Element der verschiedenen zugrundeliegenden, zellulären Prozesse (vergl. 2.5). Die Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort selbst stellt dementsprechend einen nicht minder bedeutsamen Vorgang dar. So ist die Modulation von Intensität und Dauer eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals mit der differentiellen Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT und NF- $\kappa$ B verbunden. Ein starker transientser Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration resultiert in der spezifischen Aktivierung von NF- $\kappa$ B, wohingegen die Aktivierung von NFAT ein eher gemäßigt, anhaltendes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal erfordert (DOLMETSCH et al., 1997).

Eine mögliche Regulationsebene der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung bildet die räumliche Organisation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes durch SLP-65 an der Plasmamembran. Die Initiation der BCR-Signalleitung ist mit der Translokation des Rezeptors in die sogenannten *lipid rafts* der Plasmamembran verbunden (CHENG et al., 1999; AMAN and RAVICHANDRAN, 2000; DILLON et al., 2000; GUO et al., 2000; PETRIE et al., 2000; WEINTRAUB et al., 2000; CHENG et al., 2001a; SOHN et al., 2006). *Lipid rafts* oder *glycophospholipid-enriched microdomains* (GEMs) stellen dynamische Mikrodomänen in der Lipiddoppelschicht der Plasmamembran dar, die durch einen hohen Anteil von Cholesterol und Glycosphingolipiden mit gesättigten Fettsäureketten gekennzeichnet sind (BROWN and ROSE, 1992). Obgleich die

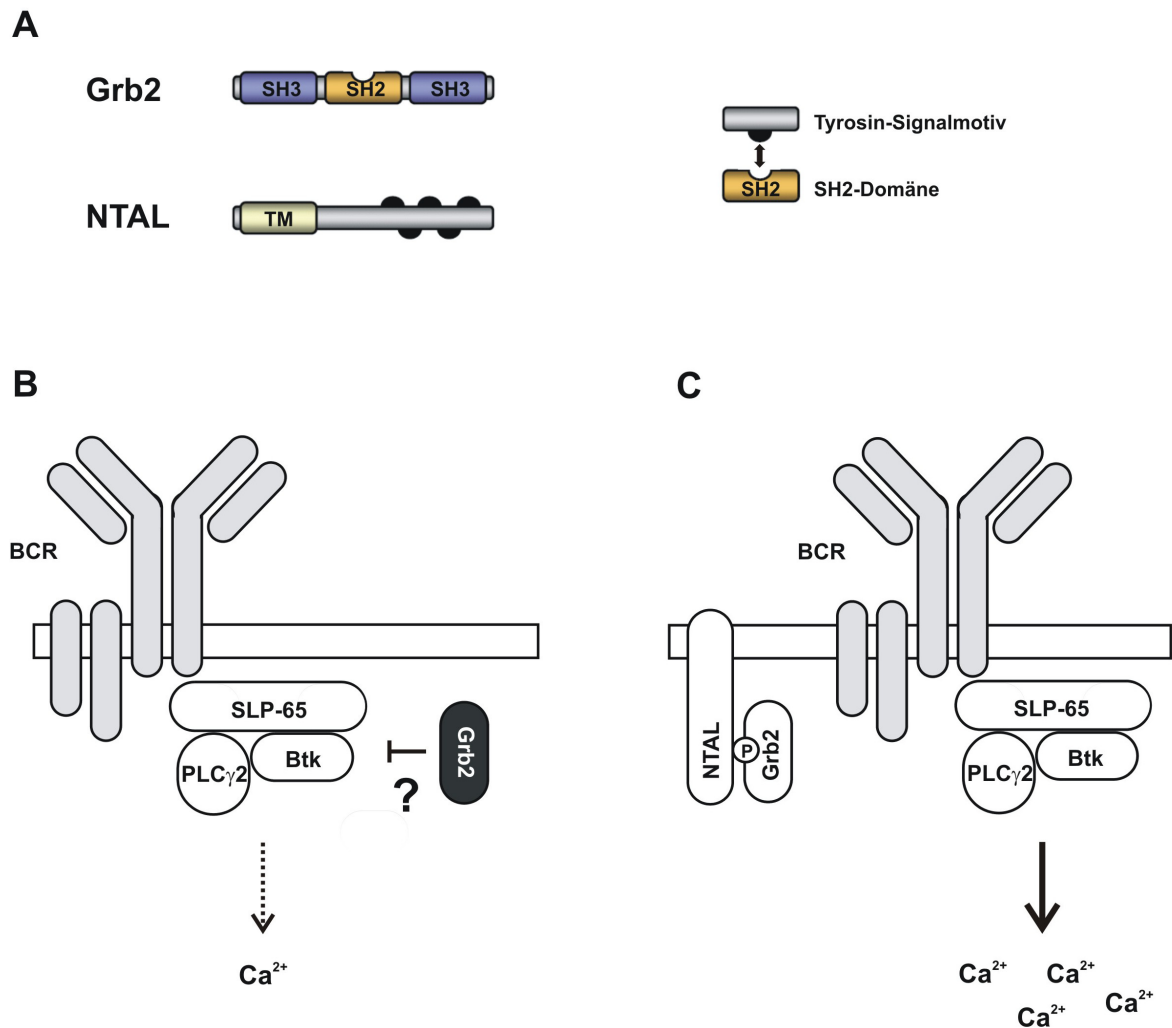
Organisation und die physiologische Gestalt der *lipid rafts* kontrovers diskutiert werden (MUNRO, 2003; DOUGLASS and VALE, 2005; LICHTENBERG et al., 2005), ist ihre Rolle als räumlich diskrete Signalplattformen der Plasmamembran durch verschiedene Studien belegt (LANGLET et al., 2000; SIMONS and TOOMRE, 2000; CHENG et al., 2001b; HOREJSI, 2003). Die für die Organisation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes essentielle Tyrosinphosphorylierung von SLP-65 durch die rezeptorassoziierte PTK Syk erfordert die Rekrutierung des cytosolischen Adapterproteins an den *lipid raft*-lokalisierten BCR-Komplex (WONG et al., 2000; JOHMURA et al., 2003). Erst die einhergehende, simultane SH2-Domänen-vermittelte Colokalisation von Btk und  $\text{PLC}\gamma 2$  in einem trimolekularen SLP-65-Komplex an der Plasmamembran ermöglicht die BCR-abhängige Aktivierung von  $\text{PLC}\gamma 2$  (vergl. 2.4; (CHIU et al., 2002)). Zudem gewährleistet nur eine Plasmamembranassoziation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes  $\text{PLC}\gamma 2$  den Zugang zu ihrem *lipid raft*-lokalisierten Substrat PIP<sub>2</sub> (HOPE and PIKE, 1996; XAVIER et al., 1998). Obwohl die Organisation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes durch SLP-65 an der Plasmamembran ein zentraler Aspekt der BCR-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung ist (GUO et al., 2000), ist der Mechanismus der SLP-65-Membranrekrutierung bislang nicht eindeutig geklärt. Eine Studie beschreibt das N-terminale *leucine zipper*-Motiv in SLP-65 als entscheidendes Interaktionsmodul der Plasmamembranassoziation (KOHLENER et al., 2005). Jedoch sind weder Funktionsweise und Bindungspartner des *leucine zipper*-Motivs charakterisiert, noch ist bekannt, ob die Membranrekrutierung von SLP-65 durch den *leucine zipper* unabhängig der übrigen SLP-65-Interaktionsmodule vermittelt wird. Andere Arbeiten zeigen, dass die SH2-Domänen-vermittelte Bindung von SLP-65 an die phosphorylierte Ig- $\alpha$ -Untereinheit des BCR-Komplexes die Basis einer stimulationsabhängigen Membranrekrutierung des Adapters bildet (ENGELS et al., 2001; KABAK et al., 2002). Das involvierte, spezieübergreifend konservierte nicht-ITAM-Tyrosin scheint allerdings nicht den zentralen Membrananker der SLP-65-Rekrutierung darzustellen. Die Deletion des entsprechenden Ig- $\alpha$ -Tyrosinmotivs im Mausmodell resultiert lediglich in einer beeinträchtigten B-Zellreaktion auf T-Zell-unabhängige Antigene, ein grundsätzlicher Organisationsdefekt des  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes wird nicht beobachtet (KABAK et al., 2002; PATTERSON et al., 2006). Aufgrund der engen Struktur- und Funktionshomologie von SLP-65 und

SLP-76 wird zudem eine SLP-76-analoge Plasmamembranrekrutierung von SLP-65 diskutiert. In T-Zellen wird SLP-76 über das Adapterprotein der Grb2-Familie Gads (*Grb2-related adaptor downstream of Shc*) an den Transmembranadapter LAT (*linker for activation of T cells*) rekrutiert und so dem *lipid raft*-lokalisierten TCR-Komplex zugänglich gemacht (KORETZKY et al., 2006). Ein in B-Zellen exprimiertes, strukturell LAT-homologes Protein ist der Transmembranadapter NTAL (*non-T cell activation linker*) (BRDICKA et al., 2002). In der Tat rekrutiert NTAL BCR-induziert Grb2, jedoch wurde weder eine NTAL/Grb2-Interaktion mit SLP-65 oder Komponenten des  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes beobachtet, noch eine LAT-entsprechende Funktion von NTAL in B-Zellen identifiziert (BRDICKA et al., 2002; STORK et al., 2004; WANG et al., 2005).

Stattdessen bildet die Rekrutierung von Grb2 durch NTAL ein Beispiel für die lokalisationsabhängig regulierte Funktion von Adapterproteinen im Kontext der BCR-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung (STORK et al., 2004). In reifen und unreifen B-Zellen werden die Komponenten des  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes sowie Grb2 gleichermaßen exprimiert. Dennoch führt die BCR-Stimulation in beiden Entwicklungsstadien zu unterschiedlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen (KONCZ et al., 2002). Diese differenziellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Antworten werden durch die subzelluläre Verteilung von Grb2 beeinflusst (STORK et al., 2004). Grb2 ist ein evolutionär hochkonserviertes und ubiquitär in zahlreichen Geweben und Zelllinien exprimiertes Adapterprotein, das aus einer N-terminalen SH3-Domäne, einer zentralen SH2-Domäne und einer C-terminalen SH3-Domäne besteht (CLARK et al., 1992; LOWENSTEIN et al., 1992; OLIVIER et al., 1993). Ursprünglich wurde Grb2 als stimulationsabhängiger Interaktionspartner von Rezeptortyrosinkinasen der Familie der Wachstumsfaktor-Rezeptoren beschrieben (LOWENSTEIN et al., 1992; OLIVIER et al., 1993), wobei die Grb2-SH2-Domäne bevorzugt Phosphotyrosinmotive der Sequenz pYxN bindet (KESSELS et al., 2002). In unreifen B-Zellen inhibiert Grb2 sowohl die BCR-induzierte Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern als auch den Einstrom extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen über die Plasmamembran (STORK et al., 2004). Diese Negativregulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung durch Grb2 erfordert die Funktion der SH2-Domäne und der C-terminalen SH3-Domäne in einem nicht weiter charakterisierten, inhibitorischen Signalmodul. In reifen B-Zellen wird die Grb2-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Inhibition dagegen durch die BCR-induzierte Rekrutierung

von Grb2 an das *lipid raft*-lokalisierte Transmembranprotein NTAL aufgehoben (STORK et al., 2004). Die SH2-Domänen-vermittelte Bindung an die drei C-terminalen pYxN-Motive in NTAL verhindert die Rekrutierung von Grb2 durch einen Grb2-abhängigen Negativregulator der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung. Somit definiert die differentielle räumliche Organisation von Grb2 in An- und Abwesenheit des entwicklungsabhängig exprimierten Transmembranadapters NTAL die  $\text{Ca}^{2+}$ -regulatorische Funktion des Adapterproteins (vergl. Abb. 2.2, (STORK et al., 2004)). Allein durch die exogene Expression von NTAL in unreifen B-Zellen wird die BCR-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort der Zellen in den Phänotyp reifer B-Zellen überführt, der durch einen erhöhten Anteil extrazellulär einströmender  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen gekennzeichnet ist (KONCZ et al., 2002; KOVESDI et al., 2002; STORK et al., 2004). Die Identität des Grb2-abhängigen,  $\text{Ca}^{2+}$ -inhibitorischen Signalmoduls in unreifen B-Zellen konnte bislang nicht aufgeklärt werden.

Die hier zitierten Arbeiten verdeutlichen, dass die subzelluläre Organisation signalleitender Proteine von entscheidender Bedeutung für die Verknüpfung und Regulation von Signalprozessen ist. Ein umfassendes Verständnis der BCR-vermittelten Signalgebung in B-Lymphocyten erfordert daher die detaillierte Kenntnis von räumlich dynamischen Vorgängen innerhalb der Signalleitungsnetzwerke.



### Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der $\text{Ca}^{2+}$ -Fluxregulation durch Grb2

Domänenstruktur von Grb2 und NTAL (**A**). Die Stimulation des BCRs (in grau dargestellt) resultiert über die Aktivierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes (SLP-65, Btk,  $\text{PLC}\gamma_2$ ) in einer intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort. In Abwesenheit des Transmembranadapters NTAL inhibiert Grb2 das BCR-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal auf unbekannte Weise (schwarz dargestelltes Grb2) (**B**). In Gegenwart von NTAL wird Grb2 hingegen BCR-induziert an das phosphorylierte Adapterprotein rekrutiert und die Grb2-abhängige Inhibition der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort wird aufgehoben (weiß dargestelltes Grb2) (**C**). SH3, SH3-Domäne; SH2, SH2-Domäne; TM, Transmembrandomäne. Phosphotyrosin-Bindungsmotive für SH2-Domänen sind als schwarze Halbkreise dargestellt.

### 3. Ziele der Arbeit

BCR-induzierte Signalkaskaden bilden die Grundlage für die Entwicklung und Funktion von antigenspezifischen B-Lymphocyten. Entscheidend für die Vernetzung verschiedener zellulärer Signalkomponenten ist die gerüstbildende Funktion von Adapterproteinen.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Aufklärung der dynamisch räumlichen Organisation der Adaptermoleküle SLP-65 und Grb2 im Kontext der BCR-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung. Mit Hilfe von *in vivo-imaging*-Verfahren sollte die subzelluläre Lokalisation der Proteine untersucht und molekulare Grundlagen charakterisiert werden. Zudem sollte die Bedeutung der räumlichen Organisation von SLP-65 und Grb2 für die Funktion der jeweiligen Signalmodule in der BCR-Signalleitung analysiert werden.



## 4. Material

### 4.1 Materialien

Alle Chemikalien und Reagenzien wurden von Amersham Bioscience, Applichem, Becton Dickinson, Invitrogen (Gibco, Molecular Probes), Invivogen, J. T. Baker, Merck, Roth, Serva, und Sigma-Aldrich (Fluka) bezogen. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien in pA-Qualität eingesetzt.

### 4.2 Geräte

Autoklav	Webeco
BioPhotometer	Eppendorf
Brutschrank HERAcell 150	Heraeus
Confocal Laserscanning-System TCS SP2 & DM IRB	Leica
Durchflusscytometer FACScalibur	Becton Dickinson
Durchflusscytometer LSR II	Becton Dickinson
Elektrophorese-Kammern (SDS-PAGE)	BioRad
Elektrophorese-Kammern (Agarose)	Peqlab (EQUIBIO)
Gel Imager	Intas
GenePulser & Capacitance Extender	BioRad
Imager ChemiLux	Intas
Inkubator Kelvitron®t	Heraeus
Inkubator Unitron	INFORS
Mastercycler epgradient	Eppendorf
Mastercycler personal	Eppendorf
Mikroskop LEITZ DMIL	Leitz
pH-Meter pH Level 1	inoLab®
Schüttler Duomax 1030	Heidolph
Sterilbank HERAsafe	Heraeus
Thermomixer comfort	Eppendorf
Ultraschallhomogenisator Sonopuls HD 2070	Bandelin
Waage TE 612	Sartorius
Water Purification System Milli-Q	Millipore

---

Westernblotsystem Semi-dry Transfer Unit TE70/77	Amersham Bioscience
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf
Zentrifuge RC 3B Plus, RC 26 Plus	Sorvall®
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus
Zentrifuge Galaxy Mini	VWR

### 4.3 Software

Adobe® Photoshop® CS2  
CellQuest Pro  
CorelDraw  
CSX-1400M Camera Controller  
FlowJo  
Gel-Dokumentationssoftware, GDS  
Leica Confocal Software v2.61  
Mac OS 9.2  
MS Windows XP, MS Office  
pDRAW 3.1

### 4.4 Sonstige Materialien

1 kb DNA-Größenstandard GeneRuler™	MBI Fermentas
4 well chambered coverglass #1.0 Lab-Tek®	Nunc
Elektroporationsküvetten (4 mm)	Peqlab (EQUIBIO)
Westernblot-Filterpapier	Schleicher & Schell
Glutathion-Sepharose 4FastFlow	Amersham Bioscience
Nitrocellulose Filter Hybond™ ECL™	Amersham Bioscience
PIP Strips™	Echelon Biosciences
Protein A/G-Agarose	Santa Cruz Biotech.
Protease-Inhibitor-Cocktail (P2714)	Sigma
Proteingrößenstandard Broad Range (Prestained)	New England Biolabs
Sterilfilter	Roth
Transfektionsreagenz FuGENE	Roche
Westernblot-Detektionsreagenz ECL™	Amersham Bioscience
Zellkulturmaterialien	Greiner, Nunc, Falcon

## 4.5 Lösungen, Puffer und Medien

Die Zusammensetzungen aller Lösungen und Puffer sind in Abschnitt 5 Methoden entsprechend ihrer experimentellen Verwendung aufgeführt. Sämtliche Lösungen und Puffer sind wässrige Lösungen und wurden, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur gelagert (H<sub>2</sub>O: Milli-Q, Millipore). Allgemein genutzte Puffer:

PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 8,6 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; pH ~ 7,3
PBS-T	PBS 0,1 % (v/v) Tween 20
Tris/HCl	0,5-1,5 M Tris; pH 6,8-8,8 mit HCl
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0

## 4.6 Enzyme

Restriktionsendonucleasen	New England Biolabs
<i>Calf Intestine Phosphatase</i> (CIP)	New England Biolabs
T4 DNA Ligase	New England Biolabs
Taq DNA Polymerase	New England Biolabs
Pfu DNA Polymerase	Invitrogen
Pfx <sub>50</sub> DNA Polymerase	Invitrogen
DNA Polymerase I (Klenow-Fragment)	New England Biolabs
Reverse Transkriptase (MMLV-RT)	MBI Fermentas

## 4.7 Antikörper

Primär-Antikörper	Quelle	Verwendung
Kaninchen-anti-PhosphoSHIP <sup>(1020)</sup>	Cell Signaling Technology	IB
Kaninchen-anti-SLP-65	(ISHIAI et al., 1999b)	IB
Maus-anti-GFP (7.1-13.1)	Roche	IB, IP

<b>Primär-Antikörper</b>	<b>Quelle</b>	<b>Verwendung</b>
Maus-anti-Grb2 (3F2)	Upstate Biotechnology	IB
Maus-anti-GST (GST-2)	Sigma	IB
Maus-anti-IgM (M4)	Southern Biotechnology	Stimulation DT40
Maus-anti-Phosphotyrosin (4G10)	Upstate Biotechnology	IB, IP
Ratte-anti-HA (3F10)	Roche	IB, IP
Ziege-anti-Hühner-IgM FITC	Bethyl Laboratories	FACS-Analyse
<b>Sekundär-Antikörper</b>	<b>Quelle</b>	<b>Verwendung</b>
Ziege-anti-Maus-IgG1 HRPO-konjugiert	Santa Cruz Biotech.	IB
Ziege-anti-Maus-IgG2B HRPO-konjugiert	Santa Cruz Biotech.	IB
Ziege-anti-Maus-IgG HRPO-konjugiert	Pierce	IB
Ziege-anti-Kaninchen-IgG HRPO-konjugiert	Pierce	IB
Ziege-anti-Ratte-IgG HRPO-konjugiert	Pierce	IB

Tabelle 4.1: Antikörper

(IB: Immunoblot, IP: Immunpräzipitation, HA: Hämagglutinin, GST: Glutathion-S-Transferase, GFP: *green fluorescent protein*)

## 4.8 Vektoren

Vektor	Quelle	Verwendung
pCRII-TOPO	Invitrogen	T/A-Klonierung
pEGFP <sub>mono</sub> -N1/N2/N3	BD Bioscience Clontech	Klonierung
pEGFP-N1/N2/N3	BD Bioscience Clontech	Klonierung
pECFP-Mem	BD Bioscience Clontech	Markerprotein
pECFP-Golgi	BD Bioscience Clontech	Markerprotein
pECFP-PTP1B <sup>1)</sup>	P. Bastiaens, MPI für mol. Physiologie, Dortmund	Markerprotein
pGEX-4T-1	Amersham Bioscience	Expression in Bakterien
pcDNA 3.0 puro Citrin	P. Bastiaens, MPI für mol. Physiologie, Dortmund	Klonierung/Expression in DT40
pcDNA 3.0 puro	G. Yigit, Zell. & Mol. Immunologie, Göttingen	Expression in DT40
pMSCV puro	BD Bioscience Clontech	Expression in DT40
pMSCV blast	B. Stork, Zell. & Mol. Immunologie, Göttingen	Expression in DT40
pHCMV-VSV-G	M. Jücker, UKE Hamburg	Expression von VSV-G

Tabelle 4.2: Vektoren

<sup>1)</sup> (HAJ et al., 2002)

## 4.9 Oligonucleotide

Primer	Sequenz 5'→ 3'	Verwendung
SLP-65 fwd BgIII	agc cag atc tca tgg aca agc tga aca aac	Klonierung
SLP-65 rev Stopp NotI	ata tgc ggc cgc tta aga aac tct tac aat ata ttt c	Klonierung
SLP-65 rev BamHI/XmaI	ata tcc cgg gga tcc gaa act ctt aca ata tat ttc	Klonierung/ Mutagenese
SLP-65 AgeI/BsrGI fwd	gat gca ccg gtg tac agt aaa gca tgg tat gct	Klonierung/ Mutagenese
SLP-65 AgeI/BsrGI rev	act gta cac cgg tgc atc ctg gtc agc agt act	Klonierung/ Mutagenese
SLP-65 dLZ 1-45 BgIII fwd	aga tct cgc cac cat gat ttg caa aac tgg gaa aga tac	Klonierung/ Mutagenese
BamHI Grb2 fwd	gtg tgg gat cca tcg ccc tta tgg aag cca	Klonierung/ Mutagenese
BamHI Grb2 rev	gcg atg gat ccc aca ctg gcg gcc gtt act	Klonierung/ Mutagenese
Grb2 XmaI fwd	aac cgg aac atc ccg ggg ggc gaa ttc tgc	Klonierung/ Mutagenese
Grb2 XmaI rev	gca gaa ttc gcc ccc cgg gat gtt ccg gtt	Klonierung/ Mutagenese
EGFP EcoRI fwd	gcg gcc gcg aat tca gat cat aat c	Klonierung
EGFP EcoRI rev	gat tat gat ctg aat tcg cgg ccg c	Klonierung
nHA Dok-3 fwd	acg aat tca gat ctg acc atg tac cca tac gac gtc cca gac tac gct ctg gag aga cca gtg aag gat g	Klonierung
nHA Dok-3dPH fwd	acg aat tca gat ctg acc atg tac cca tac gac gtc cca gac tac gct ctg gcc ttt cag ggc aaa aag g	Klonierung

Tabelle 4.3: Primer

<b>Primer</b>	<b>Sequenz 5'→ 3'</b>	<b>Verwendung</b>
Dok-3 Stopp EcoRI rev	acg aat tcc gct cac gac cag tcc cgc gc	Klonierung
BglII Dok-3 fwd	gag aga tct cac cat gga gag acc agt gaa gg	Klonierung
BglII Dok-3dPH fwd	gag aga tct cac cat ggc ctt tca ggg caa aaa gg	Klonierung/ Mutagenese
Dok-3 BspEI rev	gat tcc taa gcg tag tct ggg acg tcg tat ggg tat tcc gga agc gac cag tcc cgc gc	Klonierung/ Mutagenese
Dok-3 R26L fwd	aag att cta gca cag ctc ttt gct gcc	Mutagenese
Dok-3 R26L rev	ctg tgc tag aat ctt cct cca ggt ccg	Mutagenese
Y140-FSSW fwd	gga gaa ctg cct ctt ctc ctc gtg gca gg	Mutagenese
Y140-FSSW rev	cct gcc acg agg aga aga ggc agt tct cc	Mutagenese
R197A fwd	gcc cta ccc gtt cct cgc caa att cgg cca aga tc	Mutagenese
R197A rev	gat ctt ggc cga att tgg cga gga acg ggt agg gc	Mutagenese
Y307-FASI fwd	ctg ccc cta tag tgt ttg cct cca tcg cac g	Mutagenese
Y307-FASI rev	cgt gcg atg gag gca aac act ata ggg gca g	Mutagenese
Y331-FENI fwd	ctc ccc gag cat ctc ttt gag aac atc ttc acg	Mutagenese
Y331-FENI rev	cgt gaa gat gtt ctc aaa gag atg ctc ggg gag	Mutagenese

Tabelle 4.3: Primer

<b>Primer</b>	<b>Sequenz 5'→3'</b>	<b>Verwendung</b>
PM-Lyn fwd	gaa aga caa tct caa tga cga tga agt aga ttc gaa gac tgc gga tcc acc ggt cgc cac c	Klonierung/ Mutagenese
PM-Lyn rev	att gag att gtc ttt cct ttt tga ttt aat aca tcc cat ggt gcc cgc ggt acc gtc gac t	Klonierung/ Mutagenese
NTAL fwd	gag aga tct cac cat ggc gca gcc gga gct gct g	Megaprime- PCR
NTAL bridge rev	gcg ggg ctc agc act gct ctc	Megaprime- PCR
Dok3 ΔPH bridge fwd	ggc ttt gag agc agt gct gag ccc cgc gcc ttt cag ggc aaa aag gaa g	Megaprime- PCR
GFP bridge fwd	ggc ttt gag agc agt gct gag ccc cgc ctg gtg agc aag ggc gag gag c	Megaprime- PCR
PLCδ1 BglII fwd	cgc aga tct cac cat gga ctc cgg tcg gga ctt c	Klonierung
PLCδ1Agel/BamHI rev	agc gga tcc cga ccg gtc atg gag ccc gag cgg tcg at	Klonierung/ Mutagenese
pMSCV fwd	ccc ttg aac ctc ctc gtt cga cc	Sequenzierung
pMSCV rev	gag acg tgc tac ttc cat ttg tc	Sequenzierung
cDok3 PH 88 EcoRI fwd	taa tga att cat gga gag acc agt gaa gga tg	GST- Fusionsprotein
cDok3 PH 474 XhoI rev	taa tct cga gca gac cgg tgc tgc tac ttt	GST- Fusionsprotein

Tabelle 4.3: Primer

Alle Oligonucleotid-Primer wurden von MWG-Biotech bezogen.



#### 4.10 cDNA-Konstrukte

Konstrukt	Eigenschaft	Herstellung
Cit SLP-65	N-ter. Citrin-markiertes Hühner SLP-65	Klonierung <sup>1)</sup>
Cit SLP-65 $\Delta$ LZ	N-ter. Citrin-markiertes Hühner SLP-65 $\Delta$ AS 1-45	Mutagenese/ Klonierung
Cit SLP-65 $\Delta$ SH2	N-ter. Citrin-markiertes Hühner SLP-65 $\Delta$ AS 436-552	Mutagenese/ Klonierung
Cit SLP-65 Y <sup>all</sup> F	N-ter. Citrin-markiertes Hühner SLP-65 Y <sup>91</sup> , 103, 115, 194, 205 <sub>F</sub>	Klonierung
SLP-65 GFP	C-ter. EGFP <sub>mono</sub> -markiertes Hühner SLP-65	Mutagenese/ Klonierung
SLP-65 $\Delta$ LZ GFP	C-ter. EGFP <sub>mono</sub> -markiertes Hühner SLP-65 $\Delta$ AS 1-45	Mutagenese/ Klonierung <sup>1)</sup>
SLP-65 $\Delta$ SH2 GFP	C-ter. EGFP <sub>mono</sub> -markiertes Hühner SLP-65 $\Delta$ AS 436-552	Mutagenese/ Klonierung
SLP-65 Y <sup>all</sup> F GFP	C-ter. EGFP <sub>mono</sub> -markiertes Hühner SLP-65 Y <sup>91</sup> , 103, 115, 194, 205 <sub>F</sub>	Mutagenese/ Klonierung
Grb2 GFP	C-ter. EGFP-markiertes Hühner Grb2	Mutagenese/ Klonierung
Grb2 P <sup>49</sup> L GFP	C-ter. EGFP-markiertes Hühner Grb2 P <sup>49</sup> L (N-ter. SH3-Do.)	Mutagenese/ Klonierung
Grb2 R <sup>86</sup> L GFP	C-ter. EGFP-markiertes Hühner Grb2 R <sup>86</sup> L (zentr. SH2-Do.)	Mutagenese/ Klonierung
Grb2 W <sup>193</sup> K GFP	C-ter. EGFP-markiertes Hühner Grb2 W <sup>193</sup> K (C-ter. SH3-Do.)	Mutagenese/ Klonierung
HA Dok-3	N-ter. HA-markiertes Hühner Dok-3	Mutagenese

Tabelle 4.4: cDNA-Konstrukte

Konstrukt	Eigenschaft	Herstellung
HA Dok-3 ΔPH	N-ter. HA-markiertes Hühner Dok-3 ΔAS 1-113	Mutagenese <sup>2)</sup>
HA Dok-3 R <sup>197</sup> A	N-ter. HA-markiertes Hühner Dok-3 R <sup>197</sup> A	Mutagenese
HA Dok-3 Y <sup>140</sup> F	N-ter. HA-markiertes Hühner Dok-3 Y <sup>140</sup> F	Mutagenese <sup>2)</sup>
HA Dok-3 Y <sup>307</sup> F	N-ter. HA-markiertes Hühner Dok-3 Y <sup>307</sup> F	Mutagenese <sup>2)</sup>
HA Dok-3 Y <sup>331</sup> F	N-ter. HA-markiertes Hühner Dok-3 Y <sup>331</sup> F	Mutagenese <sup>2)</sup>
HA Dok-3 Y <sup>331</sup> <sub>only</sub>	N-ter. HA-markiertes Hühner Dok-3 Y <sup>140, 307</sup> F	Mutagenese B.Stork <sup>2)</sup>
Dok-3 GFP	C-ter. EGFP <sub>mono</sub> -markiertes Hühner Dok-3	Mutagenese/ Klonierung
Dok-3 ΔPH GFP	C-ter. EGFP <sub>mono</sub> -markiertes Hühner Dok-3 ΔAS 1-113	Mutagenese/ Klonierung
Dok-3 R <sup>26</sup> L GFP	C-ter. EGFP <sub>mono</sub> -markiertes Hühner Dok-3 R <sup>26</sup> L	Mutagenese
Dok-3 Y <sup>331</sup> F GFP	C-ter. EGFP <sub>mono</sub> -markiertes Hühner Dok-3 Y <sup>331</sup> F	Mutagenese
Dok-3 ΔY <sup>331</sup> ENI- Grb2-SH3 GFP	C-ter. Grb2-SH3 (AS 151-217) an Dok-3 ΔAS 323-426; C-ter. EGFP-markiert	Klonierung
Dok-3 ΔY <sup>331</sup> ENI- Grb2-W <sup>193</sup> K GFP	C-ter. Grb2-W <sup>193</sup> K (AS 151-217) an Dok-3 ΔAS 323-426; C-ter. EGFP-markiert	Klonierung
LynPM 1-23 Dok-3 ΔPH GFP	Maus Lyn AS 1-23 an Dok-3 ΔAS 1-113; C-ter. EGFP-markiert	PCR/ Klonierung
NTAL Dok-3 ΔPH GFP	Hühner NTAL AS 1-94 an Dok-3 ΔAS 1-113; C-ter. EGFP-markiert	Megaprime- PCR

Tabelle 4.4: cDNA-Konstrukte

Konstrukt	Eigenschaft	Herstellung
PLC $\delta$ 1 PH Dok-3 $\Delta$ PH GFP	Maus PLC $\delta$ 1 AS 1-139 an Dok-3 $\Delta$ AS 1-113; C-ter. EGFP-markiert	Klonierung
PLC $\delta$ 1 PH	Maus PLC $\delta$ 1 AS 1-139	RT-PCR/ Klonierung

Tabelle 4.4: cDNA-Konstrukte

<sup>1)</sup> in Zusammenarbeit mit M. Engelke

<sup>2)</sup> in Zusammenarbeit mit STORK et al., 2007

Die cDNAs codierend für Hühner Grb2, Grb2 P<sup>49</sup>L, Grb2 R<sup>86</sup>K, Grb2 W<sup>193</sup>K, Hühner NTAL sowie Hühner Dok-3 wurde von B. Stork zur Verfügung gestellt (STORK et al., 2004; STORK et al., 2007). Die cDNAs codierend für Hühner SLP-65 und SLP-65 Y<sup>all</sup>F wurden bereits im Rahmen der eigenen Diplomarbeit hergestellt bzw. genutzt.

#### 4.11 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Verwendung
BL21 (D3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3)	Expression von GST-Fusionsproteinen
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\Phi$ 80/ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>endA1 recA1 relA1 gyrA96 hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> , m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44 thi-1 <math>\lambda</math>-T1R</i>	Plasmid-Amplifikation
TOP10F'	F[ <i>lacI<sup>q</sup> Tn10</i> (Tet <sup>R</sup> )] <i>mcrA <math>\Delta</math>(mrr-hsdRMS-mcrBC) <math>\Phi</math>80/lacZ<math>\Delta</math>M15 <math>\Delta</math>lacX74 recA1 araD139 <math>\Delta</math>(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG</i>	Plasmid-Amplifikation
XL1 blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F <sup>-</sup> <i>proAB lacI<sup>q</sup>Z<math>\Delta</math>M15 Tn10</i> (Tet <sup>R</sup> )]	Plasmid-Amplifikation

Tabelle 4.5: verwendete Bakterienstämme

## 4.12 Zelllinien

### *DT40 (ATCC Number: CRL-2111)*

Die Hühner B-Zelllinie DT40 wurde aus einem ALV (*avian leucosis virus*)-induzierten bursalen Lymphom etabliert (BABA and HUMPHRIES, 1984; BABA et al., 1985). DT40-Zellen exprimieren Oberflächen-IgM, die anti-IgM-Stimulation resultiert in der Apoptose der DT40 B-Zellen vergleichbar der Eliminierung autoreaktiver B-Zellen (TAKATA et al., 1995).

DT40-Variante	Quelle
<i>dok-3</i> <sup>-/-</sup> DT40	(STORK et al., 2007)
<i>grb2</i> <sup>-/-</sup> DT40	(HASHIMOTO et al., 1998)
<i>lyn</i> <sup>-/-</sup> DT40	(TAKATA et al., 1994)
<i>slp-65</i> <sup>-/-</sup> DT40	(ISHIAI et al., 1999b)
<i>syk</i> <sup>-/-</sup> DT40	(TAKATA et al., 1994)

Tabelle 4.6: verwendete DT40-Zelllinien

### *Platinum-E (Plat-E)*

Plat-E-Zellen stellen eine auf HEK293T-Zellen basierende Verpackungszelllinie für die Produktion rekombinanter Retroviren dar. Die Zellen exprimieren die viralen Gene (MMLV) *gag-pol* und *env* unter der Kontrolle des EF1 $\alpha$  Promotors. Die Expression beider Gene ist dabei über eine IRES (*internal ribosome entry site*) mit der Expression Selektionsmarker-codierender Gene verknüpft (*gag-pol*: Blasticidin; *env*: Puromycin) (MORITA et al., 2000).

## 5. Methoden

### 5.1 Molekularbiologische Methoden

#### 5.1.1 Restriktionsspaltung von DNA

Die sequenzspezifische, hydrolytische Spaltung von DNA-Molekülen erfolgte unter Verwendung von Restriktionsendonucleasen. Die entsprechenden Enzyme wurden in den zugehörigen Puffern gemäß den Herstellerangaben eingesetzt.

#### 5.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese erlaubt die Auftrennung von DNA-Fragmenten anhand ihrer Größe. Zur Herstellung von Agarose-Gelen wurde eine 0,8-2 %ige Agarose-TAE oder -TBE-Pufferlösung (w/v) erhitzt, mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,5 µg/mL) und anschließend in einer Elektrophorese-Kammer erstarren lassen. Die DNA-Proben wurden mit einer entsprechenden Menge 6x DNA-Ladepuffer versetzt und parallel zu einem DNA-Größenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in einer mit TAE- oder TBE-Puffer befüllten Gel-Kammer unter einer Spannung von 5 V/cm Elektrodenabstand. Anschließend wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente durch Bestrahlung des Agarose-Gels mit UV-Licht (302 nm) visualisiert (590 nm).

TAE-Puffer (50 x)	2 M Tris/Essigsäure, pH 7,8; 0,5 M NaOAc; 50 mM EDTA, pH 8,0
TBE-Puffer (10 x)	0,9 M Tris; 0,9 M Borsäure; 10 mM EDTA, pH 8,0
6 x DNA-Ladepuffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 15 % (w/v) Ficoll

#### 5.1.3 DNA-Isolierung aus Agarose-Gelen

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen erfolgte mit dem *NucleoSpin® Extract II-kit* (Macherey-Nagel) gemäß den Herstellerangaben. Zur Elution der DNA wurden 20-50 µL ddH<sub>2</sub>O eingesetzt.

#### 5.1.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration von DNA- und RNA-Lösungen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die optischen Dichte der Lösung korreliert in folgender Abhängigkeit mit der DNA- bzw. RNA-Konzentration:

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

$$OD_{260} = 1 \cong 40 \mu\text{g/mL ssDNA in H}_2\text{O}$$

Der Reinheitsgrad der DNA und RNA kann über den Quotienten der optischen Dichte der Lösung bei 260 und 280 nm abgeschätzt werden:

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

$$\text{Reine RNA } OD_{260}/OD_{280}: \geq 2,0$$

#### 5.1.5 5'-Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Die Abspaltung der 5'-PO<sub>4</sub>-Enden eines linearisierten Vektors verhindert die Religation des Vektors und die Bildung von Vektor-Konkatameren in einer nachfolgenden Ligation. Die selektive enzymatische Hydrolyse der 5'-Phosphatgruppen linearisierter Vektor-DNA erfolgte mit Hilfe der *calf intestine phosphatase* (CIP). Dazu wurde ein Restriktionsverdau direkt mit 1 U CIP pro 20 µL Reaktionsvolumen versetzt und max. 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die dephosphorylierte DNA einer Gelelektrophorese unterzogen (5.1.2) oder unmittelbar aufgereinigt (5.1.3).

#### 5.1.6 Auffüllen 3'-rezessiver DNA-Enden

3'-rezessive DNA-Enden wurden durch Zugabe von 3 U Klenow-Fragment und 2 µL dNTPs (je 2,5 mM) pro 20 µL Restriktionansatz und 20 min Inkubation bei 37 °C aufgefüllt. Anschließend wurde die DNA einer Gelelektrophorese unterzogen (5.1.2) oder unmittelbar aufgereinigt (5.1.3).

#### 5.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von linearisierter Vektor-DNA mit DNA-Fragmenten (*insert*) über die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen den 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphat-Enden der DNA-Moleküle wurde das Enzym T4-DNA-Ligase verwendet.

Ein Standard-Ligationsansatz von 10  $\mu\text{L}$  enthielt:

1  $\mu\text{L}$  Vektor

7,5  $\mu\text{L}$  *insert*

1  $\mu\text{L}$  10x Ligase-Puffer

0,5  $\mu\text{L}$  T4-DNA-Ligase (3 U)

Parallel zum Ligationsansatz wurde eine Vektorkontrolle angesetzt, die bis auf das *insert* alle Komponenten des Ligationsansatzes enthielt. Nach Inkubation für  $\geq 20$  min bei 22  $^{\circ}\text{C}$  wurden 5  $\mu\text{L}$  der Ansätze direkt für die Transformation von kompetenten Bakterien eingesetzt.

### 5.1.8 Herstellung transformationskompetenter *E.coli*-Bakterien

Zur Herstellung transformationskompetenter *E.coli*-Bakterien wurden 5 mL LB-Medium mit einem entsprechenden *E.coli*-Stamm (vergl. 4.11) angeimpft und über Nacht im Schüttelinkubator bei 37  $^{\circ}\text{C}$  kultiviert. Mit 900  $\mu\text{L}$  dieser Übernachtskultur wurden 150 mL LB-Medium angeimpft und bis zum Erreichen einer  $\text{OD}_{578}$  von 0,45-0,55 unter Schütteln bei 37  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 10 min auf Eis gelagert, bei 2000 rpm und 4  $^{\circ}\text{C}$  für 10 min zentrifugiert und das erhaltene Bakterienpellet in 30 mL TFB I resuspendiert. Nach erneuter Inkubation auf Eis für 10 min und Zentrifugation wurden die Bakterien in 6 mL TFB II aufgenommen. Diese Bakteriensuspension wurde zu 50  $\mu\text{L}$  in Eppendorfgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff (-196  $^{\circ}\text{C}$ ) schockgefroren. Die weitere Aufbewahrung der nun transformationskompetenten Bakterien erfolgte bei -80  $^{\circ}\text{C}$ .

LB-Medium	10 g Pepton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; auf 1000 mL $\text{H}_2\text{O}$ auffüllen; autoklavieren; 4 $^{\circ}\text{C}$
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 $^{\circ}\text{C}$
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 $^{\circ}\text{C}$

### 5.1.9 Transformation kompetenter Bakterien

Transformationskompetente *E.coli*-Bakterien binden an ihrer Oberfläche DNA, die infolge eines Hitzeimpulses die Zellmembran passieren kann. 50 µL einer frisch aufgetauten Suspension transformationskompetenter *E.coli*-Bakterien wurden mit max. 5 µL DNA-Lösung für ≤ 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 45 s einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt, für 2 min auf Eis abgekühlt und schließlich mit 250 µL vorgewärmten LB-Medium (37 °C) versetzt. Diese Bakteriensuspension wurde für 20-30 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, bevor die Suspension auf vorgewärmten LB-Ampicillin- bzw. LB-Kanamycin-Agarplatten (37 °C) ausgestrichen wurden. Bei der Transformation von pCRII-TOPO-Konstrukten wurden die LB-Ampicillin-Agarplatten zusätzlich mit IPTG/X-Gal behandelt, um eine Blau/Weiß-Selektion zu ermöglichen. Nach einer Inkubation der Platten bei 37 °C über Nacht wurde das Wachstum der transformierten Bakterien begutachtet.

LB-Agar-Platten	20 g Select Agar auf 1000 mL LB-Medium; autoklavieren und auf 60 °C abkühlen lassen; Zugabe von 50-100 µg/mL Ampicillin bzw. 30-50 µg/mL Kanamycin; 4 °C
IPTG/X-Gal-Platten	40 µL IPTG (0,1 M) und 40 µL X-Gal (40 mg/mL) pro LB-Agar-Platte

### 5.1.10 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur analytischen Isolierung von Plasmid-DNA wurden 3 mL LB-Ampicillin- bzw. LB-Kanamycin-Medium mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die anschließende Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem *Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification System* (Promega) gemäß den Herstellerangaben. Die Elution der DNA wurde mit 80 µL Elutionspuffer oder ddH<sub>2</sub>O vorgenommen. Zur Aufreinigung größerer Mengen Plasmid-DNA wurden 50-250 mL LB-Ampicillin- bzw. LB-Kanamycin-Medium angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C über Nacht kultiviert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des *NucleoBond® PC 100* bzw. *PC 500 kits* (Macherey-Nagel) nach den Angaben des Herstellers.



### 5.1.11 Langzeitaufbewahrung von Bakterienstämmen

Zur Langzeitlagerung von *E.coli*-Stämmen wurden 2 mL einer frischen Bakterienkultur für 5 min bei RT und 3000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde 1 mL des Überstandes verworfen und das Bakterienpellet in dem verbleibenden Medium und 1 mL zugesetztem Glycerin resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

### 5.1.12 RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen wurde das *RNeasy® Mini Kit* (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt. Die Homogenisierung der Zellysate erfolgte mit Hilfe des *QIAshredder™ Kits* (Qiagen). Die erhaltene Gesamt-RNA wurde mit ddH<sub>2</sub>O eluiert und unmittelbar für die reverse Transkription (5.1.13) eingesetzt oder bei -80 °C gelagert.

### 5.1.13 Reverse Transkription

Die reverse Transkription von Gesamt-RNA in Einzelstrang-cDNA erfolgte unter Benutzung des *RevertAid™ H Minus First Strand cDNA-Synthesis Kits* (MBI Fermentas). Der eingesetzten *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (MMLV-RT) fehlt die Ribonuclease H-Aktivität für RNA in RNA-DNA-Hybriden. Zwischen 50 ng und 1 µg der Gesamt-RNA wurden in 11 µL RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O mit 1 µL Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primer versetzt und für 5 min bei 70 °C denaturiert. Nach anschließender Abkühlung auf Eis wurden dem Ansatz Reaktionspuffer, Ribonucleaseinhibitor und dNTPs hinzugefügt:

- 11 µL RNA (50 ng-1 µg)
- 1 µL Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primer (0,5 µg/µL)
- 4 µL 5x Reaktionspuffer
- 1 µL Ribonucleaseinhibitor (20 U/µL)
- 2 µL dNTPs (je 2,5 mM)
- 1 µL MMLV-Reverse Transkriptase (200 U/µL)

Nach Inkubation bei 37 °C für 5 min wurde 1 µL MMLV-Reverse Transkriptase zugegeben und die cDNA-Synthese für 1 h bei 42 °C durchgeführt. Die erhaltene Einzelstrang-cDNA wurde direkt im PCR-Verfahren amplifiziert (5.1.14) oder bei -80 °C gelagert.

### 5.1.14 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erlaubt die selektive *in vitro*-Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase (MULLIS et al., 1986; MULLIS and FALOONA, 1987; SAIKI et al., 1988). Der zu amplifizierende DNA-Bereich wird durch zwei synthetische Oligonucleotide (*forward*- und *reverse*-Primer) definiert, die sich antiparallel zueinander an komplementäre Sequenzen der Matrizen-DNA (Templat-DNA) anlagern und die Startpunkte der DNA-Synthese darstellen. Für die analytische PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Taq-DNA-Polymerase eingesetzt. Bei präparativen PCR-Ansätzen wurde mit Pfu oder Pfx<sub>50</sub> gearbeitet, beide Polymerasen verfügen über eine 3'-5'-Korrekturlesefunktion. Eine Standard-PCR wurde in 25-50 µL Volumen auf Eis angesetzt und unmittelbar in einen auf 95 °C vorgeheizten PCR-Cycler eingesetzt (*pseudo hot start*).

Komponente	Standard-Ansatz	Konzentrationsbereich
DNA-Templat	0,5 ng/µL	0,2-1 ng/µL
5'-Primer	0,2 pmol/µL	0,1-0,4 pmol/µL
3'-Primer	0,2 pmol/µL	0,1-0,4 pmol/µL
dNTPs	0,2 mM	0,1-0,6 mM
PCR-Puffer	1fach	-
Taq/Pfu/Pfx <sub>50</sub>	0,06 U/µL	0,015-0,09 U/µL

Tabelle 5.1: Standard-PCR-Ansatz

Die PCR-Programme wurden auf die Prozessivität der Polymerase und die Schmelztemperatur  $T_M$  der Primer wie folgt standardmäßig abgestimmt:

Schritt	Reaktion	T [°C]	t	Zyklen
1	Initiale Denaturierung	95	2 min 30 s	-
2	Denaturierung	95	30 s	25
3	Primeranlagerung	52-64	30 s	
4	Primerelongation	72 <sub>Taq</sub> /68 <sub>Pfu/Pfx50</sub>	1 min/kb <sub>Taq/Pfx50</sub> 2 min/kb <sub>Pfu</sub>	
5	Finale Elongation	72	5 min	-
6	Reaktionsende	12	∞	-

Tabelle 5.2: Standard-PCR-Programm

Die gewonnenen PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese analysiert, direkt für die weitere Klonierung eingesetzt oder mit Hilfe des *TOPO-Cloning Kits* (5.1.15) gesichert.

#### **5.1.14.1 Zielgerichtete Mutagenese**

Die zielgerichtete Mutagenese einer DNA-Sequenz erfolgte mit Hilfe von Oligonucleotid-Primern, die die gewünschte Nucleotid-Sequenz (Substitution, Insertion oder Deletion von Nucleotiden) in einer ansonsten zur Templat-DNA komplementären Primer-Sequenz tragen. Bei der Mutagenese terminaler DNA-Abschnitte wurde die Sequenzmodifikation in den 5'-Bereich der Primer gelegt und das erhaltene PCR-Produkt unmittelbar für die weitere Verwendung eingesetzt. Für die Mutagenese von Plasmiden wurde die gewünschte Mutation zentral in die korrekte Primersequenz von jeweils 10-15 Basen platziert. Somit sind beide Primer komplementär für die gegenüberliegenden Bereiche der doppelsträngigen Plasmid-DNA und bei der Primerelongation entstehen mutierte Plasmid-Moleküle mit versetzten Einzelstrangbrüchen. Nach der Mutagenese-PCR wurde die methylierte Templat-DNA spezifisch mit Hilfe der Endonuclease DpnI verdaut (1 µL DpnI pro 50 µL PCR-Ansatz; 1 h Inkubation bei 37 °C). Das verbleibende Mutageneseprodukt wurde anschließend direkt in kompetente TOP10F'-Bakterien transformiert.

#### **5.1.14.2 Megaprime-PCR**

Die *Megaprime*-PCR erlaubt die direkte Fusion zweier DNA-Abschnitte im PCR-Verfahren. Zunächst wurden die zu fusionierenden DNA-Fragmente in getrennten PCRs so amplifiziert, dass ein komplementärer Sequenzabschnitt im 3'-Bereich des 5'-Fragments zum 5'-Bereich des 3'-Fragments entsteht. Anschließend wurden die PCR-Produkte aufgereinigt und in einer zweiten PCR gemeinsam mit dem 5'-Primer des 5'-Fragments und dem 3'-Primer des 3'-Fragments eingesetzt. Das entstehende PCR-Produkt umfasst die nun fusionierten DNA-Fragmente.

### 5.1.15 T/A-Klonierung von PCR-Produkten

Die T/A-Klonierung mit Hilfe des *TOPO-Cloning Kits* (Invitrogen) basiert auf der komplementären Bindung von 3'-A-Überhängen des PCR-Produkts an 5'-T-Überhänge des pCRII-TOPO-Vektors. PCR-Produkte, die mit Polymerasen generiert wurden, die kein 3'-überhängendes A anfügen, mussten zuvor ein Taq-Nachbehandlung unterzogen werden. Pro 50 µL PCR-Produkt wurden 0,5 µL Taq-Polymerase und 1 µL dNTPs (10 mM) zugegeben und der Ansatz für 10 min bei 72 °C inkubiert. Anschließend wurde nach Herstellerangaben verfahren und der TOPO-Reaktionsansatz in DH5α- oder TOP10F'-Bakterien transformiert.

### 5.1.16 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Proben wurden von der Firma MWG-Biotech nach der Didesoxymethode durchgeführt (SANGER et al., 1977).

## 5.2 Zellbiologische Methoden

Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden mit steriler Ausrüstung unter HERAsafe-Sterilbänken (Heraeus) durchgeführt. Die Zelldichte von Kulturen wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt, Zentrifugationen erfolgten bei 300 g und 4 °C für 4 min in der Multifuge 3 S-R (Heraeus). Alle eingesetzten Zelllinien wurden bei 37 °C unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 %igem CO<sub>2</sub>-Anteil in HERAcell 150-Inkubatoren (Heraeus) kultiviert.

### 5.2.1 Kulturbedingungen

Die verwendeten 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. Die adhärenenten Plat-E-Zellen wurden in DMEM mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 10 µg/mL Blastocidin S, 2 µg/mL Puromycin, 50 U/mL Penicillin und 50 µg/mL Streptomycin kultiviert und mit Hilfe einer Trypsin/EDTA-Lösung geteilt. In CS und FCS enthaltene Komplementfaktoren wurden vor der Benutzung der Seren durch eine Inkubation für 30 min bei 56 °C inaktiviert.

### 5.2.2 Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen

Zum Einfrieren wurden  $1-2 \times 10^7$  Zellen geerntet, in 1 mL Einfriermedium (90 % (v/v) FCS; 10 % (v/v) DMSO) aufgenommen und in Cryo-Röhrchen (Greiner-Bio-One) überführt. Nach kurzer Kühlung auf Eis wurden die Zellen direkt bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Zur langfristigen Aufbewahrung wurden die Cryo-Kulturen nachfolgend bei  $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingelagert.

Das Auftauen eukaryotischer Zellen erfolgte durch Erwärmen im  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Wasserbad und das unmittelbare Aufnehmen in 10 mL Zellkulturmedium. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und in frischem Medium ausgesät.

### 5.2.3 Transfektion von DT40-Zellen durch Elektroporation

Für die Elektroporation von DT40-Zellen wurden 10-30  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA linearisiert, aufgereinigt und in  $\leq 50\text{ }\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O eluiert.  $1 \times 10^7$  Zellen wurden geerntet, mit PBS gewaschen und in 700  $\mu\text{L}$  PBS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in eine Elektroporationsküvette (4 mm Elektrodenabstand, Peqlab Biotechnology GmbH) überführt und mit der DNA versetzt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen bei 250 V und 960  $\mu\text{F}$  elektroporiert (GenePulser & Capacitance Extender, BioRad). Anschließend wurde die Zellsuspension für weitere 10 min auf Eis inkubiert und in 12 mL DT40-Medium resuspendiert. Nach 24 h Kultivierung wurden die Zellen abzentrifugiert, in 48 mL Selektionsmedium (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Puromycin bzw. 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Blastocidin S) aufgenommen und auf zwei 24-well-Platten ausgesät. Nach 5-10 Tagen wurden stabile Transfektanten ausgewählt und weiterkultiviert.

### 5.2.4 Transfektion von DT40-Zellen mit rekombinanten Retroviren (STORK et al., 2004)

Das retrovirale Gentransfer-Verfahren der sogenannten dritten Generation basiert auf der getrennten Bereitstellung von retroviralen Expressionsvektoren und der *gag*-, *pol*- und *env*-codierten Virusstrukturproteine durch eine Verpackungszelllinie (Plat-E, 4.12). Der retrovirale Expressionsvektor pMSCV-puro bzw. pMSCV-blast verfügt neben dem entsprechenden Selektionsmarker und der eingebrachten cDNA über das Verpackungssignal  $\Psi$  sowie die Transkriptions- und

Prozessierungselemente 5'- und 3'-LTRs (*long terminal repeats*). Nach Transfektion des retroviralen Vektors in Plat-E-Zellen steuert  $\Psi$  die Integration der viralen Vektor-Transkripte in die Virusstruktur. Es entstehen infektiöse, replikationsinkompetente Viren, die die rekombinante, retrovirale RNA tragen. Das Infektionsspektrum der Viren wird durch das von der Verpackungszelllinie bereitgestellte, virale Hüllprotein (*env*-codiert) bestimmt. Die ecotrophe Verpackungszelllinie Plat-E (spezifische Erkennung von Membranrezeptoren auf Nagerzellen) wurde mit Hilfe des Hüllproteins des *vesicular stomatitis* Virus (VSV-Glycoprotein) in eine pantrophe Verpackungszelllinie überführt (rezeptorunabhängige Fusion des Virus mit der Plasmamembran). Da die stabile Expression des VSV-G Hüllproteins toxisch ist, wurden Plat-E-Zellen parallel zum retroviralen Expressionsvektor mit pHCMV-VSV-G cotransfiziert. Die so VSV-G-pseudotypisierten Retroviren sind für die Infektion von DT40-Zellen geeignet.

#### **5.2.4.1 Transfektion von Plat-E-Zellen mit FuGENE®**

In Vorbereitung der Transfektion wurden Plat-E-Zellen so auf 6 cm Schalen ausgesät, dass sie zum Transfektionszeitpunkt eine Konfluenz von 50-60 % erreichten. Folgende Komponenten wurden in der angegebenen Reihenfolge vorsichtig gemischt:

200  $\mu$ L serumfreies RPMI 1640  
7,5  $\mu$ L FuGENE® (Roche Diagnostics)  
2  $\mu$ g retroviraler Expressionsvektor  
0,7  $\mu$ g pHCMV-VSV-G

Der Ansatz wurde 15 min bei RT inkubiert, während das Medium der Plat-E-Kultur abgenommen und vorsichtig durch 4 mL DT40-Medium ersetzt wurde. Anschließend wurde der Transfektionsansatz tropfenweise auf die Plat-E-Zellen gegeben. Nach 48 h Kultivierung wurden die Retroviren im Zellüberstand zur Infektion von DT40-Zellen eingesetzt.

#### 5.2.4.2 Retrovirale Infektion von DT40-Zellen

Der Überstand der transfizierten Plat-E-Zellen mit VSV-G-pseudotypisierten Retroviren (5.2.4.1) wurde zunächst abzentrifugiert. Anschließend wurden  $1 \times 10^6$  pelletierte DT40-Zellen in 2,5 mL des retroviralen Überstandes aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde auf eine 6 cm Schale mit 1,5 mL DT40-Medium und 4  $\mu$ L einer frischen 3 mg/mL Polybren/PBS-Lösung überführt. Nach 24 h Kultivierung wurden die Zellen abzentrifugiert und in frischem DT40-Medium aufgenommen. Nach weiteren 12-24 h wurden die Zellen unter Selektion genommen (1  $\mu$ g/mL Puromycin bzw. 50  $\mu$ g/mL Blasticidin S). Alle Arbeiten mit VSV-G-pseudotypisierten Retroviren erfolgten unter S2-Bedingungen gemäß den S2-Sicherheitsanweisungen.

#### 5.2.5 Expressionsanalyse von Fluorophorfusionsproteinen und Oberflächen-IgM am Durchflusscytometer (FACS)

Zur Analyse der Expression von Citrin/EGFP-markierten Fusionsproteinen wurden  $0,5 \cdot 10^6$  DT40-Zellen geerntet, mit 2 mL PBS gewaschen und in 0,2 mL PBS einer FACS-Messung unterzogen. Für die Analyse von Oberflächen-IgM wurden  $0,5 \cdot 10^6$  DT40-Zellen abzentrifugiert, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 0,2 mL PBS mit 2  $\mu$ L FITC-markiertem Ziege-anti-Hühner-IgM im Dunkeln für 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS wurden die Zellen in 0,2 mL PBS aufgenommen und zur Messung am Durchflusscytometer eingesetzt.

#### 5.2.6 $\text{Ca}^{2+}$ -Fluxanalyse (STORK et al., 2004)

Die Analyse der BCR-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung in DT40-Zellen erfolgte durchflusscytometrisch mit Hilfe des  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Fluorophors Indo-1. Bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm (UV-Festkörper-Laser, Lightwave electronics) unterliegt das Emissionsspektrum von Indo-1 einer  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Verschiebung von 475 nm (Indo-*blue*,  $\text{Ca}^{2+}$ -frei) zu 400 nm (Indo-*violet*,  $\text{Ca}^{2+}$ -gebunden). Die zeitliche Veränderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach BCR-Stimulation von Indo-1-beladenen Zellen kann somit durch die parallele Messung der Emission bei 530 nm und 405 nm untersucht werden. Diese Form der ratiometrischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluxanalyse minimiert Effekte einer uneinheitlichen Beladung von Zellen mit

Ca<sup>2+</sup>-sensitiven Fluorophoren und ist unabhängig von unterschiedlichen Zellgrößen innerhalb einer Zellpopulation. Die Beladung der Zellen erfolgte mit dem ungeladenen, membrangängigen Acetoxymethylester-Derivat Indo-1-AM. Innerhalb der Zellen wird die Ester-Bindung durch cytosolische Esterasen gespalten und so die Membranpassage der freien Carbonsäureform von Indo-1 erschwert. Zudem wird die Indo-1-AM-Aufnahme in die Zellen durch das nichtionische Detergenz Pluronic F-127 erleichtert und eine Kompartimentierung des Fluorophors in den Zellmembranen verhindert. 1x10<sup>6</sup> DT40-Zellen wurden geerntet, in 700 µL DT40-Medium mit 5 % FCS aufgenommen und für die Ca<sup>2+</sup>-Fluxanalyse beladen: Unter leichtem Vortexen wurden 0,7 µL Indo-1-AM (1 mM in DMSO) und 2,1 µL Pluronic F-127 (5 % (w/v) in ddH<sub>2</sub>O) zugegeben und die Zellsuspension anschließend für 25 min unter leichtem Schütteln bei 30 °C inkubiert. Nach Zugabe von 700 µL vorgewärmten DT40-Medium mit 10 % FCS wurden die Zellen für weitere 10 min bei 37 °C geschüttelt, im Anschluss zweimal mit Ca<sup>2+</sup>-haltiger Krebs-Ringer-Lösung gewaschen und in 600 µL Ca<sup>2+</sup>-haltiger Krebs-Ringer-Lösung bei 25 °C für die Messung bereitgehalten.

Die Ca<sup>2+</sup>-Fluxanalyse der Indo-1-beladenen Zellen erfolgte mit Hilfe des Durchflusscytometers LSRII (Becton Dickinson). Nachdem das Indo-1-*violet*/Indo-1-*blue*-Verhältnis für 30 s dokumentiert wurde, erfolgte die BCR-Stimulation der DT40-Zellen mit 2 µg/mL M4 und die resultierende Veränderung der Fluoreszenzrelation wurde aufgezeichnet. Für die detaillierte Analyse der Komposition eines Ca<sup>2+</sup>-Signals bezüglich der Mobilisierung intra- und extrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Ionen wurde das Ca<sup>2+</sup>-Profil der DT40-Zellen im sogenannten *add back*-Verfahren aufgenommen. Dazu wurden die Zellen wie beschrieben vorbereitet und unmittelbar vor der Messung in 600 µL Ca<sup>2+</sup>-freie Krebs-Ringer-Lösung mit 0,5 mM EGTA überführt. 30 s nach Messbeginn wurden die Zellen mit 2 µg/mL M4 BCR-stimuliert und die zeitliche Veränderung des Indo-1-*violet*/Indo-1-*blue*-Verhältnisses dokumentiert. Nach 6 min wurde die extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Ionenkonzentration auf 1 mM eingestellt und die Messung für weitere 4 min fortgesetzt. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit Hilfe der Software FlowJo und Excel.



Krebs-Ringer-Lösung	10 mM HEPES, pH 7,0; 140 mM NaCl; 4 mM KCl; 1 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM Glucose
Ca <sup>2+</sup> -haltige K-R-Lösung	+ 1 mM CaCl <sub>2</sub>
EGTA-haltige K-R-Lösung	+ 0,5 mM EGTA

### 5.2.7 Confocale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM)

Für *in vivo*-Lokalisationsstudien von fluorophormarkierten Fusionsproteinen wurden entsprechende Zellen geerntet und zweimal mit Ca<sup>2+</sup>-haltiger Krebs-Ringer-Lösung (5.2.6) gewaschen. Anschließend wurden Zellen in einer Dichte von 1x10<sup>6</sup> Zellen/400 µL Ca<sup>2+</sup>-haltiger Krebs-Ringer-Lösung in 4-Kammer-Objekträgern (4 well chambered coverglass #1.0 Lab-Tek<sup>®</sup>, Nunc) ausgesät und nach ≥ 20 min Sedimentation für die nachfolgende confocal-mikroskopische Analyse eingesetzt. Die BCR-Stimulation der Zellen erfolgte durch die Zugabe von 2 µg/mL M4. Mit Hilfe des confocalen *Laserscanning*-Systems TCS SP2 & DM IRB (Leica, Objektiv HCX PL APO 63.0x1.32 OIL UV) unter der Steuerung durch die Leica Confocal Software v2.61 wurden confocale Fluoreszenzaufnahmen erhalten. Die jeweils geeigneten Einstellungen sämtlicher Parameter wurden dabei softwarebasiert dokumentiert. Eine Standardaufnahme erfolgte bei einem digitalen Zoom von 3-5 und wurde durch die Überlagerung von vier Einzelbildern generiert (4x *frame average*), deren Bildpunkte je vierfach erfasst wurden (4x *line average*). Die erhaltenen Fluoreszenzaufnahmen und ihre entsprechenden Durchlichtbilder wurden in Adobe<sup>®</sup> Photoshop<sup>®</sup> CS2 exportiert und repräsentative Bildausschnitte von 23,55 x 23,55 µm Originalgröße ausgewählt.

Fluorophor	Anregungsmaximum	Laser	Emissionsmaximum
ECFP	433/453 nm	458 nm (Ar-Laser)	475/501 nm
EGFP	488 nm	488 nm (Ar-Laser)	507 nm
EYFP/Citrine	513 nm	514 nm (Ar-Laser)	527 nm

Tabelle 5.3: Fluorophoreigenschaften

## 5.3 Proteinbiochemische Methoden

### 5.3.1 BCR-Stimulation von DT40 B-Lymphocyten

In Vorbereitung der BCR-Stimulation wurden die DT40-Zellen geerntet, einmal mit RPMI 1640 ohne Zusätze gewaschen und in einer Dichte von  $1 \times 10^7$  Zellen/200  $\mu$ L RPMI 1640 ohne Zusätze aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension unter leichtem Schütteln für 10-15 min bei 37 °C inkubiert und die Zellen durch Zugabe von 2  $\mu$ g/mL M4 BCR-stimuliert. Nach kurzem Vortexen wurde die Stimulation für die gewünschte Zeit bei 37 °C fortgesetzt und schließlich durch das Aufnehmen der abzentrifugierten Zellen in 200  $\mu$ L eiskaltem Lysis-Puffer/ $1 \times 10^7$  Zellen beendet. Die Zelllysate wurden für 30 min auf Eis inkubiert und im Anschluss durch 10 min Zentrifugation bei  $\geq 15.000$  g und 4 °C von unlöslichen Zelltrümmern befreit. Die so erhaltenen geklärten Totallysate (*cleared cellular lysates*, CCLs) wurden mit 1/5 Volumen 5x Lämmli-Puffer versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt oder unmittelbar für Affinitätsaufreinigungen eingesetzt.

Lysis-Puffer            20 mM Tris/HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,5 mM EDTA, pH 8,0;  
10 mM NaF; 10  $\mu$ M Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>; 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 1x Protease-  
Inhibitor-Cocktail; 1 % (v/v) NP-40 oder Triton X-100

5x Lämmli-Puffer    156,25 mM Tris/HCl, pH 6,8; 15 % (w/v) SDS; 50 % (v/v)  
Glycerin; 50 mM DTT; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau

### 5.3.2 Immunpräzipitation (IP)

Für die Immunaufreinigung von Proteinen aus geklärten Totallysaten (CCLs, 5.3.1) wurden pro 200  $\mu$ L CCLs 0,5  $\mu$ g des entsprechenden Antikörpers und 20  $\mu$ L Protein-A/G-Agarose (Santa Cruz Biotech.) eingesetzt. Nach Inkubation für  $\geq 1$  h unter Rotation bei 4 °C wurde die Agarose-Matrix dreimal mit 1 mL Lysis-Puffer gewaschen und anschließend in 50  $\mu$ L 5x Lämmli-Puffer/200 $\mu$ L eingesetzter CCLs für 5 min bei 95 °C aufgekocht. Die aufgereinigten Proteine wurden einer SDS-PAGE (5.3.3) unterzogen und im Westernblot (5.3.4) analysiert.

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

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte über die diskontinuierliche Elektrophorese SDS-denaturierter, reduzierter Proteine in einer Polyacrylamid-Matrix (WEBER and OSBORN, 1969). In einem 4,8 % Polyacrylamid-Gel (Sammelgel) wurden die Proteinproben zunächst konzentriert, bevor die Proteine in der sich anschließenden Trenngel-Matrix (8-12,5 % Acrylamid) aufgetrennt wurden. Eine relative Größenbestimmung ermöglichte ein parallel aufgetrennter Proteinstandard (*broad range prestained protein marker*, New England Biolabs). Die Elektrophorese erfolgte in vertikalen Gelkammern (Biorad) bei einer Stromstärke von  $\leq 20$  mA im Sammelgel und 25-35 mA im Trenngel. Die aufgetrennten Proteine wurden nachfolgend im Westernblot-Verfahren oder durch die Färbung mit Coomassie (*coomassie brilliant blue*, R250; Serva) analysiert.

Sammelgel	125 mM Tris/HCl, pH 6,8; 4,8 % Acrylamid; 0,1 % SDS; 0,25 mM EDTA; 0,1 % TEMED; 0,1 % APS
Trenngel	375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 8-12,5 % Acrylamid; 0,1 % SDS; 0,25 mM EDTA; 0,1 % TEMED; 0,1 % APS
SDS-PAGE-Laufpuffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS

### 5.3.4 Western-Blotting

Für die spezifische, immunochemische Detektion von SDS-PAGE-aufgetrennten Proteinen wurden diese mittels vertikaler Elektrophorese aus der Gelmatrix auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. In einer *semi-dry transfer unit* (Amersham Bioscience) wurde ein Filterpapier gefolgt von der Nitrozellulosemembran, dem Polyacrylamid-Gel und ein weiteres Filterpapier luftblasenfrei auf der Anode der Apparatur platziert. Die Nitrozellulosemembran (Nitrocellulose Filter Hybond™ ECL™, Amersham Bioscience) und die Filterpapiere (Schleicher & Schell) wurden zuvor in Blotting-Puffer getränkt. Nach dem Anbringen der Kathode erfolgte der elektrophoretische Transfer bei einer Stromstärke von  $\leq 0,8$  mA/cm<sup>2</sup> Gel für 45 min. Im Anschluß wurden die auf der Westernblot-Membran immobilisierten Proteine mit Hilfe von Antikörpern spezifisch analysiert. Zunächst wurden proteinfreie Bereiche der Membran durch Inkubation in Blocking-Puffer für  $\geq 1$  h bei RT unter Schütteln abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurde die

Membran mit dem Primär-Antikörper für  $\geq 1$  h bei 4 °C inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal mit TBST für je 10 min gewaschen und für 45 min mit Meerrettichperoxidase-gekoppelten (*horseradish peroxidase*, HRPO) anti-Immunglobulin-Antikörpern inkubiert.

Anschließend wurde die Membran wiederum dreimal für je 10 min mit TBST gewaschen und zur digitalen Entwicklung (ChemiLux Imager, Intas) mit Hilfe der Westernblot-Detektionslösung ECL<sup>TM</sup> (Amersham Bioscience) eingesetzt.

Zur mehrfachen Entwicklung einer Westernblot-Membran mit verschiedenen Primär-Antikörpern gleicher Spezies wurden die bei der Erstentwicklung gebundenen Antikörper durch die Inkubation in Stripping-Puffer bei 50 °C für 30 min entfernt. Anschließend wurde die Membran gründlich mit TBST gewaschen, für  $\geq 1$ h bei RT in Blocking-Puffer inkubiert und für die erneute Entwicklung eingesetzt. Bei der Verwendung von Primär-Antikörpern verschiedener Spezies oder unterschiedlichen Isotyps wurde der zuvor eingesetzte Sekundär-Antikörper durch die Inkubation der Membran in einer 0,1 % NaN<sub>3</sub>/TBST-Lösung für  $\geq 1$ h bei RT inaktiviert. Der anschließend eingesetzte Primär-Antikörper wurde mit Hilfe von Sekundär-Antikörpern entsprechender Spezies/Isotypspezifität detektiert.

Blotting-Puffer	39 mM Glycin; 48 mM Tris; 0,0375 % (w/v) SDS; 0,01 % (w/v) NaN <sub>3</sub> ; 20 % MeOH
TBST	0,1 % (v/v) Tween-20 in TBS
Blocking-Puffer	5 % (w/v) BSA in TBST
Stripping-Puffer	2 % (w/v) SDS; 0,1 M $\beta$ -Mercaptoethanol; 62,5 mM Tris; pH 6,8

### 5.3.5 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Die Expression von Fusionsproteinen bestehend aus dem Enzym Glutathion-S-Transferase (GST) und einem Zielprotein erfolgte unter Verwendung des *GST Gene Fusion Systems* (Amersham Bioscience). Die entsprechende cDNA im Vektor pGEX-4T1 steht hierbei unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren *tac*-Promotors, so dass eine kontrollierte Expression der Fusionsproteine in

Verbindung mit dem *E.coli*-Expressionsstamm BL21(D3) möglich ist. Für die Großexpression der Fusionsproteine wurden 500 mL LB-Ampicillin-Medium mit einer frischen Übernachtskultur angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C bis zum Erreichen einer OD<sub>578</sub> von 0,6-1 inkubiert. Anschließend erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von 100 µM IPTG. Nach 4-5 h Expression wurde die Bakteriensuspension für 15 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet mit 1 mL Protease-Inhibitor-Cocktail versetzt. Im Anschluss an eine Lagerung bei -20 °C wurde das Pellet auf Eis aufgetaut und in 20 mL eisgekühltem Bakterien-Lysis-Puffer resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch 4x30 Ultraschall-Schläge und anschließender Zugabe von 2 mL einer 10 % Triton-X-100-Lösung. Unlösliche Bestandteile wurden nach 30 min Inkubation auf Eis durch Zentrifugation für 1 h bei 6000 rpm und 4 °C abgetrennt. Die Aufreinigung der GST-Fusionsproteine aus dem Überstand erfolgte durch die Zugabe von 1 mL 50 % Glutathion-Sepharose-Suspension (*Glutathione Sepharose 4 Fast Flow Slurry*, Amersham Pharmacia) und Inkubation bei 4 °C im Überkopfschüttler für ≥ 1 h. Nachfolgend wurde die Sepharose-Matrix dreimal mit 10 mL kaltem Bakterien-Lysis-Puffer gewaschen. Zur Elution der Fusionsproteine wurde die Sepharose-Matrix mit 2 mL Elutionspuffer für 20 min im Überkopfschüttler bei 4 °C inkubiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender *Coomassie*-Färbung.

Bakterien-Lysis-Puffer                      50 mM Tris/HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl; 5 mM DTT; 1x Proteinase-Inhibitor-Cocktail

Elutionspuffer                                50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 mM Glutathion

### 5.3.6 Lipidbindungsanalyse von GST-Fusionsproteinen mit *PIP Strips*<sup>TM</sup>

Mit Hilfe von *PIP Strips*<sup>TM</sup> (Echelon Biosciences) wurde die Bindung von GST-Fusionsproteinen an verschiedene, biologisch aktive Lipide untersucht. Die Lipide sind dabei auf einer hydrophoben Membran immobilisiert. Nach Absättigung der *PIP Strips*<sup>TM</sup> in Blocking-Puffer für 1 h unter Schütteln wurde die Membran mit ~0,5 µg/mL des Fusionsproteins in Blocking-Puffer für ≥ 1 h inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit Blocking-Puffer gewaschen und auf die

Bindung der GST-Fusionsproteine mit Hilfe von anti-GST-Antikörpern analog der Entwicklung einer Westernblot-Membran untersucht (5.3.4).

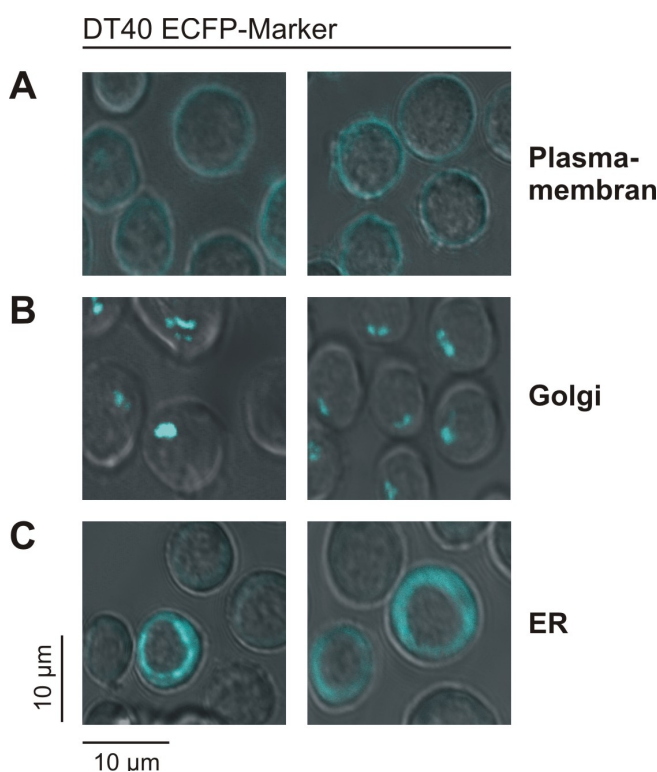
Blocking-Puffer                      3 % (w/v) fettsäurefreies BSA (Sigma) in TBST

## 6. Ergebnisse

Eine Voraussetzung für die intrazelluläre Signalübertragung und die BCR-induzierte  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung in B-Lymphocyten ist die koordinierte Rekrutierung von Adapter- und Effektorproteinen an die Plasmamembran. Sowohl die Initiation als auch die Regulation der  $Ca^{2+}$ -Antwort erfolgen über die stimulationsabhängige Bildung multimerer Signalleitungsmodule. Das Ziel dieser Arbeit ist es, die kinetische und räumliche Dynamik der subzellulären Relokalisation von Adapterproteinen im Kontext der antigeninduzierten  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung zu analysieren.

### 6.1 Morphologische Merkmale der DT40 B-Zelllinie

Als Zellsystem wurde die B-Zelllinie DT40 gewählt, die es erlaubt, Signalkomponenten in ihren entsprechend genetisch defizienten DT40-Varianten zu untersuchen. Für die Beurteilung der subzellulären Lokalisation eines Proteins ist die Kenntnis von morphologischen Eigenschaften der verwendeten Zellen erforderlich. Demzufolge wurden zunächst DT40-Zellen generiert, die ECFP-Fusionsproteine exprimieren, welche verschiedene Zellkompartimente markieren. Die eingesetzten Markerproteine enthalten die Lokalisationsmodule von Neuromodulin (Plasmamembran), PTP1B (ER) und der  $\beta$ -1,4-Galactosyltransferase (Golgi-Apparat) (BD Bioscience Clontech; (HAJ et al., 2002)). Abbildung 6.1 zeigt die confocal-mikroskopische Analyse der entsprechenden DT40-Zellen.



**Abbildung 6.1:**

#### Morphologische Merkmale von DT40 B-Lymphocyten

Die subzelluläre Verteilung von ECFP-Markerproteinen (*enhanced cyan fluorescent protein*) für die Plasmamembran (**A**), den Golgi-Apparat (**B**) und das endoplasmatische Retikulum (ER) (**C**) in DT40-Zellen wurde mit Hilfe von confocaler *Laserscanning-Mikroskopie* (CLSM) analysiert. Dargestellt sind je zwei übereinandergelegte Fluoreszenz- und Durchlichtaufnahmen.

Bereits im Durchlicht ist das Ausmaß des Zellkerns als Phasenkontrast im zentralen Bereich der Zellen erkennbar (Abb. 6.1B). Die Plasmamembran wird durch eine klar definierte Fluoreszenz des Neuromodulin-ECFP-Markers gekennzeichnet (Abb. 6.1A). Das Markerprotein für den Golgi-Apparat ist in einem deutlich abgegrenzten Bereich einseitig zwischen Zellkern und der Plasmamembran lokalisiert (Abb. 6.1B). Die Markierung des endoplasmatischen Retikulums mit Hilfe des PTB1B-Fusionsproteins führt zu einer gleichförmig vom Zellkern ausgehenden Fluoreszenz des kernumgebenden Bereichs. Nach diesen Daten weisen DT40 B-Lymphocyten somit einen ausgedehnten Zellkern auf, der den Großteil des Zellvolumens ausfüllt. Kernassoziiert schließt sich ein für Zellen mit sekretorischen Aufgaben typisch ausgeprägtes ER an.

## 6.2 Subzelluläre Lokalisation von SLP-65

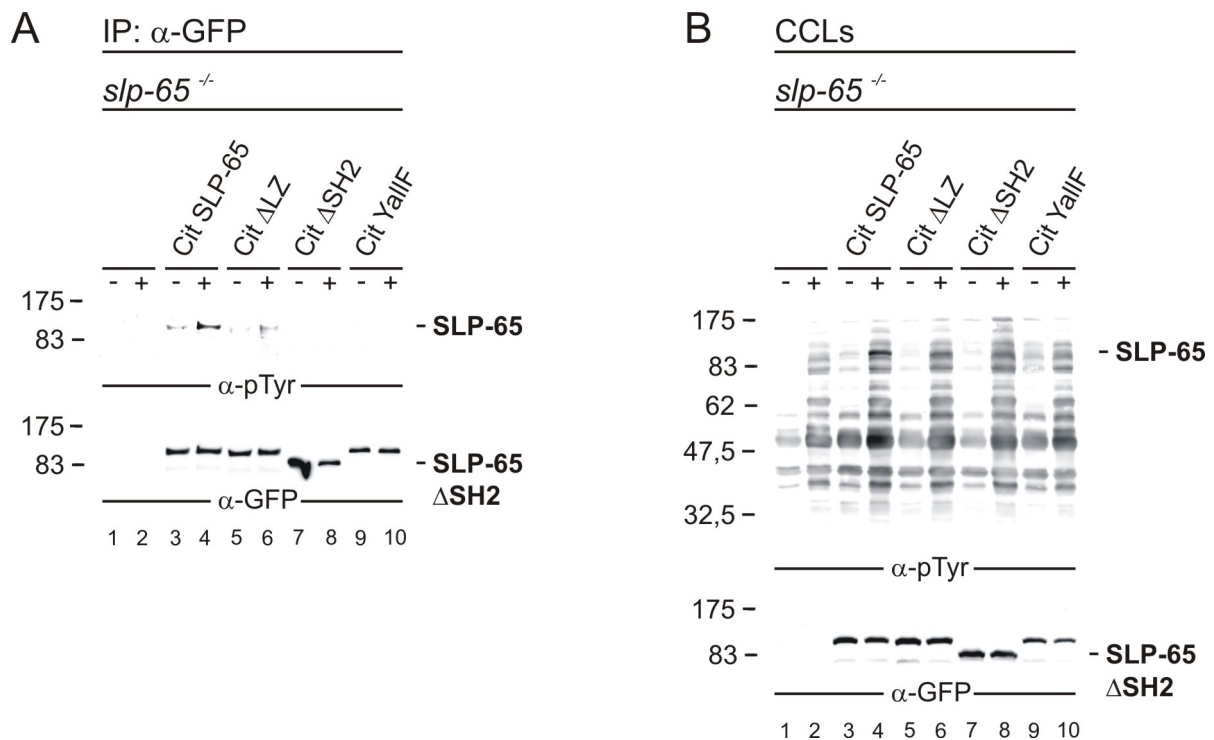
Das Adapterprotein SLP-65 dient als Plattform für die Bildung des  $Ca^{2+}$ -Initiationskomplexes und ist somit essentiell für die BCR-induzierte  $Ca^{2+}$ -Antwort in B-Lymphocyten. Viele molekulare Aspekte der SLP-65-Funktion und die Identität verschiedener Bindungspartner konnten bereits mit Hilfe biochemischer Methoden aufgeklärt werden (CHIU et al., 2002; KORETZKY et al., 2006). Weitgehend ungeklärt ist jedoch, wie das cytosolische Adapterprotein räumlich in die BCR-proximale Signalleitung an der Plasmamembran einbezogen wird. Bisherige Studien zeigen den möglichen Einfluss eines als *leucine zipper*-Motiv beschriebenen N-terminalen Bereichs und der C-terminalen SH2-Domäne auf die subzelluläre Lokalisation von SLP-65 (ENGELS et al., 2001; KOHLER et al., 2005). Mit Hilfe bildgebender Verfahren sollte die räumliche Komponente der SLP-65-Signalkomplexbildung genauer untersucht werden. Dazu wurde fluorophormarkiertes Hühner SLP-65 für die Verwendung in *slp-65*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen generiert. Neben dem wildtypischen SLP-65-Fusionsprotein wurden auch fluorophormarkierte SLP-65-Varianten hergestellt, in denen das *leucine zipper*-Motiv ( $\Delta$ LZ SLP-65, AS 1-45 deletiert) und die SH2-Domäne (SLP-65  $\Delta$ SH2, AS 436-552 deletiert) deletiert wurden. Um eine mögliche Bedeutung der SLP-65-Tyrosinmotive für die subzelluläre Organisation des Proteins zu untersuchen, wurde weiterhin eine SLP-65-Variante erstellt, in der sämtliche relevanten Tyrosinmotive durch Phenylalanin-Substitutionen (Y-F) inaktiviert wurden (SLP-65 Y<sup>all</sup>F) (CHIU et al., 2002). Als Fluorophor wurde jeweils die



fluoreszenzoptimierte Version Citrin (Cit) des *enhanced yellow fluorescent protein* (EYFP) verwendet, die gleichfalls eine Detektion mit anti-GFP-Antikörpern erlaubt (GRIESBECK et al., 2001).

### 6.2.1 Fluorophormarkiertes SLP-65 rekonstituiert BCR-Signalfunktionen

Nach Transfektion von *slp-65*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen mit Expressionsvektoren für die verschiedenen SLP-65-Fusionsproteine wurden positive Zellklone anhand ihrer Fluoreszenz identifiziert und analysiert. Um zunächst die Kopplung der Fusionsproteine Cit SLP-65, Cit ΔLZ SLP-65, Cit SLP-65 ΔSH2 und Cit SLP-65 Y<sup>allF</sup> an BCR-assoziierte PTKs zu überprüfen, wurden die immunaufgereinigten Proteine hinsichtlich der Tyrosinphosphorylierung nach BCR-Stimulation analysiert (Abb. 6.2A).

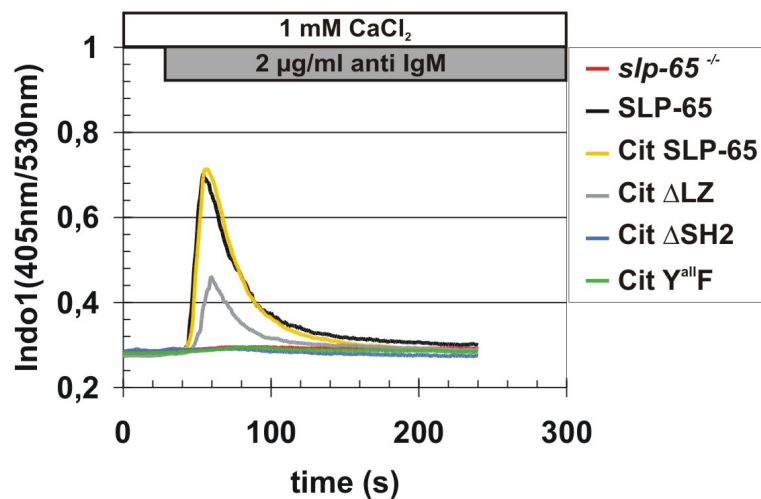


**Abbildung 6.2: Tyrosinphosphorylierung von Cit SLP-65**

Lysate aus unstimulierten (-) und für 3 min BCR-stimulierten (+) *slp-65*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen, die Cit SLP-65 (Spuren 3–4), Cit ΔLZ SLP-65 (Spuren 5–6), Cit SLP-65 ΔSH2 (Spuren 7–8) oder Cit SLP-65 Y<sup>allF</sup> (Spuren 9–10) exprimieren, wurden einer Immunpräzipitation (IP) mittels anti-GFP-Antikörper unterzogen. Die aufgereinigten Proteine wurden im anti-Phosphotyrosin-Immunoblot (α-pTyr) analysiert (A). Eine anti-GFP-Entwicklung (α-GFP) derselben Membran belegt die Aufreinigung

vergleichbarer Proteinmengen (links unten). Zudem wurden die geklärten Totallysate (*cleared cellular lysates*, CCLs) zur anti-Phosphotyrosin-Immunoblot-Analyse ( $\alpha$ -pTyr) eingesetzt (**B**). Linksseitig sind die relativen Massen eines Protein-Größenstandards angegeben.

Cit SLP-65 weist eine ausgeprägte BCR-induzierte Tyrosinphosphorylierung auf (Abb. 6.2A, Spuren 3-4). Die Deletionsmutante Cit  $\Delta$ LZ SLP-65 zeigt hingegen eine signifikant reduzierte Tyrosinphosphorylierung nach BCR-Stimulation (Spuren 5-6). Eine Phosphorylierung von Cit SLP-65  $\Delta$ SH2 (Spuren 7-8) und der Cit SLP-65 Y<sup>all</sup>F-Variante (Spuren 9-10) ist nicht zu beobachten. Die Aufreinigung äquivalenter Proteinmengen wurde über die  $\alpha$ -GFP-Entwicklung der Immunoblot-Membran bestätigt (Spuren 3-10, unten). Eine vergleichbare BCR-Stimulation der eingesetzten Zellen wurde durch die parallel zur  $\alpha$ -GFP-IP durchgeführten Immunoblot-Analyse der geklärten Totallysate belegt (Abb. 6.2B, Spuren 3-10). Komplementär zur Tyrosinphosphorylierung wurde die Funktionalität der Fusionsproteine im Kontext der BCR-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung untersucht. Dazu wurden die generierten Zelllinien Ca<sup>2+</sup>-Fluxmessungen unterzogen, die die zeitliche Veränderung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in Abhängigkeit der BCR-Stimulation dokumentieren. Die Zellen wurden mit dem Ca<sup>2+</sup>-sensitiven Fluorophor Indo1-AM beladen und nach 30 s für 4 min mit anti-IgM-Antikörpern (M4) stimuliert (Abb. 6.3). Die mit Cit SLP-65 rekonstituierten *slp-65*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen zeigen unmittelbar nach Rezeptorstimulation einen signifikanten Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, die nach etwa 2 min auf das Ausgangsniveau zurückfällt (Abb. 6.3, gelbe Linie). Dagegen vermittelt weder die Deletionsmutante Cit  $\Delta$ LZ SLP-65 (Abb. 6.3, graue Linie) noch Cit SLP-65  $\Delta$ SH2 (blaue Linie) ein wildtypisches Ca<sup>2+</sup>-Signal (schwarze Linie) in SLP-65-defizienten DT40-Zellen. Gleiches gilt für die Cit SLP-65 Y<sup>all</sup>F-Variante (Abb. 6.3, grüne Linie).



**Abbildung 6.3: Cit SLP-65 ist  $\text{Ca}^{2+}$ -kompetent**

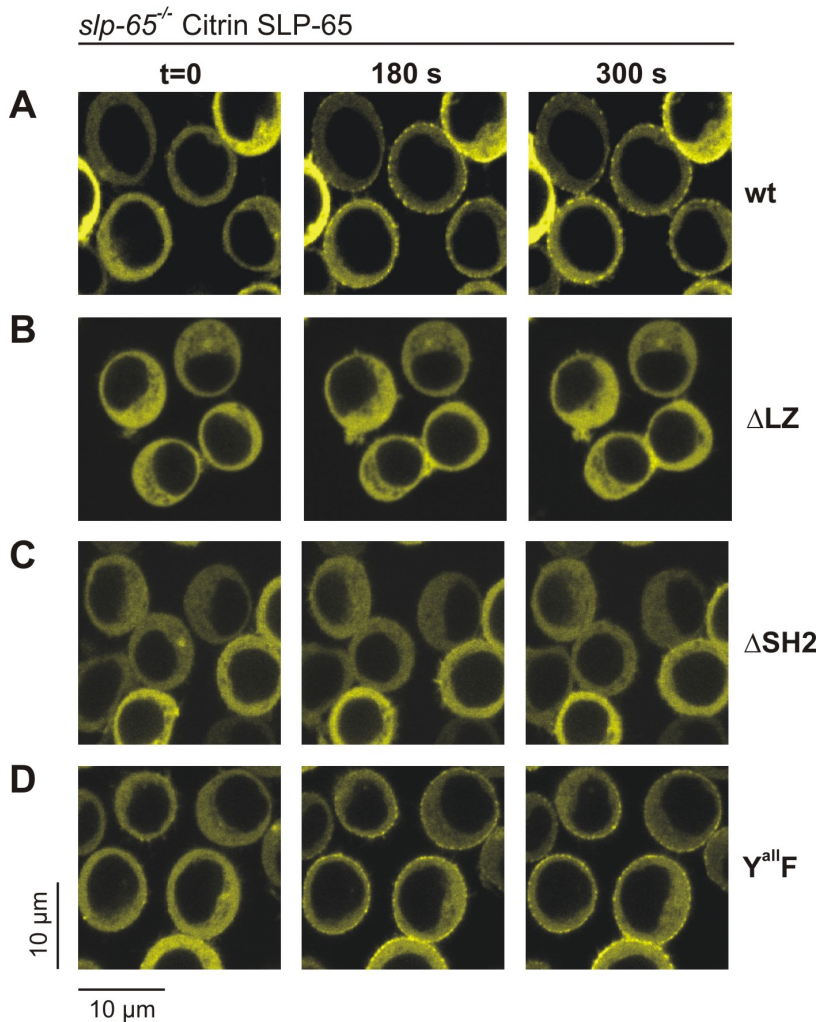
$\text{Ca}^{2+}$ -Fluxanalyse von Cit SLP-65- (gelbe Linie), Cit  $\Delta\text{LZ}$  SLP-65- (graue Linie), Cit SLP-65  $\Delta\text{SH2}$ - (blaue Linie) und Cit SLP-65  $\text{Y}^{\text{allF}}$ -exprimierenden (grüne Linie) DT40-Zellen. Als Kontrolle dienten  $\text{slp-65}^{-/-}$  (rote Linie) und mit wildtypischem SLP-65 rekonstituierte DT40-Zellen (schwarze Linie). Die Zellen wurden mit Indo1-AM beladen und für 4 min mit anti-IgM-Antikörpern in Gegenwart von 1 mM extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen stimuliert. Die zeitliche Veränderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wurde durchflusscytometrisch dokumentiert.

Somit konnte demonstriert werden, dass die Cit SLP-65-Fusionsproteine hinsichtlich der Tyrosinphosphorylierung und  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung funktionell sind. Weiterhin zeigen die Ergebnisse der  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluxanalyse von Cit  $\Delta\text{LZ}$  SLP-65- und Cit SLP-65  $\Delta\text{SH2}$ -exprimierenden  $\text{slp-65}^{-/-}$  DT40-Zellen, dass die jeweils deletierten Domänen essentiell für die BCR-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung sind.

### 6.2.2 SLP-65 unterliegt einer BCR-induzierten Plasmamembranrekutierung in DT40 B-Lymphocyten

Für eine weiterführende, detaillierte *in vivo*-Analyse der SLP-65-Membranrekutierung sollte die räumliche und kinetische Dynamik der generierten Citrin SLP-65-Fusionsproteine in  $\text{slp-65}^{-/-}$  DT40-Zellen mittels *live imaging* untersucht werden. Entsprechende Zelllinien, die die Fusionsproteine Cit SLP-65, Cit  $\Delta\text{LZ}$  SLP-65, Cit SLP-65  $\Delta\text{SH2}$  und Cit SLP-65  $\text{Y}^{\text{allF}}$  exprimieren (vergl. 6.2), wurden für Lokalisationsstudien mit Hilfe der confocalen *Laserscanning*-Mikroskopie (CLSM) eingesetzt. In den lebenden Zellen wurde die Lokalisation der

Fusionsproteine vor sowie nach Stimulation des BCRs für 3 und 5 min mit 2 µg/mL M4 dokumentiert (Abb. 6.4).



**Abbildung 6.4:**  
**SLP-65 wird BCR-induziert an die Plasmamembran rekrutiert**

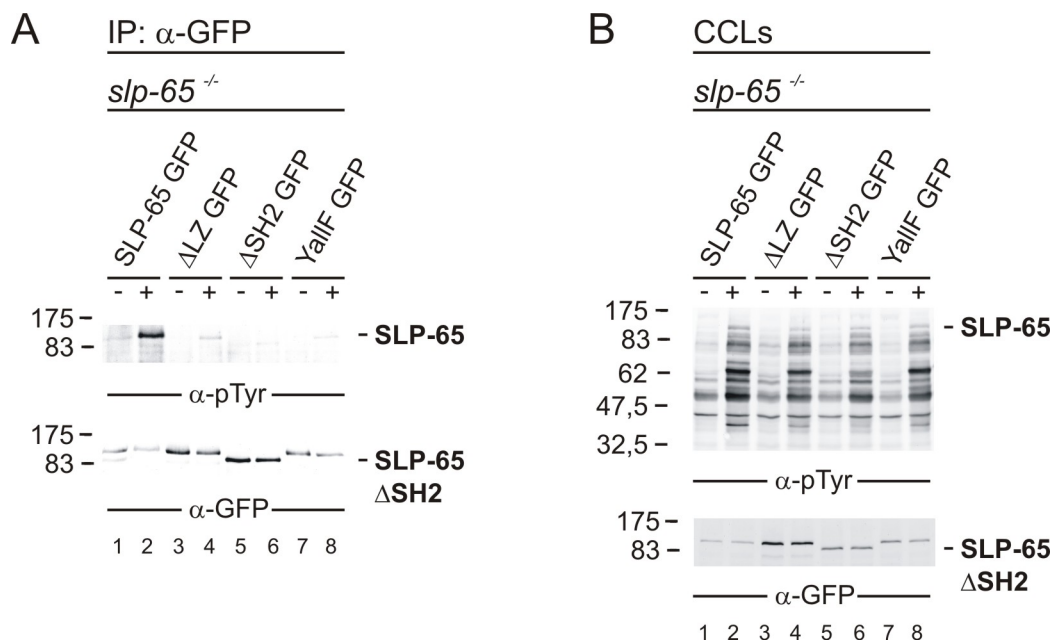
Die subzelluläre Verteilung von SLP-65 in DT40-Zellen wurde mit Hilfe von CLSM analysiert. Vor (t=0) sowie nach Stimulation der Zellen über den BCR für t=180 s und t=300 s wurde die Lokalisation der Proteine Cit SLP-65 (A), Cit ΔLZ SLP-65 (B), Cit SLP-65 ΔSH2 (C) und Cit SLP-65 Y<sup>all</sup>F (D) dokumentiert.

In unstimulierten DT40-Zellen ist Cit SLP-65 gleichmäßig im gesamten Cytosol lokalisiert (Abb. 6.4A, t=0). Nach 180 s BCR-Stimulation unterliegt das SLP-65-Fusionsprotein hingegen einer deutlichen Translokation aus dem Cytosol an die Plasmamembran. Die punktierte Struktur der Membranfluoreszenz deutet auf eine Akkumulation von SLP-65 in bestimmten Bereichen der Plasmamembran hin (Abb. 6.4A, t=180 s). Diese Plasmamembranrekrutierung bleibt über die vollständige Dauer des Ca<sup>2+</sup>-Signals nach 300 s BCR-Stimulation erhalten (Abb. 6.4A, t=300 s, vergl. Abb. 6.3). Die Deletion des *leucine zipper*-Motivs hat ebenso wie die Deletion der SH2-Domäne das Ausbleiben dieser stimulationsabhängigen SLP-65-Membranrekrutierung zur Folge (Abb. 6.4B und C, t=0, t=180 s und t=300 s). Die SLP-65 Mutante Cit SLP-65 Y<sup>all</sup>F wird nach BCR-Stimulation an die

Plasmamembran rekrutiert (Abb. 6.4D,  $t=0$ ,  $t=180$  s und  $t=300$  s), obgleich das Ausmaß der Translokation geringer ist als im Fall von Cit SLP-65 (Abb. 6.4A). Offenbar erfolgt die BCR-induzierte Relokalisation unabhängig von der SLP-65-Tyrosinphosphorylierung.

### **6.2.3 C-terminal fluorophormarkiertes SLP-65 ist $\text{Ca}^{2+}$ -kompetent und unterliegt einer BCR-induzierten Plasmamembranrekrutierung**

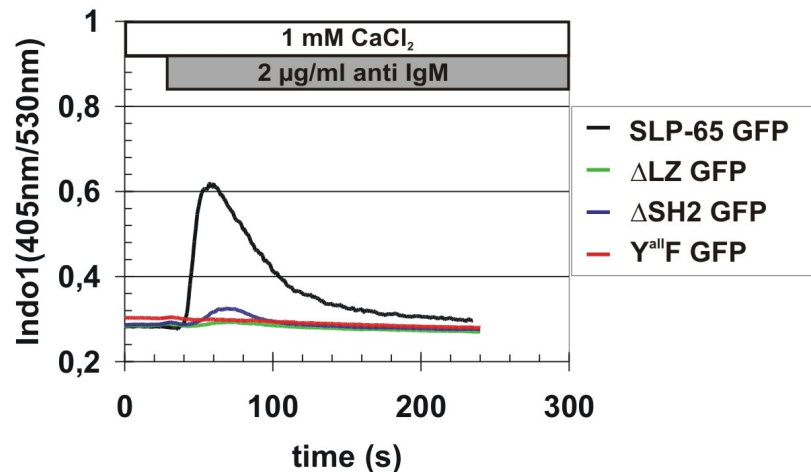
Bei der Verwendung von Fluorophor-Fusionsproteinen ist grundsätzlich zu berücksichtigen, dass die Proteinstruktur und somit die Funktionalität des fluorophormarkierten Proteins beeinflusst werden kann. Um die Validität der unter 6.2.1-2 gezeigten Daten zu bestätigen, wurde zusätzlich C-terminal fluorophormarkiertes SLP-65 generiert und analog bezüglich seiner Funktionalität analysiert. Die mit EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) fusionierten Proteine SLP-65 GFP,  $\Delta\text{LZ}$  SLP-65 GFP, SLP-65  $\Delta\text{SH2}$  GFP und SLP-65  $\text{Y}^{\text{allF}}$  GFP wurden mittels retroviraler Transduktion in *slp-65*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen zur Expression gebracht und zur Untersuchung der Tyrosinphosphorylierung einer Immunpräzipitation (IP) unterzogen. Entsprechende DT40-Zellen blieben unbehandelt oder wurden mit M4 Antikörpern für 3 min BCR-stimuliert. Die mit Hilfe von anti-GFP-Antikörpern aufgereinigten Proteine wurden zur anti-Phosphotyrosin-Immunoblot-Analyse ( $\alpha$ -pTyr) eingesetzt. Wie bereits für die Cit SLP-65-Fusionproteine gezeigt, unterliegt nur wildtypisches SLP-65 GFP einer deutlichen stimulationsabhängigen Tyrosinphosphorylierung (Abb. 6.5A, Spuren 1-2). Die Phosphorylierung der Deletionsmutante  $\Delta\text{LZ}$  SLP-65 GFP ist signifikant reduziert, SLP-65  $\Delta\text{SH2}$  GFP zeigt wie SLP-65  $\text{Y}^{\text{allF}}$  GFP keine nachweisbare BCR-induzierte Tyrosinphosphorylierung (Abb. 6.5A, Spuren 3-8).



**Abbildung 6.5: Tyrosinphosphorylierung von SLP-65 GFP**

Lysate aus unstimulierten (-) und für 3 min BCR-stimulierten (+) *slp-65<sup>-/-</sup>* DT40-Zellen, die SLP-65 GFP (Spuren 1–2), ΔLZ SLP-65 GFP (Spuren 3–4), SLP-65 ΔSH2 GFP (Spuren 5–6) und SLP-65 Y<sup>all</sup>F GFP (Spuren 7–8) exprimieren, wurden einer anti-GFP-Immunpräzipitation unterzogen. Die aufgereinigten Proteine wurden im anti-Phosphotyrosin-Immunoblot-Verfahren (α-pTyr) analysiert (A). Eine anti-GFP-Entwicklung (α-GFP) der Membran zeigt die aufgereinigten Proteinmengen (links unten). Die geklärten Totallysate (*cleared cellular lysates*, CCLs) wurden zudem zur Immunoblot-Analyse mittels anti-Phosphotyrosin-Antikörper (α-pTyr) eingesetzt (B). Linksseitig sind die relativen molekularen Massen eines Protein-Größenstandards angegeben.

Ungeachtet der beobachteten Varianz im Expressionsniveau der Fusionsproteine (Abb. 6.5A und B) belegen diese Daten eine analog zu Cit SLP-65 erfolgende BCR-induzierte Tyrosinphosphorylierung von SLP-65 GFP sowie den Einfluss des *leucine zipper*-Motivs und der SH2-Domäne. Ebenso bestätigt die Analyse der Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung die Daten aus 6.2.1 (Abb. 6.6). Wiederum erwies sich das fluorophormarkierte, wildtypische SLP-65 als Ca<sup>2+</sup>-kompetent (Abb. 6.6, schwarze Linie), wohingegen das Fehlen des *leucine zipper*-Motivs, der SH2-Domäne oder der Tyrosinmotive zum Ausbleiben eines signifikanten Ca<sup>2+</sup>-Signals führt (grüne, blaue und rote Linie).

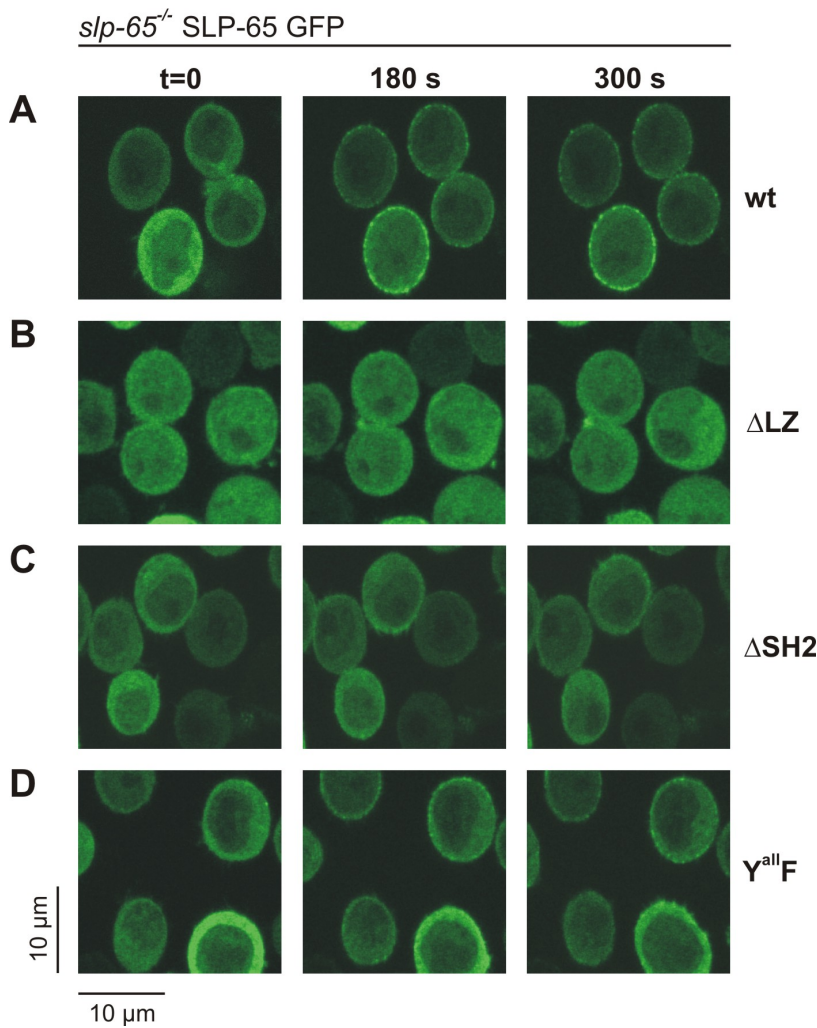


**Abbildung 6.6: SLP-65 GFP ist Ca<sup>2+</sup>-kompetent**

Ca<sup>2+</sup>-Fluxanalyse von SLP-65 GFP- (schwarze Linie), ΔLZ SLP-65 GFP- (grüne Linie), SLP-65 ΔSH2 GFP- (blaue Linie) und SLP-65 Y<sup>all</sup>F GFP-exprimierenden (rote Linie) DT40-Zellen. Die Zellen wurden mit Indo1-AM beladen und für 4 min in Gegenwart von 1 mM extrazellulärem Ca<sup>2+</sup>-Ionen BCR-stimuliert. Die zeitliche Veränderung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> wurde durchflusscytometrisch dokumentiert.

Die *in vivo*-Lokalisationsstudien der SLP-65 GFP-Fusionsproteine (Abb. 6.7) wurden entsprechend der Analyse der Cit SLP-65-Proteine durchgeführt (vergl. 6.2.2). In unstimulierten DT40-Zellen sind sämtliche SLP-65-Varianten gleichmäßig im Cytosol verteilt (Abb. 6.7A-D, t=0). Im Gegensatz zur beobachteten Plasmamembranrekrutierung von SLP-65 GFP und SLP-65 Y<sup>all</sup>F GFP (Abb. 6.7A und D, t=180 s und t=300 s) bleibt die cytosolische Lokalisation der Deletionsmutanten ΔLZ SLP-65 GFP und SLP-65 ΔSH2 GFP nach BCR-Stimulation unbeeinflusst. (Abb. 6.7B und C, t=180 s und t=300 s). Somit stehen die Lokalisationsanalysen der Fusionsproteinvarianten SLP-65 GFP und Cit SLP-65 im Einklang.





**Abbildung 6.7:**  
**SLP-65 wird BCR-induziert an die Plasmamembran rekrutiert**

Die subzelluläre Verteilung von SLP-65 in DT40-Zellen wurde mit Hilfe von CLSM analysiert. Vor (t=0) sowie nach BCR-Stimulation der Zellen für t=180 s und t=300 s wurde die Lokalisation der Proteine SLP-65 GFP (A), ΔLZ SLP-65 GFP (B), SLP-65 ΔSH2 GFP (C) und SLP-65 Y<sup>all</sup>F GFP (D) dokumentiert.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse erstmals die Dynamik der BCR-induzierten SLP-65-Membranrekrutierung in DT40 B-Zellen mit bildgebenden Verfahren. Die Antigenrezeptorstimulation initiiert eine ausgeprägte Translokation des cytosolischen Adapterproteins SLP-65 an die Plasmamembran. Für die gezeigte Rekrutierung sind das N-terminale *leucine zipper*-Motiv und die C-terminale SH2-Domäne des Proteins essentiell. Die SLP-65-Tyrosinphosphorylierung zeigt hingegen keinen wesentlichen Einfluss auf die Plasmamembranassoziation des Adapters.

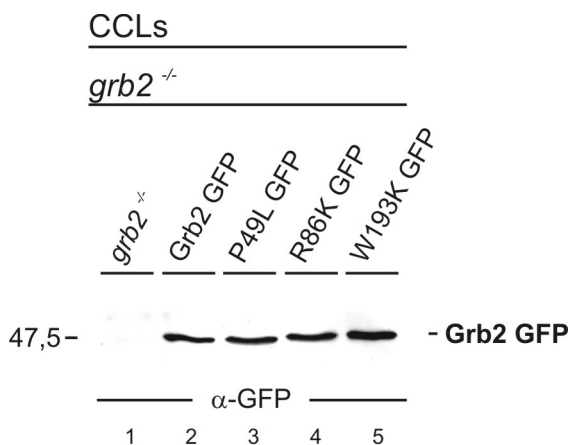
Die kombinierten Ergebnisse der BCR-induzierten SLP-65-Tyrosinphosphorylierung, der Ca<sup>2+</sup>-Fluxanalysen und der Lokalisationsstudien demonstrieren, dass die stimulationsabhängige Plasmamembranrekrutierung eine Voraussetzung für die vollständige SLP-65-Aktivierung ist. Nach diesen Daten sind das *leucine zipper*-Motiv und die SH2-Domäne für die Relokalisation von SLP-65 an



die Plasmamembran notwendig, was die Tyrosinphosphorylierung des Adapters und die Bildung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes ermöglicht.

### 6.3 Die Negativregulation der $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung durch Grb2 ist mit seiner Plasmamembranrekrutierung verbunden

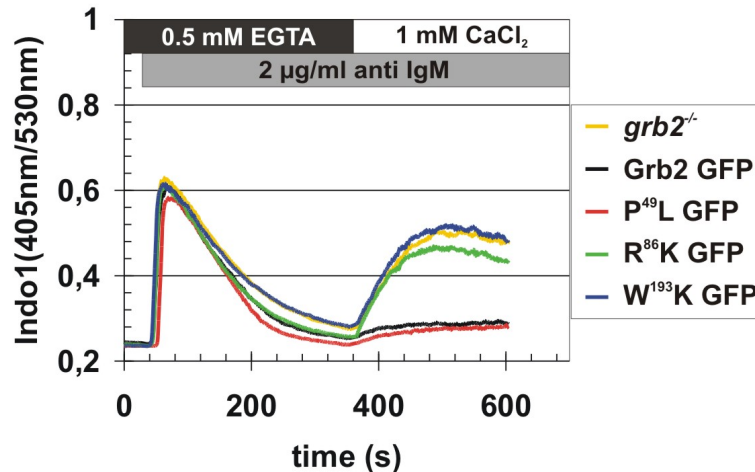
Adapterproteine organisieren nicht nur die Initiation der BCR-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung sondern sind auch an der Regulation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals beteiligt. So wurde das cytosolische Adapterprotein Grb2 als ein Negativregulator der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort in B-Zellen identifiziert (STORK et al., 2004). Grb2 besteht aus einer zentralen SH2-Domäne, die N- und C-terminal von jeweils einer SH3-Domäne flankiert wird. Die Inhibition der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung ist von der Funktion der SH2-Domäne und der C-terminalen SH3-Domäne abhängig. Für die Analyse einer räumlichen Dynamik der Grb2-Lokalisation wurde ein Konstrukt generiert, das für Hühner Grb2 mit C-terminal fusioniertem EGFP codiert. Um den Einfluss der einzelnen Grb2-Domänen auf die subzelluläre Verteilung untersuchen zu können, wurden zudem Varianten mit inaktivierten Grb2-Domänen hergestellt: P<sup>49</sup>L GFP (N-term. SH3-Domäne), R<sup>86</sup>K GFP (zentr. SH2-Domäne) und W<sup>193</sup>K GFP (C-term. SH3-Domäne) (STORK et al., 2004). Die Expression der Fusionsproteine nach retroviralem Gentransfer in *grb2*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen wurde mittels Immunoblot-Analyse bestätigt (Abb. 6.8).



**Abbildung 6.8: Grb2 GFP-Expression**

Die Expression der Grb2 GFP-Fusionsproteine in *grb2*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen wurde durch die anti-GFP-Immunoblot-Analyse gekläarter Totallysate (CCLs) entsprechender Zellen nachgewiesen. Die zur jeweiligen Inaktivierung der Grb2-Domänen erfolgten AS-Substitutionen sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben (Spuren 3-5). Linksseitig ist die relative molekulare Masse eines Protein-Größenstandards angegeben.

Die Stimulation des B-Zellrezeptors löst einen transienten Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  aus (vergl. Abb. 6.3). Grundlage dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort ist die kombinierte Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Speichern und ihrem Influx aus dem extrazellulären Raum. Während das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal wildtypischer DT40-Zellen nahezu ausschließlich auf der Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Speichern basiert, generiert die *grb2*<sup>-/-</sup> DT40-Variante die  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort zudem über einen erheblichen Anteil an extrazellulär einströmenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (STORK et al., 2004). Diese Grb2-abhängige Charakteristik des BCR-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals kann durch die Auflösung der Signalkomposition hinsichtlich interner  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung und dem Einstrom extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen über die Plasmamembran untersucht werden. Zum Nachweise der Funktionalität der Grb2-Fusionsproteine wurden die hergestellten Zelllinien entsprechenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluxanalysen unterzogen. Dazu wurden die Zellen mit Indo1-AM beladen und die BCR-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern in Gegenwart von extrazellulärem EGTA für 6 min dokumentiert. EGTA komplexiert  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen des extrazellulären Mediums. Anschließend wurde die extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf 1 mM eingestellt und der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen über Kanäle der Plasmamembran für weitere 4 min verfolgt (Abb. 6.9). Die BCR-Stimulation der *grb2*<sup>-/-</sup> DT40-Zelllinie resultiert in einer internen  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung und dem nachfolgenden, ausgeprägten Influx extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (Abb. 6.9, gelbe Linie). Mit GFP markiertes Grb2 rekonstituiert eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort wie wildtypisches Grb2, ein signifikanter  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über die Plasmamembran wird nicht beobachtet (Abb. 6.9, schwarze Linie).

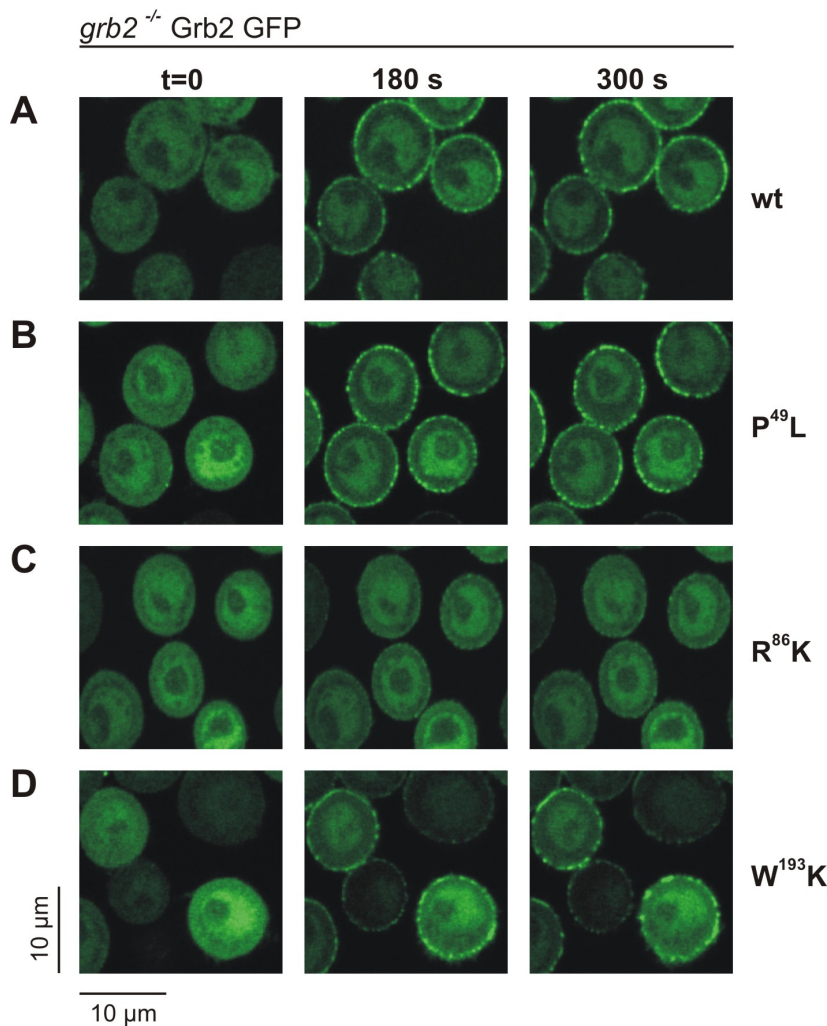


**Abbildung 6.9: Grb2 GFP ist ein funktioneller Negativregulator der Ca<sup>2+</sup>-Antwort**

Die intra- und extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung von *grb2*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen, die nach retroviralem Gentransfer Grb2 GFP (schwarze Linie) und die Grb2 GFP-Varianten mit inaktivierter N-terminaler SH3-Domäne (rote Linie), zentraler SH2-Domäne (grüne Linie) und C-terminaler SH3-Domäne (blaue Linie) exprimieren, wurde im Vergleich zu *grb2*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen untersucht (gelbe Linie). Entsprechende Zelllinien wurden mit Indo1-AM beladen und mit M4 in Abwesenheit von extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Ionen in 0,5 mM EGTA-haltiger Krebs-Ringerlösung BCR-stimuliert. Die zeitliche Veränderung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in Folge der Entleerung zellinterner Ca<sup>2+</sup>-Speicher wurde für 6 min durchflusscytometrisch dokumentiert, bevor die extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration auf 1 mM eingestellt wurde und der Einstrom extrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Ionen über die Plasmamembran für weitere 4 min verfolgt wurde.

Die Inaktivierung der N-terminalen SH3-Domäne (P<sup>49</sup>L GFP) hat keinen Einfluss auf das Profil der Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung (Abb. 6.9, rote Linie). Die *grb2*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen, die die Fusionsproteine exprimieren, in denen die zentrale SH2-Domäne (R<sup>86</sup>K GFP) und die C-terminale SH3-Domäne (W<sup>193</sup>K GFP) nicht funktionell sind, offenbaren ein dem *grb2*<sup>-/-</sup>-Phänotyp entsprechendes Ca<sup>2+</sup>-Signal (Abb. 6.9, grüne und blaue Linie). Die gezeigten Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit Stork et al. 2004 und belegen die Funktionalität der generierten Grb2 GFP-Fusionsproteine. Entscheidend für die Inhibition der Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung sind die zentrale SH2-Domäne und die C-terminale SH3-Domäne. Nachfolgend wurde die subzelluläre Organisation von Grb2 in den hergestellten Zelllinien untersucht. Die Lokalisation der Fusionsproteine in DT40-Zellen wurde vor sowie nach 3 und 5 min BCR-Stimulation mit M4 mittels CLSM dokumentiert (Abb. 6.10). Grb2 GFP ist in unstimulierten *grb2*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen gleichmäßig im Cytosol lokalisiert (Abb. 6.10A, t=0). Nach 180 s BCR-Stimulation unterliegt das Fusionsprotein einer nahezu

vollständigen Rekrutierung aus dem Cytosol an die Plasmamembran (Abb. 6.10A, t=180 s). Diese Membranlokalisation bleibt bis 300 s nach BCR-Stimulation unverändert (Abb. 6.10A, t=300 s). Gleichermaßen wird eine Plasmamembranrekrutierung der Grb2-Varianten P<sup>49</sup>L GFP und W<sup>193</sup>K GFP beobachtet (Abb. 6.10B und D). Die Inaktivierung der SH2-Domäne unterbindet dagegen die BCR-induzierte Translokation des Fusionsproteins R<sup>86</sup>K GFP an die Plasmamembran (Abb. 6.10C). Diese Ergebnisse dokumentieren erstmalig die BCR-induzierte Plasmamembranrekrutierung des Ca<sup>2+</sup>-regulierenden Adapterproteins Grb2 mit bildgebenden Verfahren. Vermittelt wird die Plasmamembranrekrutierung durch die zentrale SH2-Domäne, die N- und C-terminalen SH3-Domänen sind ohne Relevanz für diesen Vorgang.

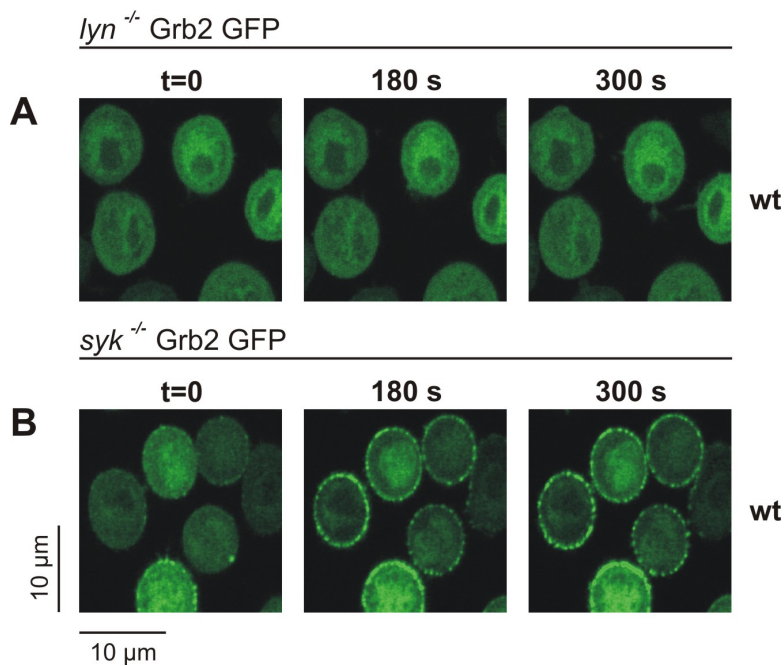


**Abbildung 6.10:**

**Grb2 unterliegt einer BCR-induzierten Translokation an die Plasmamembran in Abhängigkeit der SH2-Domäne**

Die Lokalisation der GFP-Fusionsproteine Grb2 (A), P<sup>49</sup>L (B, N-ter. SH3-Domäne), R<sup>86</sup>K (C, zentr. SH2-Domäne) und W<sup>193</sup>K (D, C-ter. SH3-Domäne) wurde vor (t=0) sowie nach BCR-Stimulation für t= 180 s und t=300 s in DT40-Zellen mit Hilfe von CLSM analysiert.

Zur weiteren Aufklärung der molekularen Grundlage der BCR-induzierten Translokation von Grb2 wurde untersucht, welche der BCR-proximalen Proteintyrosinkinasen (PTKs) die für diesen Vorgang notwendige Phosphorylierung eines Grb2-bindenden Proteins vermittelt. Entsprechend wurde das Fusionsprotein Grb2 GFP mittels retroviralem Gentransfer in *lyn*<sup>-/-</sup> und *syk*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen exprimiert und die generierten Zellen zu Lokalisationsstudien eingesetzt (Abb. 6.11).



**Abbildung 6.11:**

**Die Plasmamembranrekruitment von Grb2 erfordert die Aktivität der PTK Lyn**

Die Lokalisation von Grb2 GFP in *lyn*<sup>-/-</sup> und *syk*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen wurde mit Hilfe von CLSM vor (t=0) sowie nach BCR-Stimulation für t=180 s und t=300 s analysiert.

Während in *lyn*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen keine Relokalisation von Grb2 zu beobachten ist, ist die stimulationsabhängige Plasmamembranrekruitment in *syk*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen nicht beeinträchtigt (Abb. 6.11A und B). Demnach ist die durch Lyn vermittelte Proteintyrosinphosphorylierung von entscheidender Bedeutung für die BCR-induzierte Translokation von Grb2 an die Plasmamembran.

#### **6.4 Das Adapterprotein Dok-3 vermittelt die subzelluläre Organisation von Grb2**

Die Negativregulation der Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung durch Grb2 erfordert, wie unter 6.3 gezeigt, die SH2-Domänen-vermittelte Integration des Adapters in die Signalleitung. Abhängig ist dieser Prozess von der Aktivität der BCR-regulierten Proteintyrosinkinase Lyn und der einhergehenden Tyrosinphosphorylierung eines Grb2-bindenden Proteins. Über seine Eigenschaft als Grb2-bindendes

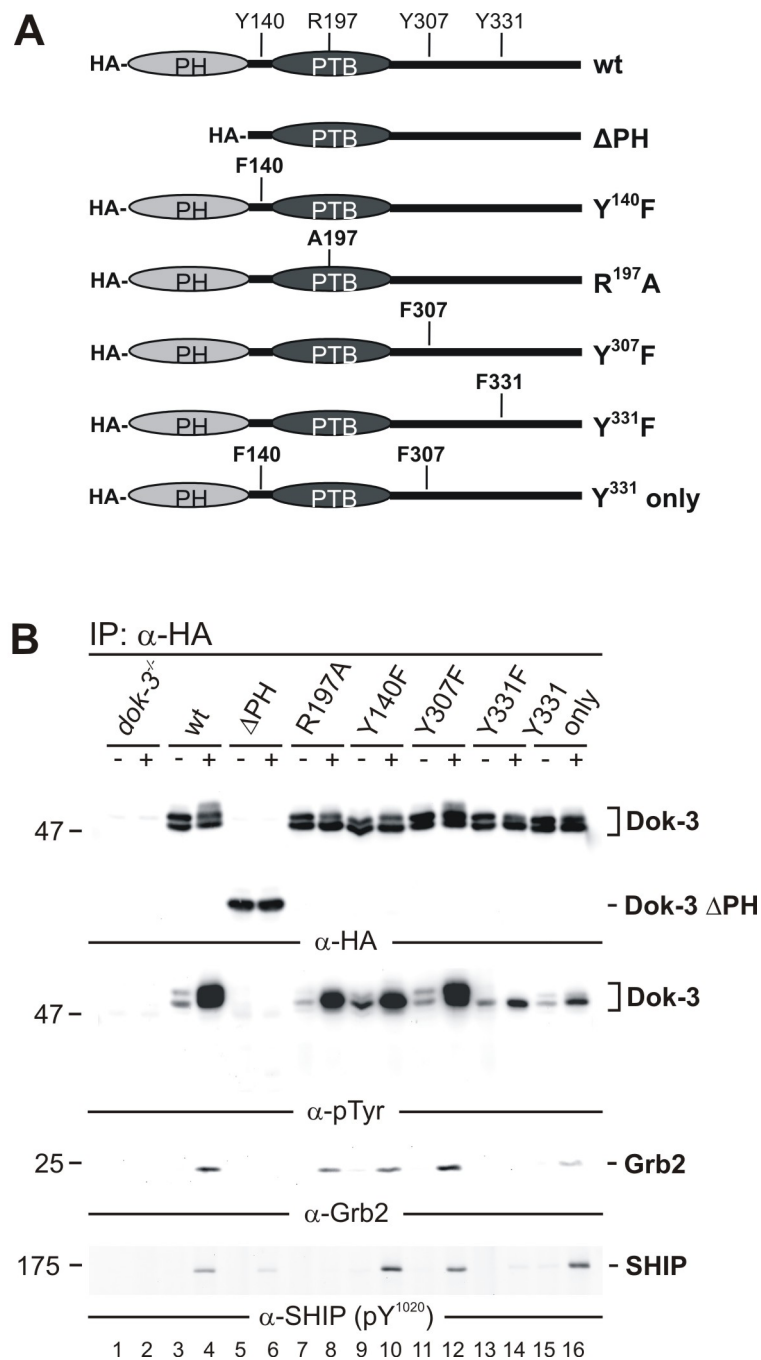
Protein konnte eines der prominentesten Phosphoproteine nach Aktivierung der BCR-proximalen PTKs der DT40-Zelllinie als das Hühnerhomolog des Adapterproteins *downstream of kinase-3* (Dok-3) identifiziert werden (Dr. B. Stork). Das aus 426 AS bestehende Dok-3 weist eine N-terminale PH-Domäne und eine sich anschließende PTB-Domäne auf, die das Tyrosinphosphorylierungsmotiv Y<sup>140</sup>SSW umgeben. Der C-terminale Bereich enthält zwei weitere Tyrosinmotive, Y<sup>307</sup>ASI und Y<sup>331</sup>ENI, die potentielle Csk (YASI)- und Grb2 (YENI)-Bindungsmotive darstellen (Abb. 6.12A). Dok-3 stellt mit Dok-1 die in B-Zellen exprimierten Mitglieder der Dok-Familie dar (CONG et al., 1999; LEMAY et al., 2000; YAMANASHI et al., 2000). Alle sieben identifizierten Vertreter dieser Protein-Familie weisen eine homologe Domänenstruktur auf (vergl. Abb. 6.12A, N-terminale PH-Domäne, zentrale PTB-Domäne sowie ein C-terminaler Bereich mit prolinreichen Regionen und Tyrosinmotiven). Die N-terminale PH-Domäne ermöglicht eine Plasmamembranlokalisation durch die Interaktion mit Phospholipiden (LEMMON and FERGUSON, 1998, 2000; ZHAO et al., 2001). Sowohl murines Dok-1 als auch Dok-3 unterliegen einer BCR-induzierten Tyrosinphosphorylierung (LEMAY et al., 2000; YAMANASHI et al., 2000), wobei das murine Dok-3 zwei pYxN-Konsensusmotive für die Bindung von Grb2 bereitstellt (CONG et al., 1999; LEMAY et al., 2000; HONMA et al., 2006).

Um die Funktion von Dok-3 als Element der Grb2-vermittelten Ca<sup>2+</sup>-Fluxregulation zu untersuchen, wurde mit Hilfe gezielter Geninaktivierung eine *dok-3<sup>-/-</sup>* DT40-Zelllinie generiert (Dr. B. Stork). Die im Rahmen dieser Arbeit nachfolgend erarbeitete biochemische und funktionelle Charakterisierung von Dok-3 erfolgte in Kooperation mit Dr. B. Stork, K. Neumann und Dr. M. Engelke.

#### **6.4.1 Tyrosinphosphoryliertes Dok-3 rekrutiert Grb2**

Für die genaue biochemische Untersuchung der beschriebenen Signalleitungsmotive wurde Dok-3 einer Mutationsanalyse unterzogen (Abb. 6.12). Neben HA-markiertem Dok-3 wurde eine PH-Domänen-Deletionsmutante ( $\Delta$ PH, AS 1-113 deletiert) und eine in der PTB-Domäne inaktivierte Dok-3-Variante (R<sup>197</sup>A) hergestellt. Die Konsensus-Tyrosinphosphorylierungsmotive wurden durch die Phenylalaninsubstitutionen Y<sup>140</sup>F, Y<sup>307</sup>F und Y<sup>331</sup>F inaktiviert. Zusätzlich wurde eine Dok-3-Tyrosinmutante generiert, in der lediglich das potentielle Grb2-Bindungsmotiv

Y<sup>331</sup>ENI als Phosphoakzeptormotiv vorliegt (Y<sup>331</sup>only). Nach retroviraler Transduktion der *dok-3*<sup>-/-</sup> DT40-Zelllinie wurden die HA Dok-3-Varianten aus Lysaten unbehandelter und BCR-stimulierter Zellen immunpräzipitiert. Der Phosphorylierungsstatus der aufgereinigten Dok-3-Proteine wurde im anti-Phosphotyrosin-Immunoblot analysiert (Abb. 6.12B, Mitte oben). Wildtypisches HA Dok-3 unterliegt einer starken Tyrosinphosphorylierung nach BCR-Stimulation (Spuren 3-4), eine vergleichbare Tyrosinphosphorylierung ist trotz inaktivierter PTB-Domäne im Fall von Dok-3 R<sup>197</sup>A zu beobachten (Spuren 7-8). Dagegen unterbindet die Deletion der PH-Domäne eine BCR-induzierte Phosphorylierung von Dok-3 ΔPH (Spuren 5-6). Der Phosphorylierungsstatus der Tyrosinmutanten Y<sup>140</sup>F und Y<sup>307</sup>F nach BCR-Stimulation ist im Vergleich zu HA Dok-3 nahezu unverändert (Spuren 9-12). Die BCR-induzierte Phosphorylierung der Dok-3-Variante Y<sup>331</sup>F ist signifikant reduziert (Spuren 13-14). Einer ebenfalls verminderten Tyrosinphosphorylierung unterliegt Dok-3 Y<sup>331</sup>only, welches ausschließlich das potentielle Grb2-Bindungsmotiv Y<sup>331</sup>ENI aufweist (Spur 15-16). Die Grb2-Bindungskompetenz der Dok-3-Varianten wurde über die anti-Grb2-Entwicklung der Immunoblot-Membran untersucht. Mit Ausnahme der phosphorylierungsdefizienten ΔPH-Mutante ist eine BCR-induzierte Coaufreinigung von Grb2 in Abhängigkeit des Konsensus-Bindungsmotivs Y<sup>331</sup>ENI zu beobachten (Abb. 6.12B, Mitte unten). Bereits die alleinige Gegenwart von Phospho-Y<sup>331</sup>ENI in Dok-3 Y<sup>331</sup>only resultiert in der Bindung von Grb2 (Spuren 15-16). Die Inaktivierung des Y<sup>331</sup>ENI-Motivs verhindert eine stimulationsabhängige Assoziation von Dok-3 und Grb2 (Spuren 13-14). Neben der hier gezeigten Dok-3/Grb2-Interaktion wurde bereits eine BCR-induzierte Assoziation von Dok-3 und SHIP (*SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase*) über die Dok-3-PTB-Domäne beschrieben (LEMAY et al., 2000; ROBSON et al., 2004). Die anti-Phospho-SHIP-Entwicklung der Immunoblot-Membran belegt in Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen eine stimulationsinduzierte Dok-3/SHIP-Interaktion in Abhängigkeit der Dok-3-PTB-Domäne (Abb. 6.12B, unten, vergl. Spuren 3-4 und 7-8). Zudem erfordert die Bindung von SHIP die Phosphorylierung des Y<sup>331</sup>ENI-Motivs (Spuren 13-14).



**Abbildung 6.12: Tyrosinphosphorylierung von Dok-3**

(A) Schematische Darstellung der Expressionskonstrukte, die für HA-markierte Versionen von wildtypischem Dok-3, der PH-Domänen-Deletionsmutante ( $\Delta$ PH) und die Aminosäure-Substitutionsmutanten codieren. Die betreffenden Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben. (B) Durch retroviralen Transfer der Expressionsvektoren in *dok-3<sup>-/-</sup>* DT40-Zellen erzeugte Zelllinien blieben unbehandelt (-) oder wurden für 3 min BCR-stimuliert (+). Die Lysate der Zellen wurden einer anti-HA-Immunpräzipitation unterzogen und die aufgereinigten Proteine im Westernblot-Verfahren analysiert. Die Expression und Tyrosinphosphorylierung der Dok-3-Versionen



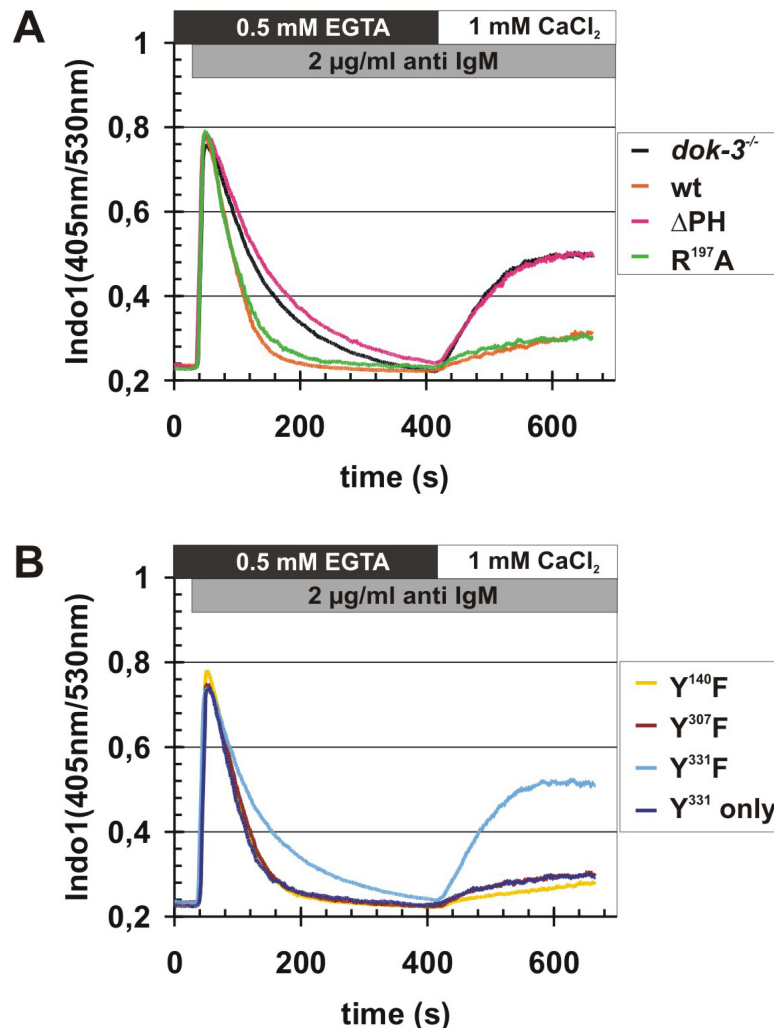
wie auch die Assoziation mit Grb2 und SHIP wurde durch die Entwicklung derselben Westernblot-Membran mit anti-HA-, anti-pTyr-, anti-Grb2- und anti-Phospho-SHIP-Antikörpern detektiert. Linksseitig sind die relativen molekularen Massen eines Protein-Größenstandards angegeben.

Zusammengefasst zeigt die biochemische Analyse des Adapterproteins Dok-3 zum einen, dass die PH-Domäne essentiell für die BCR-induzierte Tyrosinphosphorylierung von Dok-3 ist. Zum anderen konnte die stimulationsabhängige Dok-3/Grb2-Interaktion auf die Tyrosinphosphorylierung des Y<sup>331</sup>ENI-Motivs in Dok-3 zurückgeführt werden.

#### **6.4.2 Dok-3 ist ein Negativregulator der BCR-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung**

Die BCR-induzierte Dok-3/Grb2-Interaktion impliziert eine Rolle von Dok-3 als Element der unter 6.3 beschriebenen inhibitorischen Ca<sup>2+</sup>-Fluxregulation durch Grb2. Um die Funktion von Dok-3 in Bezug auf die BCR-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Antwort zu untersuchen, wurden die *dok-3*<sup>-/-</sup> DT40-Zelllinie sowie ihre unter 6.4.1 beschriebenen, rekonstituierten Varianten Ca<sup>2+</sup>-Fluxanalysen unterzogen. Die Zellen wurden mit Indo1-AM beladen und die BCR-induzierte intra- und extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung dokumentiert (Abb. 6.13). Im Gegensatz zu wildtypisch rekonstituierten Zellen weist die Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung in *dok-3*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen einen ausgeprägten biphasischen Verlauf auf (Abb. 6.13A, schwarze Linie). Die Entleerung intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Speicher in Abwesenheit extrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Ionen resultiert in einem Anstieg der cytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. Die Dauer der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung in *dok-3*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen ist im Vergleich zu HA Dok-3-rekonstituierten *dok-3*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen erhöht. Während in *dok-3*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen nachfolgend ein erheblicher Einstrom extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Ionen zu beobachten ist (schwarze Linie), ist der Ca<sup>2+</sup>-Influx über die Plasmamembran in HA Dok-3-exprimierenden Zellen minimal (orange Linie). Dieser negativregulatorische Effekt auf die Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung ist unbeeinflusst von der Inaktivierung der Dok-3-PTB-Domäne (grüne Linie). Die Deletion der Dok-3-PH-Domäne ist hingegen mit dem Verlust der Dok-3-abhängigen Ca<sup>2+</sup>-Inhibition verbunden (rote Linie). Auch die Varianten mit inaktivierten Tyrosinphosphorylierungsmotiven HA Dok-3 Y<sup>140</sup>F, HA Dok-3 Y<sup>307</sup>F und HA Dok-3 Y<sup>331</sup>only vermitteln die Inhibition der Ca<sup>2+</sup>-Antwort in Form eines monophasischen Ca<sup>2+</sup>-Profils wildtypischer DT40-Zellen (Abb. 6.13B,

gelbe, rote und blaue Linie). Allein die Gegenwart des Y<sup>331</sup>ENI-Motivs ist notwendig und hinreichend für die inhibitorische Regulation der Ca<sup>2+</sup>-Antwort durch Dok-3 (blaue und hellblaue Linie).



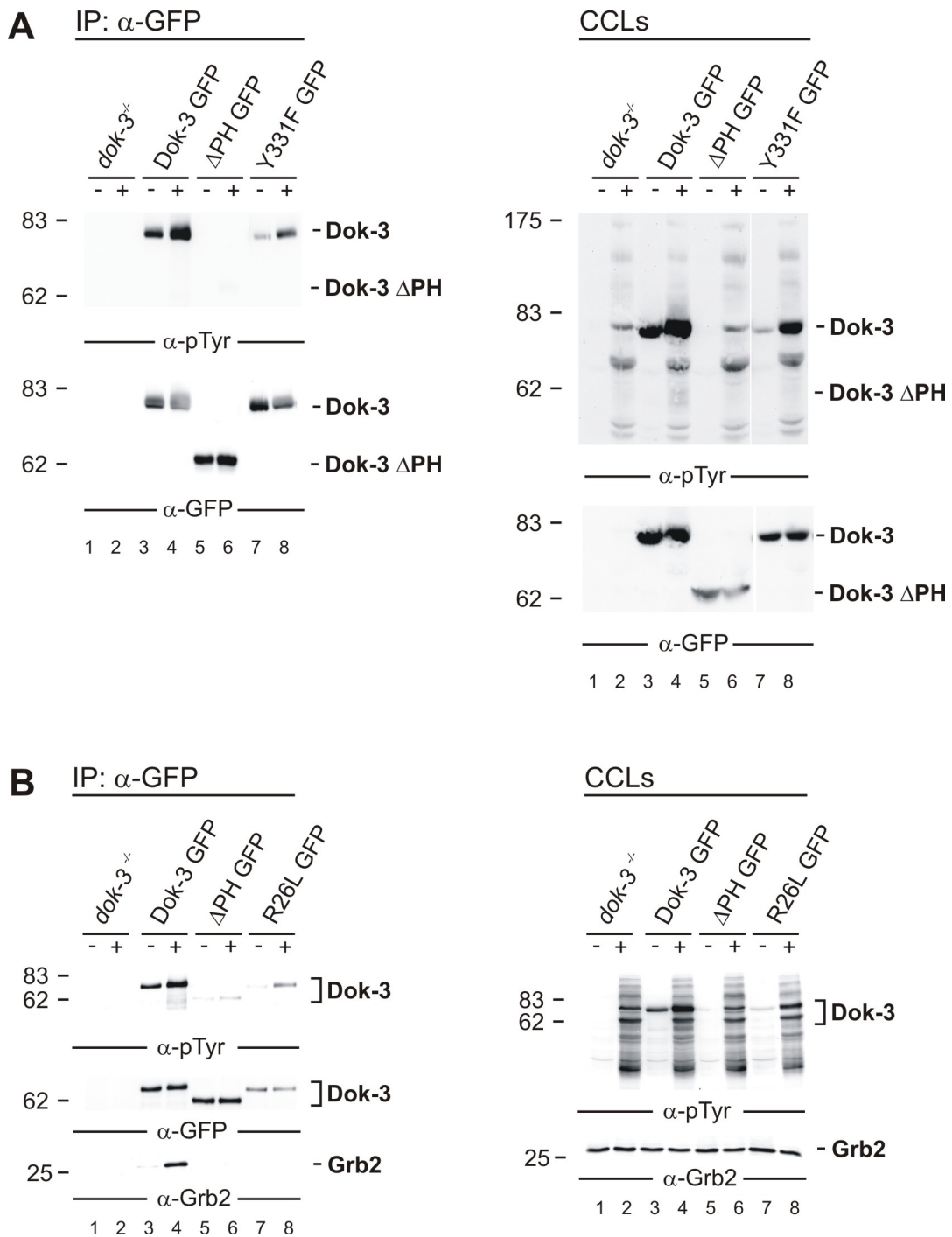
**Abbildung 6.13: Dok-3 ist ein Negativregulator der Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung in DT40 B-Lymphocyten**

Die intra- und extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung in *dok-3*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen, die nach retroviralem Gentransfer die HA-Versionen Dok-3 (orange Linie), ΔPH (rote Linie) und die PTB-Mutante R<sup>197</sup>A (grüne Linie) exprimieren, wurde im Vergleich zu *dok-3*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen untersucht (schwarze Linie). Die Zellen wurden mit Indo1-AM beladen und mit M4 in Abwesenheit von extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Ionen in 0,5 mM EGTA-haltiger Krebs-Ringerlösung stimuliert. Die zeitliche Veränderung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in Folge der Entleerung zellinterner Ca<sup>2+</sup>-Speicher wurde für 6 min durchflusscytometrisch dokumentiert, bevor die extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration auf 1 mM eingestellt wurde und der Einstrom extrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Ionen über die Plasmamembran für weitere 4 min verfolgt wurde (A). Analog wurde die BCR-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung in *dok-3*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen in Abhängigkeit der Dok-3-Tyrosinmutanten HA Y<sup>140</sup>F (gelbe Linie), HA Y<sup>307</sup>F (rote Linie), HA Y<sup>331</sup>F (hellblaue Linie) und HA Y<sup>331</sup> only (blaue Linie) analysiert (B).

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluxanalyse der *dok-3<sup>-/-</sup>* DT40-Zelllinie identifiziert Dok-3 als Negativregulator der BCR-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung. Für diese Funktion sind die PH-Domäne und das Grb2-bindende Tyrosinmotiv Y<sup>331</sup>ENI essentiell.

#### 6.4.3 Dok-3 ist ein plasmamembranassoziiertes Adapterprotein

Für die weitere Analyse des  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierenden Dok-3-Signalmoduls wurde die subzelluläre Lokalisation von Dok-3 mit Hilfe bildgebender Verfahren *in vivo* untersucht. Dazu wurden neben C-terminal GFP-markiertem Dok-3 auch die Fusionsproteine Dok-3  $\Delta$ PH GFP und Dok-3 Y<sup>331</sup>F GFP hergestellt. In Ergänzung der PH-Domänen-Deletionsmutante wurde zudem eine Dok-3-Variante generiert, in der lediglich die phospholipidbindende Funktion der PH-Domäne durch eine Arginin-Leucin-Substitution (R<sup>26</sup>L) inaktiviert ist. Die biochemische und  $\text{Ca}^{2+}$ -regulatorische Funktionalität der Fusionsproteine wurde analog der HA Dok-3-Proteine verifiziert. Nach retroviraler Transduktion der *dok-3<sup>-/-</sup>* DT40-Zelllinie wurden die exprimierten GFP-Fusionsproteine einer anti-GFP-Immunpräzipitation aus den Lysaten unstimulierter und BCR-stimulierter DT40-Zellen unterzogen. Der Phosphorylierungsstatus der aufgereinigten Proteine wurde im anti-pTyr-Immunoblot analysiert (Abb. 6.14). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der HA-markierten Dok-3-Varianten unterliegt Dok-3 GFP einer stimulationsabhängigen Tyrosinphosphorylierung, wohingegen die Deletionsmutante Dok-3  $\Delta$ PH GFP unphosphoryliert bleibt (Abb. 6.14A, Spuren 3-6). Dok-3 Y<sup>331</sup>F GFP zeigt wie die entsprechende HA-Variante eine reduzierte BCR-induzierte Tyrosinphosphorylierung (Abb. 6.14A, Spuren 7-8). Die Inaktivierung der PH-Domäne (R<sup>26</sup>L) resultiert vergleichbar der PH-Domänen-Deletion ( $\Delta$ PH) in einer signifikant reduzierten Tyrosinphosphorylierung des Fusionsproteins (Abb. 6.14B, Spuren 7-8). Die Grb2-Bindungskompetenz der Fusionsproteine Dok-3 GFP, Dok-3  $\Delta$ PH GFP und Dok-3 R<sup>26</sup>L GFP wurde über die nachfolgende anti-Grb2-Entwicklung der Immunoblot-Membran überprüft. Während im Fall des wildtypischen GFP-Fusionsproteins eine stimulationsabhängige Grb2-Interaktion zu beobachten ist, verhindert sowohl die Deletion als auch die Inaktivierung der PH-Domäne die Bindung von Grb2 (Abb. 6.14B, unten).

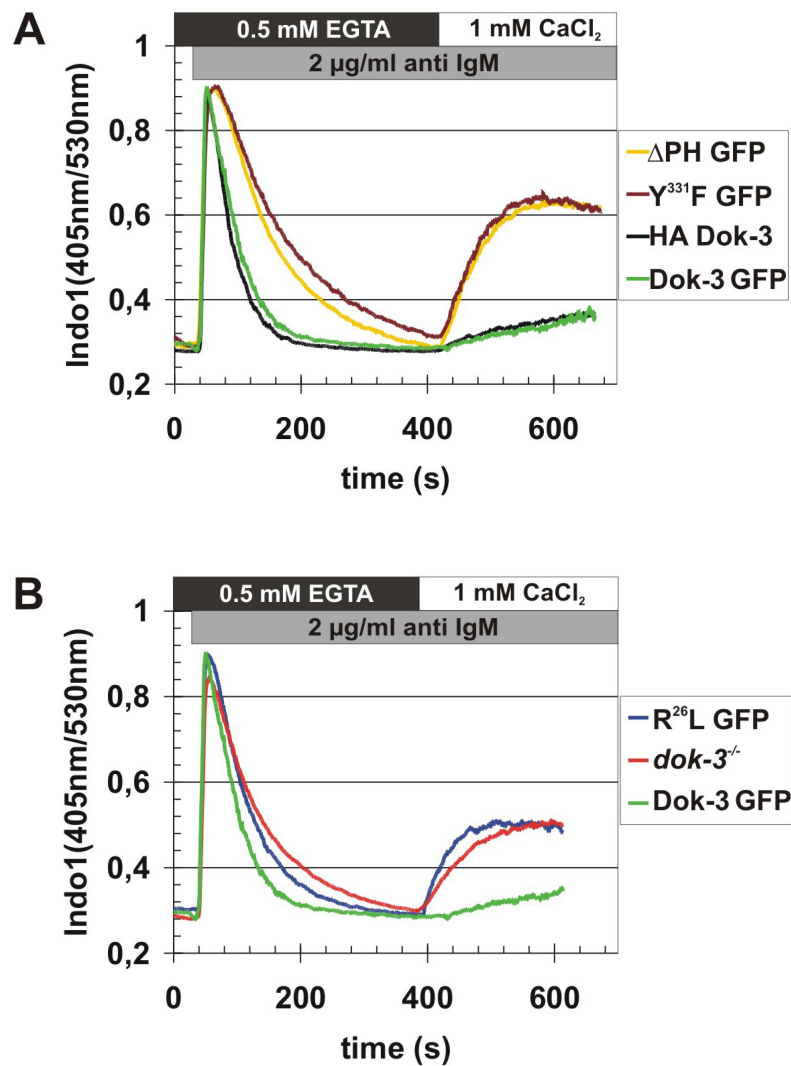


**Abbildung 6.14: Tyrosinphosphorylierung von Dok-3 GFP**

Die mittels retroviraler Transduktion generierten *dok-3<sup>-/-</sup>* DT40-Zelllinien Dok-3 GFP,  $\Delta$ PH GFP, R<sup>26</sup>L GFP und Y<sup>331</sup>F GFP blieben unbehandelt (-) oder wurden für 3 min BCR-stimuliert (+). Die Lysate der Zellen wurden einer anti-GFP-Immunpräzipitation unterzogen und die aufgereinigten Proteine im Westernblot-Verfahren analysiert. Die Tyrosinphosphorylierung und Expression der Dok-3-Varianten wurde durch die sequentielle Entwicklung der Westernblot-Membran mit anti-pTyr- und anti-GFP-Antikörpern detektiert (**A** und **B**). Wildtypisches Dok-3 GFP und die PH-Domänen-Mutanten  $\Delta$ PH GFP und R<sup>26</sup>L GFP wurden zudem durch die anti-Grb2-Entwicklung der Westernblot-Membran auf

eine Grb2-Interaktion untersucht (**B** unten). Weiterhin wurden die geklärten Totallysate (*cleared cellular lysates*, CCLs) einer anti-Phosphotyrosin- und anti-GFP-Immunoblot-Analyse (**A**, rechts), bzw anti-Phosphotyrosin- und anti-Grb2-Analyse unterzogen (**B**, rechts). Linksseitig sind die relativen molekularen Massen eines Protein-Größenstandards angegeben.

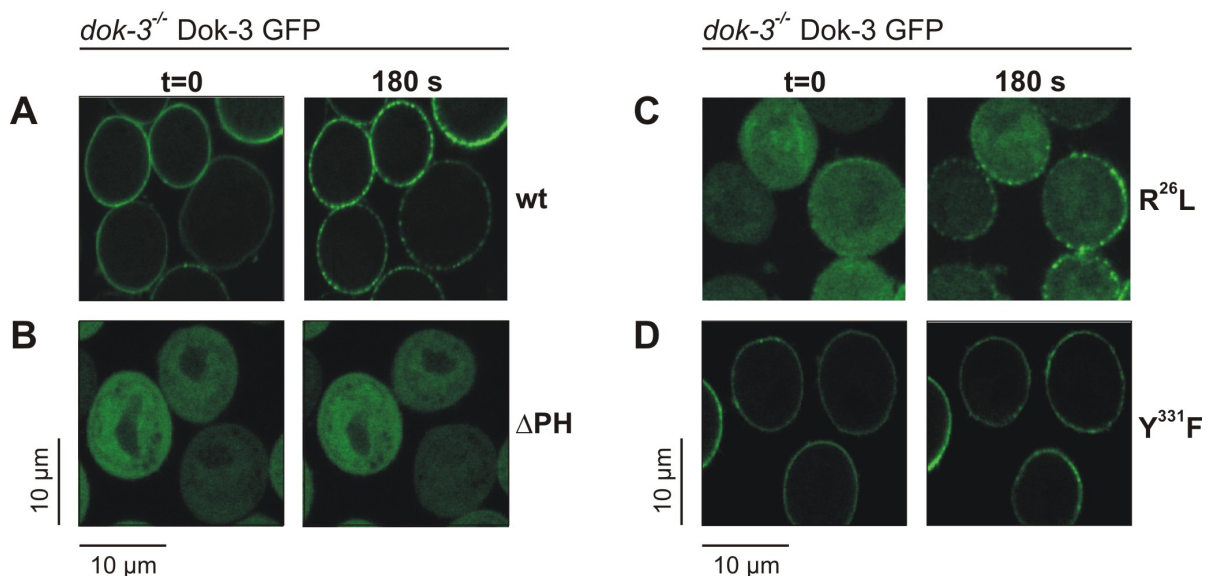
Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluxanalyse der DT40-Zelllinien belegt die Funktionalität der Dok-3 GFP-Fusionsproteine. Die Expression von Dok-3 GFP überführt das biphasische  $\text{Ca}^{2+}$ -Profil der *dok-3<sup>-/-</sup>* DT40-Zellen in ein für wildtypische DT40-Zellen charakteristisches, monophasisches  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal (Abb. 6.15A, grüne Linie). Weder die Deletionsmutante Dok-3  $\Delta$ PH GFP noch das Grb2-bindungsdefiziente Dok-3 Y<sup>331</sup>F GFP rekonstituiert diese Funktion (gelbe und braune Linie). Wie die Deletion ist auch die Inaktivierung der PH-Domäne (R<sup>26</sup>L) mit dem Verlust der  $\text{Ca}^{2+}$ -regulatorischen Kompetenz des Fusionsproteins verbunden (Abb. 6.15B, blaue Linie). Diese Ergebnisse belegen die Funktionalität der generierten Dok-3 GFP-Fusionsproteine und bestätigen nochmals die essentielle Bedeutung der PH-Domäne und des Grb2-bindenden Tyrosinmotivs Y<sup>331</sup>ENI für die Regulation der BCR-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort durch Dok-3.



**Abbildung 6.15: Dok-3 GFP ist ein Negativregulator der Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung**

Die intra- und extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung in *dok-3*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen, die nach retroviralem Gentransfer die GFP-Versionen von Dok-3 (grüne Linie), ΔPH (gelbe Linie) und Y<sup>331</sup>F (braune Linie) exprimieren, wurde im Vergleich zu HA Dok-3-rekonstituierten *dok-3*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen untersucht (schwarze Linie). Die Zellen wurden mit Indo1-AM beladen und mit M4 in Abwesenheit von extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Ionen in 0,5 mM EGTA-haltiger Krebs-Ringerlösung stimuliert. Die zeitliche Veränderung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in Folge der Entleerung zellinterner Ca<sup>2+</sup>-Speicher wurde für 6 min durchflusscytometrisch dokumentiert, bevor die extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration auf 1 mM eingestellt wurde und der Einstrom extrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Ionen über die Plasmamembran für weitere 4 min verfolgt wurde (**A**). Zudem wurde die BCR-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung in *dok-3*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen analysiert, die die in der PH-Domäne inaktivierte Dok-3-Variante R<sup>26</sup>L GFP exprimieren (blaue Linie). Als Kontrolle dienen *dok-3*<sup>-/-</sup> (rote Linie) und mit Dok-3 GFP rekonstituierte DT40-Zellen (grüne Linie) (**B**).

Die *in vivo*-Analyse der subzellulären Lokalisation von Dok-3 erfolgte mittels CLSM. Vor und nach BCR-Stimulation für 180 s wurde die Lokalisation der Dok-3 GFP-Varianten in *dok-3<sup>-/-</sup>* DT40-Zellen dokumentiert (Abb. 6.16). Wildtypisches Dok-3 GFP ist konstitutiv und exklusiv an der Plasmamembran lokalisiert. Die gleichmäßige Verteilung des Fusionsproteins an der Plasmamembran geht dabei nach BCR-Stimulation in eine mehr punktierte Anordnung über (Abb. 6.16A). Sowohl die Deletion als auch die Inaktivierung der PH-Domäne ist mit dem vollständigen Verlust der konstitutiven Plasmamembranassoziation verbunden (Abb. 6.16B und C). Beide Fusionsproteine sind in unstimulierten DT40-Zellen gleichförmig im Cytosol lokalisiert, lediglich Dok-3 R<sup>26</sup>L GFP unterliegt nach BCR-Stimulation einer vergleichsweise geringfügigen Translokation an die Plasmamembran (Abb. 6.16C). Dok-3 Y<sup>331</sup>F GFP zeigt eine dem wildtypischen Fusionsprotein entsprechende Plasmamembranlokalisation (Abb. 6.16D).



**Abbildung 6.16: Dok-3 ist konstitutiv an der Plasmamembran lokalisiert**

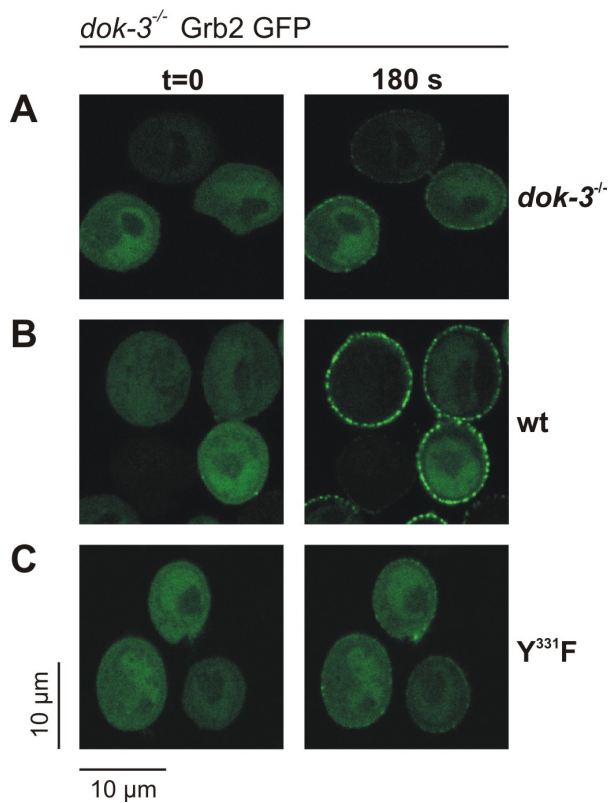
Die Lokalisation der GFP-markierten Dok-3-Fusionsproteine wurde mit Hilfe von CLSM in *dok-3<sup>-/-</sup>* DT40-Zellen analysiert. Vor (t=0) und nach Stimulation der Zellen über den BCR für t=180 s wurde die Lokalisation von wildtypischem Dok-3 (A), der Deletionsmutante Dok-3 ΔPH (B), der inaktivierten PH-Domänen-Variante R<sup>26</sup>L (C) sowie der Grb2-bindungsdefizienten Dok-3-Variante Y<sup>331</sup>F untersucht (D).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der Lokalisationsstudien, dass Dok-3 ein konstitutiv plasmamembranassoziiertes Adapterprotein ist. Die Grundlage der Plasmamembranlokalisation bildet die Funktion der Dok-3-PH-Domäne.

#### **6.4.4 Plasmamembranlokalisiertes Dok-3 rekrutiert Grb2**

Die Plasmamembranassoziation von Dok-3 und die BCR-induzierte Grb2-Bindung implizieren eine funktionelle Verknüpfung beider Adapterproteine in einem  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierenden Dok-3/Grb2-Signalmodul. Um die Bedeutung von Dok-3 als plasmamembranassoziiertes Grb2-Bindungspartner (vergl. 6.3) *in vivo* zu untersuchen, wurde das unter 6.3 beschriebene Grb2 GFP-Fusionsprotein in *dok-3<sup>-/-</sup>* DT40-Zellen exprimiert. Zusätzlich wurden die generierten Zellen mit HA Dok-3 und der Grb2-bindungsdefizienten Variante HA Dok-3 Y<sup>331</sup>F rekonstituiert. Die Lokalisation von Grb2 in den Zelllinien *dok-3<sup>-/-</sup>* Grb2 GFP, *dok-3<sup>-/-</sup>* HA Dok-3/Grb2 GFP und *dok-3<sup>-/-</sup>* HA Dok-3 Y<sup>331</sup>F/Grb2 GFP wurde vor und nach BCR-Stimulation mittels CLSM analysiert. In den wildtypisch rekonstituierten *dok-3<sup>-/-</sup>* Zellen resultiert die BCR-Stimulation in einer nahezu quantitativen Translokation des Grb2 GFP-Fusionsproteins aus dem Cytosol an die Plasmamembran (Abb. 6.17B). Im Gegensatz dazu bleibt die homogene cytosolische Verteilung von Grb2 GFP in HA Dok-3 Y<sup>331</sup>F exprimierenden sowie in nicht rekonstituierten *dok-3<sup>-/-</sup>* DT40-Zellen nach BCR-Stimulation unverändert (Abb. 6.17A und C). Somit stellt konstitutiv plasmamembranassoziiertes Dok-3 den zentralen Bindungspartner der stimulationsabhängigen Grb2-Membranrekrutierung in DT40 B-Zellen dar.





**Abbildung 6.17:**

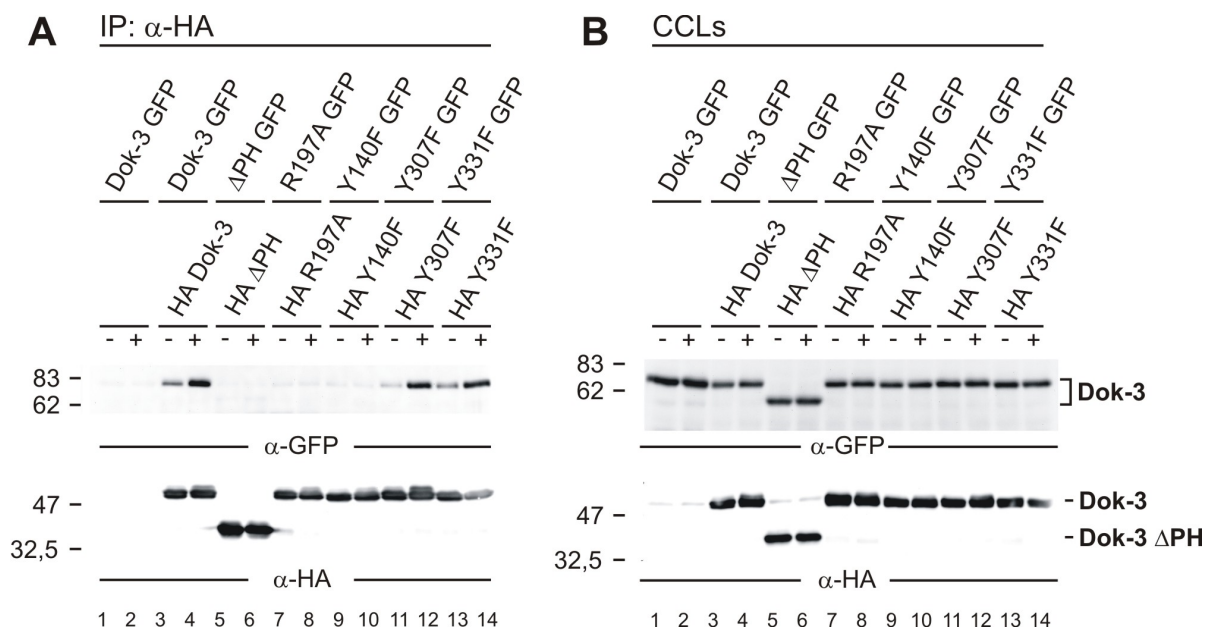
**Dok-3 rekrutiert Grb2 an die Plasmamembran**

Die subzelluläre Verteilung von GFP-markiertem Grb2 in *dok-3<sup>-/-</sup>* DT40-Zellen wurde mit Hilfe von CLSM analysiert. Vor (t=0) und nach Stimulation der Zellen über den BCR für t=180 s wurde die Lokalisation von Grb2 sowohl in Dok-3-defizienten (A) als auch in mit HA Dok-3-defizienten (B) und HA Y<sup>331</sup>F-rekonstituierten *dok-3<sup>-/-</sup>* DT40-Zellen (C) untersucht.

**6.4.5 Dok-3 unterliegt einer BCR-induzierten Oligomerisierung**

Die *in vivo imaging*-Analyse von Dok-3 und Grb2 (vergl. 6.3) zeigt eine stimulationsabhängige Relokalisation beider Proteine an der Plasmamembran, die in einer punktiert strukturierten Membranfluoreszenz resultiert. Eine Homo-Oligomerisierung des plasmamembranassoziierten Dok-3 als mögliche Ursache dieser BCR-induzierten Reorganisation der Membranfluoreszenz wurde biochemisch untersucht. Wildtypisches Dok-3 und die Varianten Dok-3 ΔPH, Dok-3 R<sup>197</sup>A, Dok-3 Y<sup>140</sup>F, Dok-3 Y<sup>307</sup>F und Dok-3 Y<sup>331</sup>F wurden jeweils als HA- und GFP-markierte Proteine in *dok-3<sup>-/-</sup>* DT40-Zellen coexprimiert. Die jeweilige HA-Variante wurde über eine anti-HA-Immunpräzipitation aus Lysaten unbehandelter und BCR-stimulierter Zellen aufgereinigt und im anti-GFP-Immunoblot auf die Coaufreinigung des GFP-markierten Proteins untersucht. In Abb. 6.18 ist deutlich erkennbar, dass das wildtypische HA-Protein Dok-3 GFP bereits im unstimulierten Zustand copräzipitiert, die BCR-Stimulation resultiert jedoch in einer signifikanten Zunahme der Dok-3/Dok-3-Assoziation (Spuren 3-4). Diese sowohl konstitutive als auch stimulationsabhängige Dok-3-Multimerisierung ist bei der Deletion der PH-Domäne

( $\Delta$ PH), der Inaktivierung der PTB-Domäne ( $R^{197}A$ ) und der Tyrosinmutanten  $Y^{140}F$  vollständig unterbunden (Spuren 5-10). Das Phosphorylierungsmotiv  $Y^{307}F$  ist wie das Grb2-bindende Phosphorylierungsmotiv  $Y^{331}F$  ohne Relevanz für die Dok-3/ Dok-3-Bindung, beide HA Dok-3 Varianten präzipitieren ihre GFP-Pendants in gleichem Ausmaß wie das wildtypische HA-Protein (Spuren 11-14). Somit ist die gezeigte Homo-Oligomerisierung ein im Wesentlichen BCR-induzierter Vorgang, der auf der intermolekularen Assoziation von Dok-3 über die PTB-Domäne und das Phospho-Motiv  $Y^{140}SSW$  basiert.

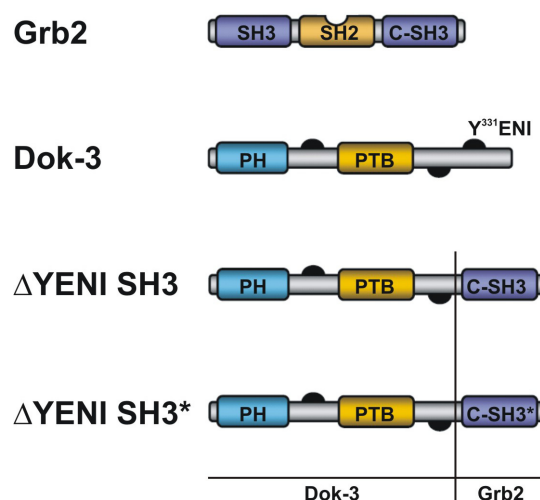


**Abbildung 6.18: Dok-3 unterliegt einer stimulationsabhängigen Homo-Oligomerisierung**

Mittels retroviraler Transduktion wurden *dok-3*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen mit Dok-3 GFP und den Mutanten  $\Delta$ PH,  $R^{197}A$ ,  $Y^{140}F$ ,  $Y^{307}F$  und  $Y^{331}F$  rekonstituiert und zusätzlich mit Expressionsvektoren für die jeweils entsprechende HA-Variante transfiziert. Die Zellen blieben unbehandelt (-) oder wurden für 3 min BCR-stimuliert (+). Die Lysate der Zellen wurden einer anti-HA-Immunaufreinigung unterzogen und die präzipitierten Proteine im Immunoblot-Verfahren mit anti-GFP- und anti-HA-Antikörpern analysiert (A). Zudem wurden die geklärten Totallysate (*cleared cellular lysates*, CCLs) für eine anti-GFP- und anti-HA-Immunoblot-Analyse eingesetzt (B). Linksseitig sind die relativen molekularen Massen eines Protein-Größenstandards angegeben.

### 6.4.6 Die C-terminale Grb2-SH3-Domäne und Dok-3 $\Delta$ YENI bilden eine funktionelle Chimäre

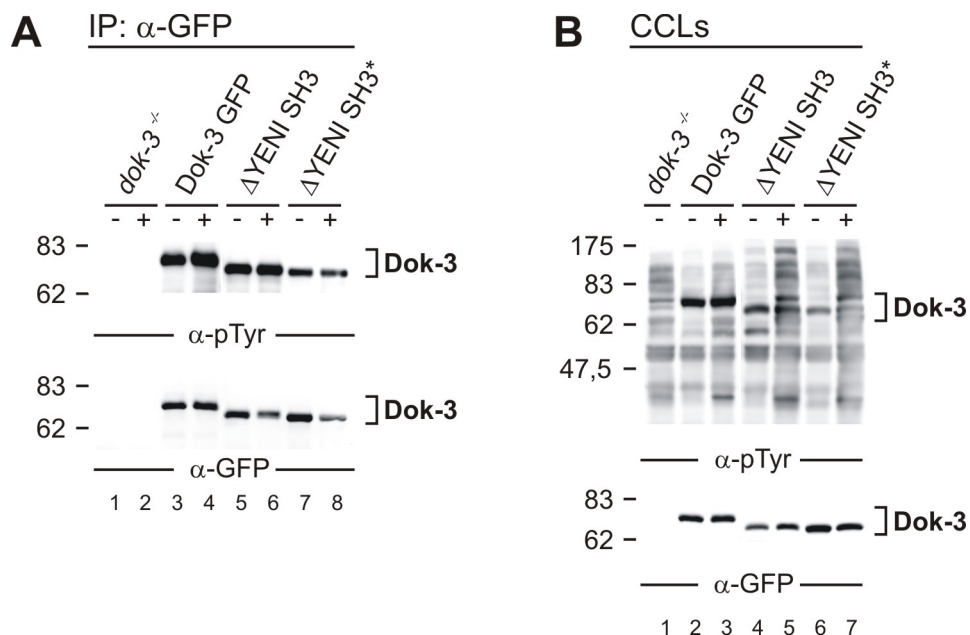
Die Charakterisierung sowohl der Dok-3- als auch der Grb2-vermittelten Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung lässt auf die funktionelle Einheit beider Mechanismen in einem Regulationsmodul schließen. Von entscheidender Bedeutung für die  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierende Funktion dieser potentiellen Dok-3/Grb2-Signaleinheit ist einerseits die BCR-induzierte Plasmamembranrekrutierung der C-terminalen Grb2-SH3-Domäne über eine SH2-Domänen/Phosphotyrosin-Interaktion des Grb2-Adapters (vergl. 6.3). Andererseits bildet die PH-Domänen-vermittelte Plasmamembranassoziation von Dok-3 sowie die BCR-abhängige Tyrosinphosphorylierung des Grb2-bindenden Motivs  $\text{Y}^{331}\text{ENI}$  die Basis der Dok-3-Funktion im Kontext der  $\text{Ca}^{2+}$ -Inhibition. Um die  $\text{Ca}^{2+}$ -regulatorische Kompetenz der C-terminalen Grb2-SH3-Domäne auf die konkrete Abhängigkeit der Dok-3-vermittelten Grb2-Membranrekrutierung zu untersuchen und im Umkehrschluss die Grb2-Bindung als Effektorfunktion von Dok-3 zu analysieren, wurden chimäre Dok-3/Grb2-Fusionsproteine generiert (Abb. 6.19). Die Domänenstruktur von  $\Delta$ YENI SH3 umfasst die N-terminale Dok-3-Aminosäuresequenz 1 bis 322 exklusiv des Grb2-bindenden  $\text{Y}^{331}\text{ENI}$ -Motivs und die C-terminale Grb2-SH3-Domäne (AS 151-217, AS-Sequenz siehe Abb. 9.5).



**Abbildung 6.19: Schematische Darstellung der Dok-3/Grb2-Chimären**

Die Fusionsproteine  $\Delta$ YENI SH3 und  $\Delta$ YENI SH3\* bestehen aus der N-terminalen AS-Sequenz von Dok-3 exklusiv des  $\text{Y}^{331}\text{ENI}$ -Motivs und der C-terminalen Grb2-SH3-Domäne (C-SH3) bzw. ihrer inaktivierten Variante SH3\* (C-SH3\*). Nicht dargestellt ist die C-terminale Fusion mit GFP. Schwarze Halbkreise in der Domänenstruktur symbolisieren Tyrosinmotive.

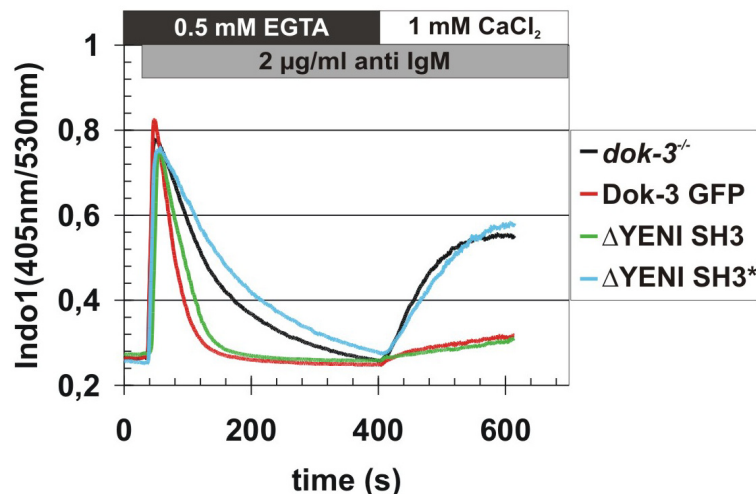
Dieses Konstrukt erlaubt es, die Funktion der über Dok-3 membranassoziierten Grb2-SH3-Domäne unabhängig der BCR-induzierten Grb2-SH2/Phosphotyrosin-Interaktion zu analysieren. Um die Ergebnisse der funktionellen Analyse des chimären Proteins in Abhängigkeit der Grb2-SH3-Domäne verifizieren zu können, wurde weiterhin ein Konstrukt für das Fusionsprotein  $\Delta$ YENI SH3\* hergestellt, in dem die SH3-Domäne durch ihre inaktivierte Variante W<sup>193</sup>K (vergl. 6.3) ersetzt ist. Diese zusätzlich C-terminal GFP-markierten Fusionsproteine  $\Delta$ YENI SH3 und  $\Delta$ YENI SH3\* wurden mittels retroviraler Transduktion in *dok-3*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen exprimiert und biochemisch sowie hinsichtlich der Lokalisation und ihrer Signalkompetenz untersucht. Mit Hilfe einer anti-GFP-Immunpräzipitation wurden die Chimären aus unbehandelten und BCR-stimulierten Zellen aufgereinigt und ihr Phosphorylierungsstatus im anti-Phosphotyrosin-Immunoblot analysiert (Abb. 6.20A). Im Gegensatz zu wildtypischem Dok-3 GFP zeigen die chimären Fusionsproteine eine schwache stimulationsinduzierte Tyrosinphosphorylierung. Die basale Phosphorylierung bleibt unverändert (Spuren 5-8), wobei diese im Fall von  $\Delta$ YENI SH3\* weniger stark ausgeprägt ist (Spuren 7-8).



**Abbildung 6.20: Expression und Tyrosinphosphorylierung der chimären Dok-3/Grb2-Proteine**  
 Expressionsvektoren für die GFP-markierten Chimären aus Dok-3  $\Delta$ YENI und der C-terminalen Grb2-SH3-Domäne,  $\Delta$ YENI SH3 und  $\Delta$ YENI SH3\*, wurden mittels retroviraler Infektion in *dok-3*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen eingebracht. Die Zellen blieben unbehandelt (-) oder wurden für 3 min BCR-stimuliert (+). Die Lysate der Zellen wurden einer anti-GFP-Immunpräzipitation unterzogen und die

Tyrosinphosphorylierung und Expression der Chimären durch die sequentielle anti-Phosphotyrosin- und anti-GFP-Entwicklung der Westernblot-Membran detektiert (**A**). Weiterhin wurden die geklärten Totallysate (*cleared cellular lysates*, CCLs) einer anti-pTyr- und anti-GFP-Immunoblot-Analyse unterzogen (**B**). Linksseitig sind die relativen molekularen Massen eines Protein-Größenstandards angegeben.

Durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluxanalysen wurde überprüft, ob die Dok-3/Grb2-Fusionsproteine die BCR-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung regulieren (Abb. 6.21). Die Expression von  $\Delta\text{YENI SH3}$  in *dok-3*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen rekonstituiert vollständig die für Dok-3 charakteristische Reduktion des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals (grüne und rote Linie). Dagegen bleibt das biphasische  $\text{Ca}^{2+}$ -Profil der *dok-3*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen auch in Gegenwart des Fusionsproteins  $\Delta\text{YENI SH3}^*$  unverändert (schwarze und blaue Linie).

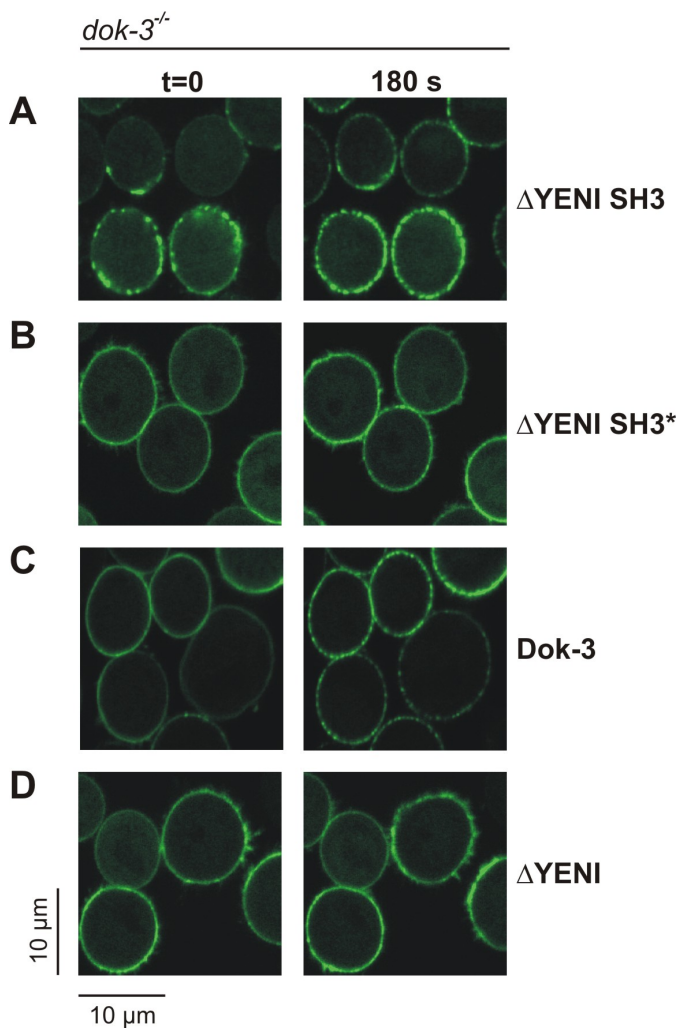


**Abbildung 6.21: Die C-terminale Grb2-SH3-Domäne und Dok-3  $\Delta\text{YENI}$  bilden ein negativregulatorisches Modul der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung**

Das BCR-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal in *dok-3*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen, die nach retroviraler Infektion die chimären Dok-3/Grb2-Proteine Dok-3  $\Delta\text{YENI SH3}$  GFP (grüne Linie) und Dok-3  $\Delta\text{YENI SH3}^*$  GFP (blaue Linie) exprimieren, wurde durchflusscytometrisch analysiert (vergl. 6.13). Parallel wurden  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluxanalysen Dok-3-defizienter und mit Dok-3 GFP rekonstituierter DT40-Zellen durchgeführt (schwarze bzw. rote Linie).

Die *in vivo*-Lokalisationsstudien mit Hilfe von CLSM bestätigten eine konstitutive Plasmamembranassoziation der GFP-markierten Chimären (Abb. 6.22). Unabhängig von der Grb2-SH3-Domäne vermittelt der Dok-3-Anteil die Lokalisation

der Chimären an der Plasmamembran (A, B und D). Auffällig ist, dass lediglich signalkompetentes Dok-3 GFP und  $\Delta$ YENI SH3 punktförmige Fluoreszenzsignale an der Plasmamembran zeigen (A und C). Diese sind bei  $\Delta$ YENI SH3 unabhängig der BCR-Stimulation zu beobachten.



**Abbildung 6.22:**

**Das minimale Dok-3/Grb2-Modul ist an der Plasmamembran lokalisiert**

Vor (t=0) und nach BCR-Stimulation für t=180 s wurde die Lokalisation der Dok-3/Grb2-Fusionsproteine Dok-3  $\Delta$ YENI SH3 GFP (**A**) und Dok-3  $\Delta$ YENI SH3\* GFP (**B**) in *dok-3<sup>-/-</sup>* DT40-Zellen mit Hilfe von CLSM analysiert. Als Referenz dienten mit Dok-3 GFP (**C**) und Dok-3  $\Delta$ YENI GFP (**D**) rekonstituierte *dok-3<sup>-/-</sup>* DT40-Zellen.

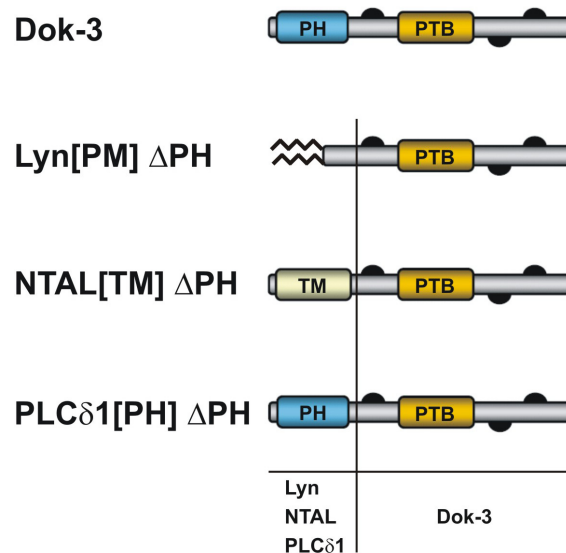
Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass allein die Fusion der C-terminalen Grb2-SH3-Domäne mit Grb2-bindungsdefizientem Dok-3 an der Plasmamembran ausreicht, um eine wildtypische  $Ca^{2+}$ -Regulation in *dok-3<sup>-/-</sup>* DT40-Zellen zu vermitteln. Darüber hinaus rekonstituiert die Dok-3-assoziierte C-terminale Grb2-SH3-Domäne auch in *grb2<sup>-/-</sup>* DT40-Zellen ein wildtypisches  $Ca^{2+}$ -Profil (Daten nicht gezeigt). Somit konnten die Adapterproteine Dok-3 und Grb2 als funktionell verknüpfte Komponenten einer gemeinsamen,  $Ca^{2+}$ -regulierenden Signaleinheit identifiziert werden. Die inhibitorische Regulation der  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung durch das



Dok-3/Grb2-Modul basiert auf der BCR-induzierten Plasmamembranrekrutierung der C-terminalen Grb2-SH3-Domäne über die Grb2-SH2/Dok-3 Y<sup>331</sup>ENI-Interaktion.

### 6.4.7 Lipid raft-targeting rekonstituiert die Funktion der Dok-3-PH-Domäne

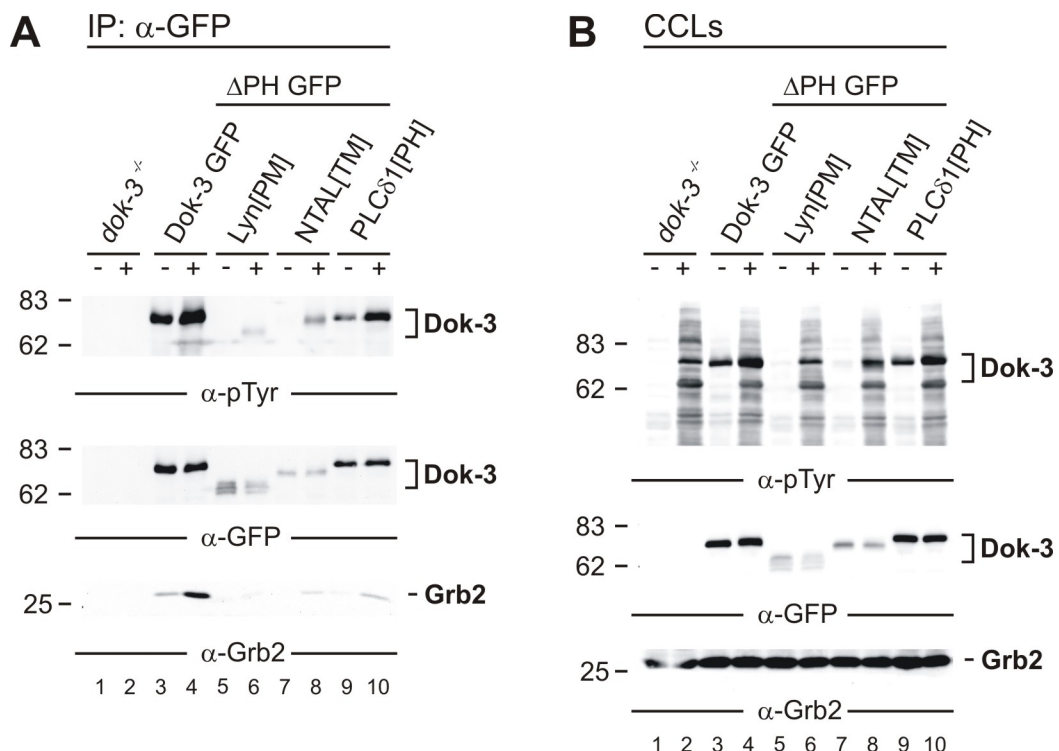
Die Negativregulation der BCR-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung durch Grb2 wird in reifen B-Zellen durch das Transmembranprotein NTAL (*non-T cell activation linker*) unterbunden (STORK et al., 2004). Demnach entscheidet die differentielle Rekrutierung von Grb2 an die Plasmamembran durch Dok-3 oder NTAL über das Profil des Ca<sup>2+</sup>-Signals in antigenstimulierten B-Zellen. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob Grb2 durch Dok-3 bzw. NTAL in distinkte Kompartimente der Plasmamembran rekrutiert wird oder Dok-3-intrinsische Funktionen die Inhibition der Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung vermitteln. Dazu wurde eine Reihe von chimären Dok-3-Fusionsproteinen mit unterschiedlichen Plasmamembran-*targeting*-Eigenschaften generiert (Abb. 6.23).



**Abbildung 6.23: Schematische Darstellung der Plasmamembran-*targeting*-Chimären**

Die Dok-3-PH-Domäne (AS 1-113) ist in den chimären Proteinen durch verschiedene Plasmamembran-*targeting*-Module ersetzt. Lyn[PM], Palmitoylierungs- und Myristoylierungssequenz von Lyn (Maus, AS 1-23); NTAL[TM], Transmembrandomäne von NTAL (Huhn, AS 1-94); PLCδ1[PH], PH-Domäne von PLCδ1 (Maus, AS 1-139). Nicht dargestellt ist die C-terminale Fusion mit GFP. Schwarze Halbkreise in der Domänenstruktur symbolisieren Tyrosinmotive.

Die Dok-3-PH-Domäne wurde in den hergestellten Fusionsproteinen durch die Palmitoylierungs- und Myristoylierungssequenz von Lyn, die Transmembrandomäne von NTAL sowie durch die PLCδ1-PH-Domäne ersetzt (AS-Sequenzen siehe Abb. 9.6-8). Die C-terminal GFP-markierten Chimären wurden durch retroviralen Gentransfer in *dok-3<sup>-/-</sup>* DT40-Zellen exprimiert und hinsichtlich ihrer Funktion analysiert. Der Phosphorylierungsstatus und die Grb2-Interaktion der durch anti-GFP-IP aus unbehandelten und BCR-stimulierten Zellen aufgereinigten Fusionsproteine Lyn[PM]-, NTAL[TM]- und PLCδ1[PH]-Dok-3 ΔPH GFP wurde im Immunoblot-Verfahren untersucht (Abb. 6.24A). Alle Dok-3-Chimären unterliegen einer BCR-induzierten Tyrosinphosphorylierung (Spuren 5-10). Die anti-Grb2-Entwicklung der Immunoblot-Membran zeigt die stimulationsabhängige Rekrutierung des Adapterproteins durch die Chimären NTAL[TM]- und PLCδ1[PH]-Dok-3 ΔPH GFP (Spuren 7-10). Nach Aufreinigung von Lyn[PM]-Dok-3 ΔPH GFP ist Grb2 nicht zu detektieren (Spuren 5-6).



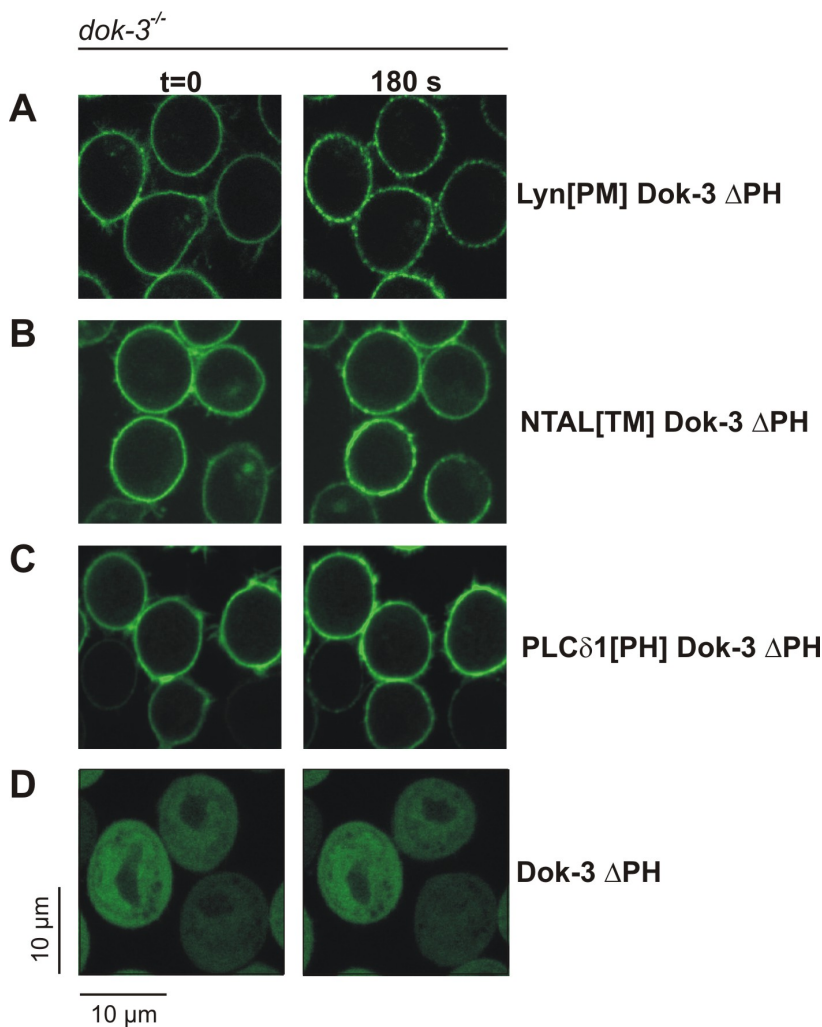
**Abbildung 6.24: Tyrosinphosphorylierung membranassoziierter Dok-3-Fusionsproteine**

Lysate aus unstimulierten (-) und 3 min BCR-stimulierten (+) *dok-3<sup>-/-</sup>* DT40-Zellen, die chimäre Dok-3-Varianten exprimieren, die mit verschiedenen Plasmamembran-Assoziationsmodulen fusioniert sind, wurden einer anti-GFP-Immünpräzipitation unterzogen. Die mit dem Lyn-Acylierungsmotiv (Lyn[PM], Spuren 5–6), der Transmembrandomäne von NTAL (NTAL[TM], Spuren 7–8) oder der



PLC $\delta$ 1-PH-Domäne (PLC $\delta$ 1[PH], Spuren 9-10) versehenen Dok-3  $\Delta$ PH-Fusionsproteine wurden durch die anti-Phosphotyrosin-Entwicklung ( $\alpha$ -pTyr) der Immunoblot-Membran analysiert. Die Interaktion der chimären Proteine mit Grb2 wurde durch die anti-Grb2-Entwicklung derselben Membran untersucht (A). Zusätzlich wurden die geklärten Totallysate (*cleared cellular lysates*, CCLs) für eine anti-pTyr-Immunoblot-Analyse eingesetzt und die Membran sequentiell mit anti-GFP- und anti-Grb2-Antikörpern entwickelt (B). Linksseitig sind die relativen molekularen Massen eines Protein-Größenstandards angegeben.

Im *in vivo-imaging*-Verfahren wurden die Chimären auf die Plasmamembranlokalisierung geprüft (Abb. 6.25). Sämtliche Plasmamembran-*targeting*-Module vermitteln eine konstitutive und annähernd exklusive Lokalisation der Fusionsproteine an der Plasmamembran (A-C).

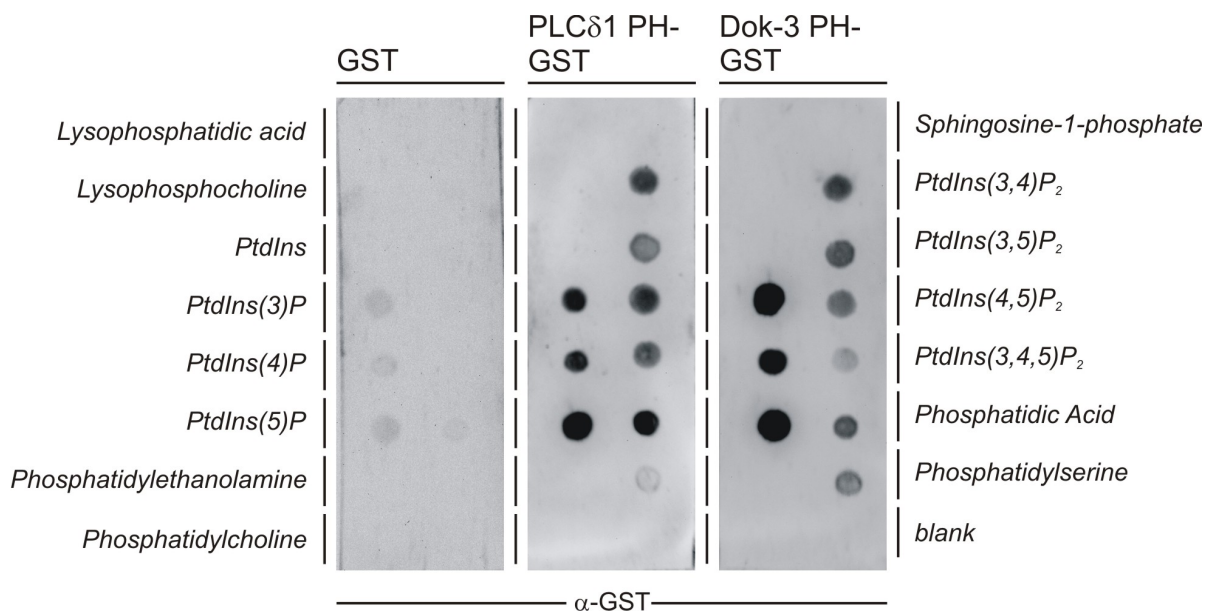


**Abbildung 6.25:**

**Die chimären Dok-3-Fusionsproteine sind an der Plasmamembran lokalisiert**

Vor (t=0) und nach BCR-Stimulation für t=180 s wurde die Lokalisation der Dok-3-Fusionsproteine Lyn[PM] Dok-3  $\Delta$ PH GFP (A), NTAL[TM] Dok-3  $\Delta$ PH GFP (B) und PLC $\delta$ 1[PH] Dok-3  $\Delta$ PH GFP (C) in *dok-3<sup>-/-</sup>* DT40-Zellen mit Hilfe von CLSM analysiert. Als Referenz dienten mit Dok-3  $\Delta$ PH GFP rekonstituierte *dok-3<sup>-/-</sup>* DT40-Zellen (D).

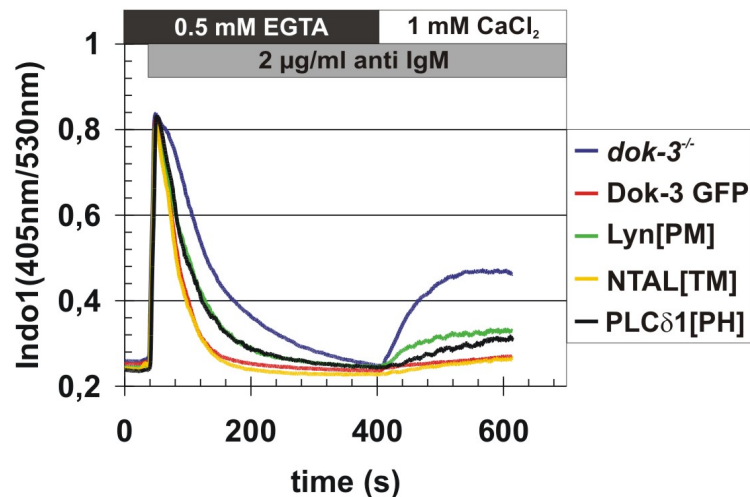
Ergänzend wurde die der Plasmamembranlokalisierung zugrundeliegende Phospholipid-Bindungsspezifität der PLC $\delta$ 1-PH-Domäne und der Dok-3-PH-Domäne biochemisch charakterisiert. Im *PIP-strip*<sup>TM</sup>-Verfahren wurden GST-Fusionsproteine der PLC $\delta$ 1-PH- und Dok-3-PH-Domäne auf die Bindung an verschiedene Phospholipide untersucht (Abb. 6.26). Beide PH-Domänen weisen eine erhöhte Bindungsspezifität für die Bisphospho-Derivate des Phosphatidylinositolphosphats (PIP) gegenüber der Trisphospho-Variante auf, wobei die PLC $\delta$ 1-PH-Domäne bevorzugt PI(4,5)P<sub>2</sub> und die Dok-3-PH-Domäne PI(3,4)P<sub>2</sub> bindet.



**Abbildung 6.26: Vergleich der Phospholipid-Bindungsspezifität der PLC $\delta$ 1- und Dok-3-PH-Domäne**

GST-Fusionsproteine der PLC $\delta$ 1-PH- (AS 11-141, Ratte) und Dok-3-PH-Domäne (AS 1-130, Huhn) wurden im *PIP-strip*<sup>TM</sup>-Verfahren auf die Bindung an verschiedene Phospholipide untersucht. Die Lipide sind dabei auf einer hydrophoben Membran immobilisiert, die mit den GST-Fusionsproteinen inkubiert wurde. Die Detektion der gebundenen GST-PH-Domänen erfolgte mittels anti-GST Antikörper. GST wurde als Spezifitätskontrolle eingesetzt (links).

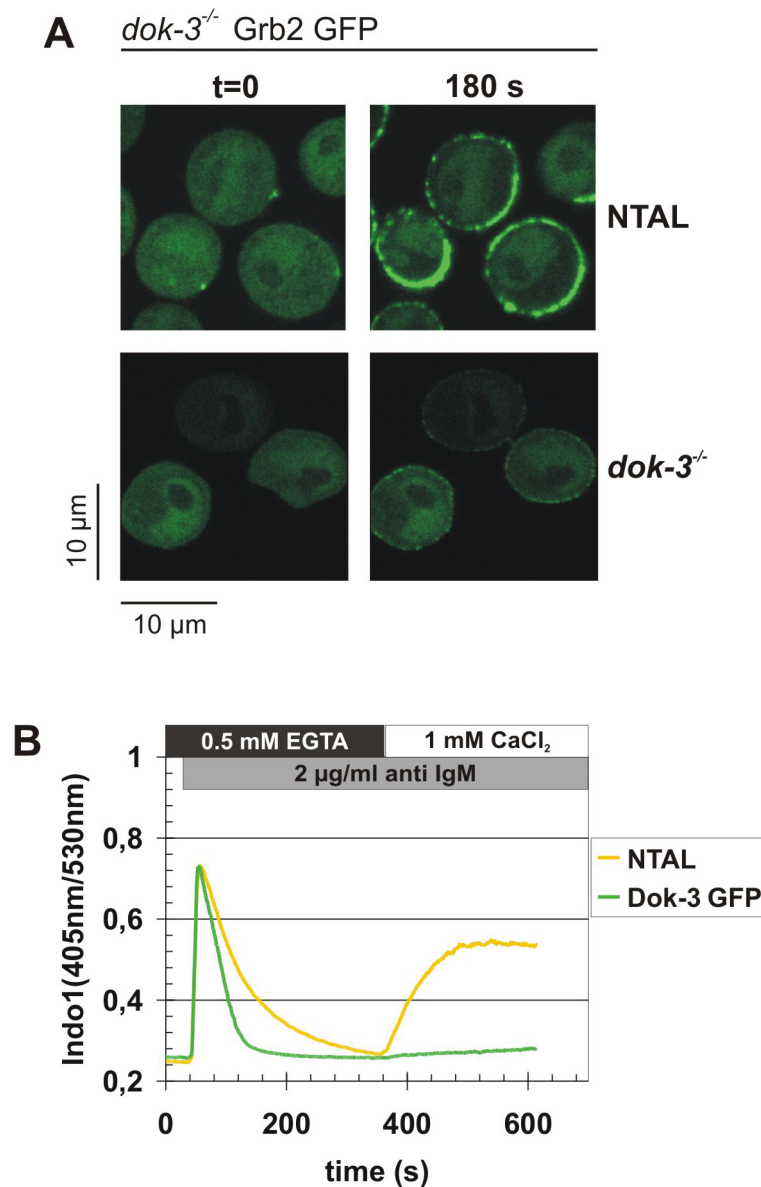
Die  $\text{Ca}^{2+}$ -regulatorische Funktion der Dok-3-Chimären wurde wiederum über die Analyse der intra- und extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung untersucht (Abb. 6.27). Jedes der chimären Fusionsproteine erzeugt unabhängig des zugrundeliegenden Plasmamembran-*targetings* ein monophasisches  $\text{Ca}^{2+}$ -Profil in *dok-3*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen.



**Abbildung 6.27: Die plasmamembranassoziierten Dok-3-Chimären sind funktionelle Negativregulatoren der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort in DT40-Zellen**

Das BCR-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal in *dok-3*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen, die nach retroviraler Infektion die chimären Dok-3-Fusionsproteine Lyn[PM] Dok-3  $\Delta$ PH GFP (grüne Linie), NTAL[TM] Dok-3  $\Delta$ PH GFP (gelbe Linie) und PLC $\delta$ 1[PH] Dok-3  $\Delta$ PH GFP (schwarze Linie) exprimieren, wurde durchflusscytometrisch analysiert (vergl 6.13). Parallel wurden  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluxanalysen Dok-3-defizienter und mit Dok-3 GFP rekonstituierter DT40-Zellen durchgeführt (blaue bzw. rote Linie).

Um die Dok-3-Abhängigkeit der Chimären eindeutig zu belegen, wurden zudem *dok-3*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen mit wildtypischem NTAL rekonstituiert. Die entsprechenden Zellen wurden sowohl im Hinblick auf die *in vivo*-Rekrutierung von Grb2 GFP durch NTAL als auch auf die Beeinflussung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort analysiert. Obwohl NTAL eine Dok-3-analoge, stimulationsabhängige Plasmamembranrekrutierung von Grb2 vermittelt (Abb. 6.28A), bleibt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung unbeeinflusst von NTAL (Abb. 6.28B).



**Abbildung 6.28: Die Ca<sup>2+</sup>-Antwort in NTAL-exprimierenden *dok-3<sup>-/-</sup>* DT40-Zellen ist unverändert**  
 Im *in vivo-imaging*-Verfahren wurde die stimulationsabhängige Plasmamembranrekretierung von Grb2 GFP in Dok-3-defizienten und NTAL-exprimierenden *dok-3<sup>-/-</sup>* DT40-Zellen untersucht. Die Lokalisation von Grb2 GFP wurde vor (t=0) und nach BCR-Stimulation (t=180 s) dokumentiert (**A**). Das BCR-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Signal in *dok-3<sup>-/-</sup>* DT40-Zellen, die das Adapterprotein NTAL exprimieren (gelbe Linie), wurde im Vergleich zu Dok-3 GFP rekonstituierten *dok-3<sup>-/-</sup>* DT40-Zellen (grüne Linie) durchflusscytometrisch analysiert (**B**).

Zusammenfassend schließen diese Daten die Regulation der Grb2-Funktion über die Rekrutierung des Adapters in distinkte Kompartimente der Plasmamembran aus. Die Effektorfunktion von Grb2 an der Plasmamembran im Kontext der Ca<sup>2+</sup>-Regulation wird spezifisch durch die Dok-3/Grb2-Interaktion definiert.

## 7. Diskussion

BCR-vermittelte Signale sind essentiell für die Entwicklung und Funktion von B-Lymphocyten. Grundlage der intrazellulären Signalverarbeitung stellen Multiproteinkomplexe dar. Stimulationsinduziert bildet eine Vielzahl signalleitender Proteine mit Hilfe von modularen Interaktionsdomänen komplexe Signaltransduktionsnetzwerke. Über die variable Integration positiv- wie negativregulatorischer Elemente ermöglichen diese molekularen Schaltkreise verschiedene zelluläre Antworten. So ist die BCR-Signalleitung mit unterschiedlichsten zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung, Aktivierung von Effektorfunktionen bis hin zur Apoptose verknüpft. Von entscheidender Bedeutung für die Integrität der BCR-Signalleitung und ihre Regulation ist die strikte räumliche und strukturelle Organisation von Signalmodulen durch Adapterproteine. Als gerüstbildende Elemente vermitteln Adapterproteine die Interaktion von Effektorproteinen und ihren Substraten, kontrollieren die subzelluläre Lokalisation von Signalkomplexen und regulieren darüber hinaus die Aktivität von Signalleitungskomponenten unmittelbar über Protein-Proteininteraktionen. Erst diese koordinierende Funktion ermöglicht die effektive kaskadenartige Verknüpfung der enzymatischen Aktivität verschiedener Netzwerkelemente, die die Grundlage des Informationsflusses bildet.

Ein Schlüsselprozess der BCR-Signalleitung ist die durch das Adapterprotein SLP-65 vermittelte Organisation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes. Obgleich die molekulare Struktur und die funktionelle Vernetzung des SLP-65, Btk und  $\text{PLC}\gamma 2$  umfassenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes weitestgehend aufgeklärt sind, ist ein zentraler Aspekt der SLP-65-Funktion wenig verstanden: Wie organisiert SLP-65 die räumliche Einbindung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes in die BCR-Signalkaskade an der Plasmamembran?

Das Profil der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort wird von einem Signalkomplex reguliert, der durch das Adapterprotein Grb2 gebildet wird. Auch hier ist die subzelluläre Verteilung von Grb2 ein entscheidender Parameter. Die Aufklärung der dynamischen räumlichen Organisation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes durch SLP-65 sowie die Analyse der Grb2-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluxregulation in Abhängigkeit der subzellulären

Lokalisation der Adapterproteine stehen im Focus der vorliegenden Arbeit. Mit Hilfe bildgebender Verfahren konnten Bildung und Lokalisation der genannten Signalmodule erstmalig *in vivo* in DT40 B-Zellen dokumentiert werden. In Kombination mit biochemischen Daten ergeben sich folgende Kernaussagen über die Funktionsweise der Adapterproteine SLP-65 und Grb2:

- 1.) SLP-65 unterliegt einer BCR-induzierten Translokation aus dem Cytosol an die Plasmamembran in Abhängigkeit des N-terminalen *leucine zipper*-Motivs und der C-terminalen SH2-Domäne. Die Tyrosinphosphorylierung von SLP-65 ist für diesen Vorgang nicht notwendig.
- 2.) Die Negativregulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung durch Grb2 in unreifen B-Zellen ist mit der stimulationsabhängigen Plasmamembranassoziation des Adapterproteins verbunden. Während die zentrale SH2-Domäne die phosphotyrosinabhängige Membranrekrutierung vermittelt, ist die C-terminale SH3-Domäne für die  $\text{Ca}^{2+}$ -regulatorische Funktion von Grb2 verantwortlich.
- 3.) Die  $\text{Ca}^{2+}$ -regulatorische Funktion von Grb2 in unreifen und reifen B-Zellen wird durch die subzelluläre Lokalisation des Adapters definiert. Essentiell für die Grb2-vermittelte Inhibition des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals in unreifen B-Zellen ist die Rekrutierung von Grb2 durch das konstitutiv plasmamembranassoziierte Adapterprotein Dok-3. Die Bindung von Grb2 an den Transmembranadapter NTAL in reifen B-Zellen hebt diesen  $\text{Ca}^{2+}$ -inhibitorischen Effekt auf.

### **7.1 SLP-65 wird BCR-induziert an die Plasmamembran rekrutiert**

Das Adapterprotein SLP-65 nimmt eine Schlüsselposition in der BCR-Signalleitung ein. Als Organisationsplattform des  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes bildet SLP-65 eine zentrale molekulare Schaltstelle, die BCR-Signale an eine Vielzahl zellulärer Prozesse koppelt. Die übergeordnete Bedeutung der Adapterfunktion von SLP-65 für die zelluläre Informationsverarbeitung demonstriert die gestörte B-Zell-Entwicklung und -Funktion von SLP-65-defizienten Mäusen und Menschen mit Mutationen in SLP-65 (JUMAA et al., 1999; MINEGISHI et al., 1999; PAPPU et al., 1999). Zudem ist die SLP-65-Defizienz mit dem vermehrten Auftreten von Prä-B-

Zellleukämien verbunden, was eine Tumorsuppressorfunktion von SLP-65 über die Begrenzung der Prä-B-Zellexpansion nahelegt (FLEMMING et al., 2003; JUMAA et al., 2003; KERSSEBOOM et al., 2003). Zahlreiche Aspekte der molekularen Funktionsweise und die strikte SLP-65-Abhängigkeit des  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes wurden in Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen aufgeklärt. Nur die simultane räumliche Organisation von Btk und  $\text{PLC}\gamma 2$  durch tyrosinphosphoryliertes SLP-65 ermöglicht die sequentielle Aktivierung von Btk und  $\text{PLC}\gamma 2$  (FU et al., 1998; HASHIMOTO et al., 1999; SU et al., 1999; ISHIAI et al., 1999a; KUROSAKI and TSUKADA, 2000; CHIU et al., 2002). Die enzymatische Aktivität von  $\text{PLC}\gamma 2$  bildet die Basis der BCR-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung durch die Hydrolyse des Membranlipids PIP2 in die *second messenger* IP3 und DAG (HIKIDA and KUROSAKI, 2005).

Ungeklärt war jedoch bislang, wie SLP-65 selbst an den aktivierten BCR-Komplex in der Plasmamembran rekrutiert wird und so der Phosphorylierung durch Syk zugänglich gemacht wird. Zudem impliziert die Lokalisation des  $\text{PLC}\gamma 2$ -Substrats PIP2 die funktionelle Notwendigkeit der räumlichen Organisation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes an der Plasmamembran.

In dieser Arbeit konnte die postulierte Membranlokalisation von SLP-65 durch den Einsatz von *live imaging*-Verfahren erstmalig als dynamischer Prozess *in vivo* dokumentiert werden. BCR-induziert transloziert SLP-65 aus dem Cytosol an die Plasmamembran. Dieser Vorgang erfordert sowohl die Funktion des N-terminalen *leucine zipper*-Motivs als auch der C-terminalen SH2-Domäne. Bereits die Deletion eines dieser Interaktionsmodule unterbindet die stimulationsinduzierte Umverteilung des Adapterproteins an die Plasmamembran.

Eine zentrale Rolle des N-terminalen *leucine zipper*-Motivs für die Membranrekrutierung von SLP-65 ist erstmals durch Arbeiten von Köhler et al. beschrieben (KOHLER et al., 2005). *Leucine zipper*-Motive bilden  $\alpha$ -helikale Strukturen, die ursprünglich als *coiled-coil*-Interaktionsmodule von Transkriptionsfaktoren identifiziert wurden (LANDSCHULZ et al., 1988). Köhler et al. schlagen eine konstitutive Membranassoziation von SLP-65 allein durch den *leucine zipper* und einen noch zu charakterisierenden Bindungspartner vor. Basis dieser Hypothese bilden im Wesentlichen Daten aus Hefe- und Insektenzellen.

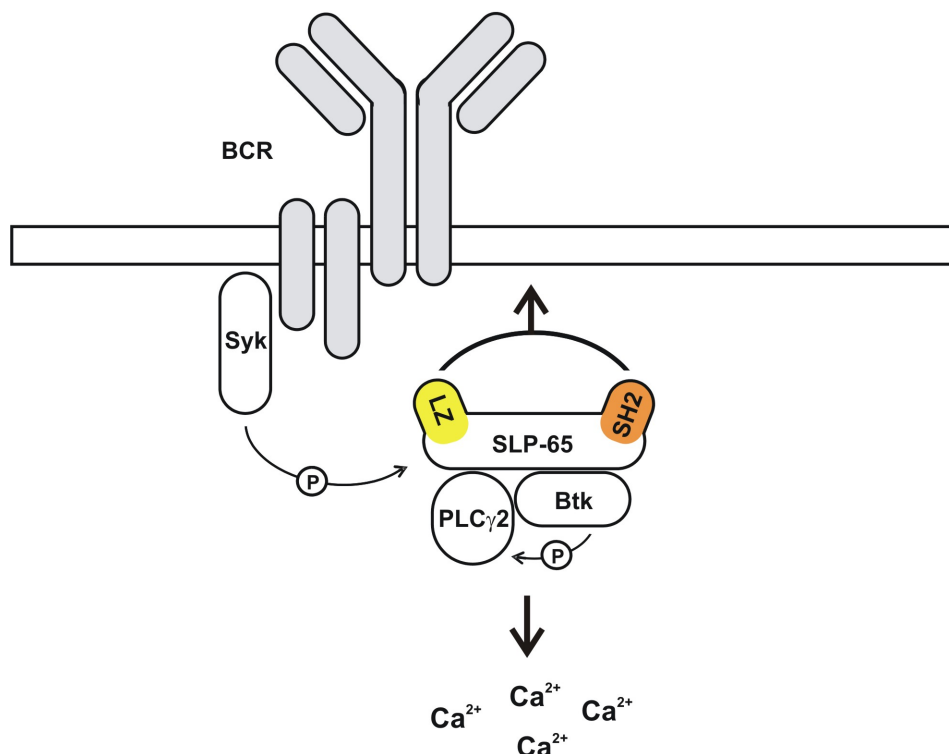
Auch biochemische und bildgebende Lokalisationsstudien in unbehandelten K46 B-Zellen belegen eine schwache Membranassoziation von SLP-65 in Abhängigkeit des *leucine zipper*-Motivs. Bei einer grundsätzlich cytosolischen Verteilung von SLP-65 erforderte die Detektion des geringen Anteils von plasmamembranassoziiertem SLP-65 jedoch den Einsatz von *photobleaching*-Experimenten (KÖHLER et al., 2005). Bei diesen wurde die Fluorophorkomponente sämtlicher frei im Cytosol beweglichen SLP-65-Fusionsproteine durch intensive Laserbestrahlung in distinkten Zellbereichen gebleicht. Das an der Plasmamembran verbliebene Fluoreszenzsignal verweist auf eine konstitutive Membranassoziation von SLP-65, die in Gegenwart des Hauptanteils von cytosolisch lokalisiertem SLP-65 nicht detektierbar ist. Inwieweit SLP-65 einer BCR-induzierten Relokalisation unterliegt und diese unabhängig der SH2-Domänen-Funktion erfolgt, wurde von Köhler et al. nicht untersucht. Die essentielle Bedeutung des *leucine zipper*-Motivs konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Durch die Verwendung der *slp-65<sup>-/-</sup>* DT40 B-Zelllinie war es hier möglich, die SLP-65-Fusionsproteine in Abwesenheit endogener SLP-65-Expression zu analysieren. So konnte ich über die Arbeiten von Köhler et al. hinaus zeigen, dass das *leucine zipper*-Motiv auch für die BCR-induzierte Relokalisation von SLP-65 an die Plasmamembran essentiell ist.

Allerdings ist das *leucine zipper*-Motiv allein nicht hinreichend für diesen Vorgang. Die in meiner Studie aufgezeigte Notwendigkeit von *leucine zipper* und der C-terminalen SH2-Domäne für die stimulationsvermittelte Plasmamembranrekrutierung von SLP-65 stützt unter Berücksichtigung des *leucine zipper*-Beitrags zudem einen phosphotyrosinbasierten Mechanismus. Ein potentieller Bindungspartner der SLP-65-SH2-Domäne ist das phosphorylierte nicht-ITAM-Tyrosin<sup>204</sup> von Ig- $\alpha$  (ENGELS et al., 2001; KABAK et al., 2002). Obwohl diese Interaktion ein attraktives Modell der räumlichen Verknüpfung von SLP-65 und dem aktivierten BCR-Komplex in der Plasmamembran darstellt, ist ihre Bedeutung als zentraler Membranrekrutierungsmechanismus fraglich. Die Phenylalaninsubstitution des entsprechenden Tyrosinrestes im Ig- $\alpha$  Y<sup>204</sup>F-Mausmodell ist nicht mit einem grundlegenden Defekt der BCR-Signalleitung verbunden. Mit Ausnahme einer beeinträchtigten B-Zellreaktion auf T-Zell-unabhängige Antigene wurde keine allgemeine Störung der B-Zellentwicklung und Funktion beobachtet (PATTERSON et



al., 2006). Ein weiterer Bindungspartner der SLP-65-SH2-Domäne ist die Serin/Threonin-Kinase HPK1 (*hematopoietic progenitor kinase 1*), die an der Regulation des MAPK-Signalweges (*mitogen-activated protein kinase*) beteiligt ist (LIU et al., 2000; SAUER et al., 2001; BOOMER and TAN, 2005). Eine plasmamembranrekrutierende Funktion von HPK1 ist unwahrscheinlich, vielmehr wird eine Einbindung der Kinase selbst über SLP-65 in die BCR-Signalleitung diskutiert (SAUER et al., 2001).

Trotz der bislang ausstehenden Identifikation von entscheidenden membranlokalisierten Interaktionspartnern des *leucine zipper* und der SH2-Domäne belegen die Ergebnisse der eigenen funktionellen Analysen die grundsätzliche Bedeutung der BCR-induzierten Plasmamembranrekrutierung für die Aktivierung von SLP-65. Nur die konzertierte Funktion des *leucine zipper* und der SH2-Domäne von SLP-65 erlaubt die Organisation eines funktionellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes.



**Abbildung 7.1: Die BCR-induzierte Plasmamembranrekrutierung von SLP-65 erfordert sowohl die Funktion des *leucine zipper*-Motivs als auch der SH2-Domäne**

Das Adapterprotein SLP-65 wird in Abhängigkeit des N-terminalen *leucine zipper*-Motivs (LZ) und der C-terminalen SH2-Domäne (SH2) BCR-induziert an die Plasmamembran rekrutiert. Dieser Vorgang bildet die Voraussetzung für die Syk-vermittelte Phosphorylierung von SLP-65 und die Organisation eines funktionellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes.

Zudem wird die Stellung der Plasmamembranrekrutierung von SLP-65 als Voraussetzung und nicht als einhergehender Prozess der BCR-Signalleitung durch meine Beobachtung gestützt, dass sie unabhängig der Syk-vermittelten Tyrosinphosphorylierung des Adapters erfolgt. Auch in Abwesenheit seiner Tyrosinphosphorylierungsmotive ( $Y^{allF}$ ) wird SLP-65 BCR-induziert an die Plasmamembran rekrutiert. Eine indirekte Membranassoziation von SLP-65 durch die phospholipidbindenden PH-Domänen von Btk und PLC $\gamma$ 2 ist daher als Grundlage der Plasmamembranrekrutierung auszuschließen, eine stabilisierende oder regulatorische Komponente dieser Interaktion wird in der Literatur diskutiert (BOLLAND et al., 1998; VARNAI et al., 1999; BOBE et al., 2001; KANG et al., 2001; NISHIDA et al., 2003; YU et al., 2005).

Die Klärung der individuellen Beiträge des *leucine zippers* und der SH2-Domäne und ihre funktionelle Verknüpfung bei der Plasmamembranrekrutierung von SLP-65 erfordert die Identifikation der/des entsprechenden Bindungspartner/s. Insbesondere die Analyse des Bindungsverhaltens und der Spezifität des *leucine zippers* könnte Anhaltspunkte für die gemeinschaftliche Funktionsweise mit der SH2-Domäne liefern. Die Aminosäuresequenz des *leucine zippers* (AS 1-45) weist neben den Leucinresten einen hohen Anteil an Lysinresten auf (10 Lysinreste in Hühner SLP-65, 8 davon konserviert in Mensch und Maus). Derartige basische Sequenzbereiche werden oft in phospholipidbindenden Proteindomänen gefunden (MCLAUGHLIN et al., 2002). So vermittelt ein lysinreiches Sequenzmotiv von 20 AS im N-Terminus des Adapterproteins TIRAP (*TIR domain-containing adaptor protein*; AS 15-35, Maus) über die Bindung von Phosphatidylinositolen die konstitutive Plasmamembranlokalisation des Proteins (KAGAN and MEDZHITOV, 2006). Inwiefern der SLP-65-*leucine zipper* ein vergleichbares Bindungsverhalten aufweist und so eine direkte Phospholipid-Interaktion ermöglicht, bleibt aufzuklären. In Annahme einer vorwiegend konstitutiven, geringen Affinität des *leucine zippers* zu Proteinen oder Lipidkomponenten der Plasmamembran könnte die zusätzliche SH2/Phosphotyrosin-Interaktion mit BCR-assoziierten Komponenten die stimulationsabhängige Auslöseschwelle der aufgezeigten SLP-65-Membranrekrutierung bilden. Möglicherweise gewährleistet eine derartige Verknüpfung zweier individuell nicht ausreichend affiner Interaktionsmodi eine strikte, aber dennoch zuverlässige BCR-Abhängigkeit der Membranrekrutierung und

Aktivierung von SLP-65 als zentralen Organisator der Signalleitung. Eine *leucine zipper*-vermittelte Bindung an Phospholipide der Plasmamembran könnte zudem an der Adressierung von SLP-65 in distinkte, signalleitende Mikrodomänen der Plasmamembran beteiligt sein. Die Existenz von verschiedenen Phospholipid-*pools* innerhalb der Plasmamembran in Kombination mit Protein/Phospholipid-Interaktionen wird in der Literatur als allgemeines Konzept der subzellulären Navigation und Koordination von Signalmolekülen diskutiert (McLAUGHLIN et al., 2002; DI PAOLO and DE CAMILLI, 2006). Ob die beobachtete BCR-induzierte Akkumulation von SLP-65 in diskreten Bereichen der Plasmamembran (vergl. Abb. 6.4) in einem Zusammenhang mit diesem Modell steht, bleibt zu untersuchen.

Alternativ ist ein Szenario in Betracht zu ziehen, in dem der *leucine zipper* oder die SH2-Domäne als alleiniges Plasmamembran-*targeting*-Modul in SLP-65 fungiert, dessen Funktion jedoch die Gegenwart der jeweils anderen Proteindomäne erfordert. So könnte die Aktivierung der plasmamembranrekrutierenden SLP-65-Domäne über einen konformationsbasierten Mechanismus an die Funktion der „Schalter“-Domäne gekoppelt sein. Wird der SLP-65-SH2-Domäne eine solche „Schalter“-Funktion zugeordnet, könnte eine grundsätzlich konstitutive Plasmamembranaffinität des *leucine zippers* BCR-abhängig reguliert werden und die hier dokumentierte dynamische Plasmamembranrekrutierung von SLP-65 vermitteln. Erste intramolekulare FRET-Analysen (*fluorescence resonance energy transfer*) von N- und C-terminal fluorophormarkiertem SLP-65 weisen auf eine BCR-induzierte Konformationsänderung des Proteins hin. Weitere Studien bezüglich der Konformationsänderung von SLP-65 sowie der Funktionweise von *leucine zipper*-Motiv und der SH2-Domäne sollten zur Aufklärung des detaillierten Mechanismus der SLP-65-Plasmamembranrekrutierung beitragen.

## 7.2 Dok-3 und Grb2 bilden ein $\text{Ca}^{2+}$ -inhibitorisches Signalmodul

Das Adapterprotein Grb2 ist als Negativregulator der BCR-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort in unreifen B-Zellen beschrieben (STORK et al., 2004). Wildtypische DT40-Zellen generieren ein monophasisches  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal, welches nahezu ausschließlich auf der Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Speichern basiert. Dahingegen zeigen Grb2-defiziente DT40-Zellen ein biphasisches  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal, das aus der Entleerung zelleigener Speicher und dem ausgeprägten Einstrom von extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen über die Plasmamembran resultiert. Grundlage dieser inhibitorischen Grb2-Funktion bilden die zentrale SH2-Domäne und die C-terminale SH3-Domäne des Proteins (STORK et al., 2004). Interaktionspartner und Effektorproteine, die in diesen Prozess involviert sind, sind bislang ebenso wenig charakterisiert wie die subzelluläre Organisation von Grb2 in der BCR-Signalleitung.

Die *in vivo*-Analyse der Grb2-Lokalisation in dieser Arbeit zeigt erstmals eine BCR-induzierte Plasmamembranrekrutierung des Adapterproteins in DT40 B-Zellen. In Abhängigkeit der zentralen SH2-Domäne unterliegt Grb2 einer nahezu quantitativen Translokation aus dem Cytosol an die Plasmamembran. Die Voraussetzung für diesen Vorgang bildet die Lyn-vermittelte Tyrosinphosphorylierung eines Grb2-Bindungspartners. Die Beobachtung, dass die C-terminale SH3-Domäne an diesem Vorgang nicht beteiligt ist, jedoch ebenso wie die SH2-Domäne essentiell für die  $\text{Ca}^{2+}$ -regulatorische Funktion von Grb2 ist, impliziert eine Effektorrekrutierung durch die SH3-Domäne in Abhängigkeit einer SH2-Domänen-vermittelten Plasmamembranassoziation.

Über seine Eigenschaft als Grb2-bindendes Phosphoprotein BCR-stimulierter DT40-Zellen konnte das Adapterprotein Dok-3 als potentieller Grb2-Interaktionspartner im Kontext der  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation durch Arbeiten von Dr. B. Stork identifiziert werden (STORK et al., 2007). In der Tat wird in der eigenen Studie keine BCR-induzierte Plasmamembranrekrutierung von Grb2 in *dok-3<sup>-/-</sup>* DT40-Zellen beobachtet. Zudem weist die BCR-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort von *dok-3<sup>-/-</sup>* DT40-Zellen auf die funktionelle Verknüpfung von Grb2 und Dok-3 in einem  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierenden Dok-3/Grb2-Signalmodul hin. Das  $\text{Ca}^{2+}$ -Profil von *dok-3<sup>-/-</sup>* DT40-Zellen ist analog der *grb2<sup>-/-</sup>* DT40-Variante durch die vermehrte Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Speichern und dem Extrazellulärraum gekennzeichnet (STORK et al.,

2004). Bisherige Arbeiten beschreiben die stimulationsabhängige Interaktion von murinem Dok-3 mit den negativregulatorischen Elementen der BCR-Signalleitung SHIP (*SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase*) und Csk (*C-terminal Src kinase*) (LEMAY et al., 2000; ROBSON et al., 2004). Während die Bindung von Csk ausschließlich von der Dok-3-Tyrosinphosphorylierung abhängig ist, kann die SHIP-Interaktion zudem über die Dok-3-PTB-Domäne erfolgen (LEMAY et al., 2000). Die physiologische Relevanz der Csk/Dok-3-Interaktion ist weitgehend ungeklärt. Für das SHIP/Dok-3-Modul konnten Robson et al. eine spezifische Inhibition des BCR-induzierten JNK-Signalweges (*c-Jun N-terminal kinase*) aufzeigen (ROBSON et al., 2004). Basis dieser Funktion bildet das Tyrosinmotiv Y<sup>343</sup>ENV des murinen Proteins, das dem C-terminalen Tyrosinmotiv Y<sup>331</sup>ENI des Hühnerhomologs entspricht und ein Grb2-Bindungsmotiv der Konsensussequenz pYxN darstellt. Ein Ca<sup>2+</sup>-regulatorischer Effekt von Dok-3 wurde bei heterologer Überexpression in A20 B-Zellen nicht beobachtet (ROBSON et al., 2004). Die in meiner Arbeit erfolgte Rekonstitution von *dok-3*<sup>-/-</sup> DT40 B-Zellen belegt hingegen eindeutig die Inhibition der BCR-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung durch Dok-3. Diese Funktion wird allein durch das Grb2-bindende Phosphotyrosinmotiv Y<sup>331</sup>ENI vermittelt. Sowohl die Inaktivierung der übrigen Tyrosinmotive Y<sup>140</sup>SSW und Y<sup>307</sup>ASI als auch der PTB-Domäne R<sup>197</sup> sind ohne Bedeutung für diese Dok-3-Funktion. Zudem wird die stimulationsabhängige SHIP-Interaktion über die Dok-3-PTB-Domäne und das Tyrosinmotiv Y<sup>331</sup>ENI bestätigt, aber als von der Ca<sup>2+</sup>-Fluxregulation unabhängiger Prozess identifiziert. Obwohl SHIP nicht mehr gebunden werden kann, vermittelt Dok-3 mit inaktivierter PTB-Domäne (R<sup>197</sup>A) eine Inhibition der Ca<sup>2+</sup>-Antwort. Darüber hinaus wird ebenso in *ship*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen ein Ca<sup>2+</sup>-regulierender Effekt dominant negativer Dok-3-Proteine beobachtet, was eine von SHIP unabhängige Funktionsweise von Dok-3 im Kontext der BCR-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung bestärkt (K. Neumann, laufende Dissertation).

Die Dok-3-PH-Domäne ist essentiell für die BCR-induzierte Tyrosinphosphorylierung und Ca<sup>2+</sup>-regulatorische Kompetenz von Dok-3. Dies impliziert eine Funktionsweise von Dok-3, die von der Interaktion der PH-Domäne mit Phospholipiden der Plasmamembran abhängig ist. Die Daten der *in vivo*-Lokalisationsanalyse bestätigen, dass Dok-3 ein konstitutiv plasmamembranassoziiertes Adapterprotein auf der Basis der PH-Domänen-

funktion ist. Die Plasmamembranlokalisation bildet die funktionelle Grundlage von Dok-3 als Negativregulator der BCR-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung durch die stimulationsinduzierte Rekrutierung von Grb2. Bestärkt wird dieses Modell einer  $\text{Ca}^{2+}$ -regulatorischen Dok-3/Grb2-Funktionseinheit zudem durch die Identifikation von Dok-3 als zentraler Plasmamembran-Bindungspartner von Grb2 *in vivo*. Die hier dokumentierte Plasmamembranrekrutierung von Grb2 durch Dok-3 steht im Einklang mit der Grb2-vermittelten Inhibition der BCR-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung in Abhängigkeit der zentralen SH2-Domäne und der C-terminalen SH3-Domäne (STORK et al., 2004). Bei einer funktionellen Verknüpfung der Adapterproteine in einem gemeinsamen Dok-3/Grb2-Signalmodul sollte die  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluxregulation durch Dok-3 allein auf der BCR-induzierten Rekrutierung von Grb2 und der C-terminalen Grb2-SH3-Domäne als Effektormotiv basieren. Ein derartiges Zusammenspiel der Membranankerfunktion von Dok-3 und der Effektorfunktion der Grb2-SH3-Domäne simuliert das chimäre Protein Dok-3  $\Delta\text{Y}^{331}\text{ENI/Grb2-SH3}$ , in dem nur die C-terminale Grb2-SH3-Domäne in Abwesenheit des Grb2-Bindungsmotivs an Dok-3 fusioniert ist. Die Inhibition des BCR-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals sowohl in *dok-3<sup>-/-</sup>* als auch *grb2<sup>-/-</sup>* DT40 B-Zellen durch das Fusionsprotein bestätigt eindeutig die Funktionsweise des Dok-3/Grb2-Signalmoduls. Allein die durch das Dok-3-Motiv  $\text{Y}^{331}\text{ENI}$  vermittelte, stimulationsabhängige Plasmamembranlokalisation der C-terminalen Grb2-SH3-Domäne bildet unabhängig von weiteren Dok-3-Interaktionsmotiven die Grundlage der  $\text{Ca}^{2+}$ -regulatorischen Funktion des Signalmoduls (vergl. Abb. 7.2).

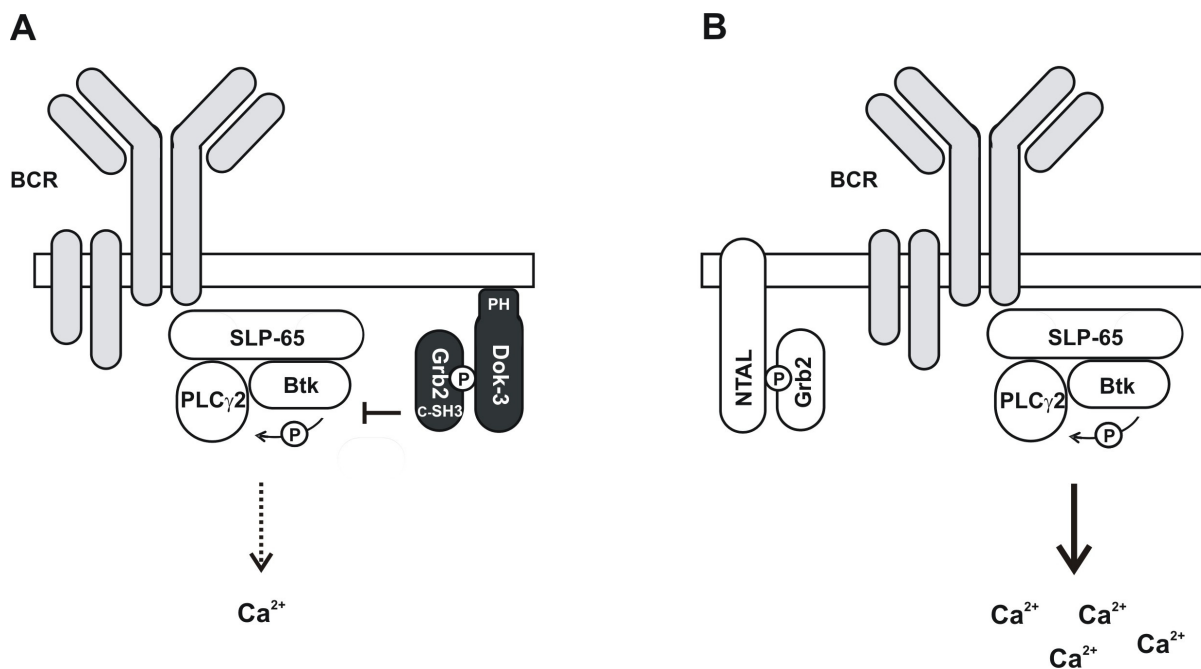
Die zentrale Bedeutung der Dok-3-vermittelten Plasmamembranlokalisation für die Effektorfunktion von Grb2 verdeutlicht die gegenläufige Regulation der Grb2-Funktion durch die Bindung an den Transmembranadapter NTAL. Stork et al. 2004 beschreiben das in reifen B-Zellen exprimierte NTAL als einen Positivregulator der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung, dessen Funktion auf der kompetitiven Plasmamembranrekrutierung von Grb2 und der einhergehenden Aufhebung des  $\text{Ca}^{2+}$ -inhibitorischen Grb2-Effekts basiert. So ist die Expression von NTAL in DT40 B-Zellen mit einer verstärkten BCR-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung vergleichbar dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Phänotyp *grb2<sup>-/-</sup>* DT40 Zellen verbunden (STORK et al., 2004). Offensichtlich wird die  $\text{Ca}^{2+}$ -regulatorische Funktion von Grb2 nicht pauschal durch die Plasmamembranlokalisation des Adapters definiert. Entweder vermitteln Dok-3 und

NTAL eine unterschiedliche Mikrolokalisierung von Grb2 an der Plasmamembran, oder allein Dok-3-spezifische Eigenschaften erlauben der C-terminalen Grb2-SH3-Domäne mit einem  $\text{Ca}^{2+}$ -regulatorischen Effektorprotein an der Plasmamembran in Wechselwirkung zu treten. Falls die Grb2-Funktion durch die differentielle Mikrolokalisierung an der Plasmamembran in Abhängigkeit von Dok-3 und NTAL bestimmt wird, sollte die Substitution der Dok-3-PH-Domäne gegen die Transmembrandomäne von NTAL als lokalisationsgebendes Element den  $\text{Ca}^{2+}$ -inhibitorischen Effekt des Dok-3/Grb2-Moduls unterbinden. Die Funktionsanalyse des chimären NTAL/Dok-3-Proteins zeigt hingegen, dass die Negativregulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung durch Grb2 nicht auf einer distinkten Dok-3- oder NTAL-definierten Mikrolokalisierung des Adapters an der Plasmamembran basiert. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -regulatorische Funktion von Dok-3 bleibt ebenso bei einer Plasmamembranlokalisierung chimärer Dok-3-Proteine durch die PLC $\delta$ 1-PH-Domäne wie auch durch die Lyn-Acylierungssequenz erhalten. In Ergänzung der Plasmamembranlokalisierung sind somit bislang nicht charakterisierte Dok-3-Eigenschaften entscheidend für die Funktionalität des Dok-3/Grb2-Signalmoduls.

Auf welche Art die C-terminale Grb2-SH3-Domäne die Inhibition der BCR-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung vermittelt, ist nur unvollständig verstanden. Daten von K. Neumann zeigen, dass die gesteigerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung in *grb2*<sup>-/-</sup> und *dok-3*<sup>-/-</sup> DT40 B-Zellen auf die vermehrte IP3-Produktion durch PLC $\gamma$ 2 zurückzuführen ist (K. Neumann, laufende Dissertation). Demnach erfolgt die Negativregulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort über die Modulation der PLC $\gamma$ 2-Aktivität. Ein potentiell durch die Grb2-SH3-Domäne an der Plasmamembran reguliertes Effektorprotein von zentraler Bedeutung für die PLC $\gamma$ 2-Aktivierung stellt Btk dar. Die TH-Domäne (*tec homology domain*) von Btk weist zwei prolinreiche Bindungsmotive für SH3-Domänen auf, die als Regulatoren der Kinaseaktivität diskutiert werden (VIHINEN et al., 1996; YAMADORI et al., 1999; HANSSON et al., 2001a; HANSSON et al., 2001b; OKOH and VIHINEN, 2002). Die Btk-vermittelte Phosphorylierung von PLC $\gamma$ 2 im Kontext des  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes ist essentiell für die vollständige Aktivierung der Lipase (HUMPHRIES et al., 2004; KIM et al., 2004). In der Tat ist in *dok-3*<sup>-/-</sup> DT40-Zellen die strikt Btk-abhängige Phosphorylierung des PLC $\gamma$ 2-Tyrosinmotivs Y<sup>759</sup> verstärkt (K. Neumann, laufende Dissertation). Gestützt durch diese funktionellen Hinweise

bildet die SH3-Domänen-vermittelte Inhibition der Btk-Aktivität ein attraktives Modell der  $\text{Ca}^{2+}$ -regulatorischen Funktion des Dok-3/Grb2-Moduls. Eine direkte Interaktion zwischen Btk und Grb2 konnte mit biochemischen Verfahren bislang nicht identifiziert werden. In Annahme einer gleichwertigen Colokalisation sowohl von NTAL- als auch Dok-3-rekrutiertem Grb2 mit Btk an der Plasmamembran erscheint eine klassische direkte SH3-Interaktion zwischen Grb2 und Btk jedoch ohnehin als unwahrscheinlich. In diesem Fall sollte die Grb2-SH3-Domäne unabhängig von der Art der Grb2-Membranrekrutierung in der Lage sein, die Aktivität der räumlich benachbarten Btk zu modulieren. Die spezifische Dok-3-Abhängigkeit der potentiellen Btk-Regulation durch Grb2 impliziert die Einbeziehung einer weiteren Proteinkomponente oder einer intrinsischen Dok-3-Funktion in diesen Vorgang. Konkrete Hinweise auf eine Interaktion des Dok-3/Grb2-Moduls mit einem zusätzlichen Effektormolekül stehen bislang aus, eine mögliche Funktion von Serin/Threonin-basierten Dok-3-Signalmotiven in diesem Kontext bleibt zu klären. Erste Analysen eines potentiellen WD40-Domänen-Bindungsmotivs pS<sup>257</sup> in Dok-3 sprechen jedoch gegen einen phosphoserinabhängigen Mechanismus im Kontext der  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluxregulation (T. Gorges, laufende Diplomarbeit). Eine Konformationsänderung von Grb2 durch die Bindung an Dok-3 als Voraussetzung für die Interaktion der C-terminalen SH3-Domäne mit Btk ist nicht wahrscheinlich, da allein die Fusion der SH3-Domäne an Dok-3 unabhängig der SH2/Phosphotyrosin-Bindung ein funktionelles Dok-3/Grb2-Signalmodul rekonstituiert. Möglicherweise basiert eine konformationsabhängige Regulation von Btk durch das Dok-3/Grb2-Signalmodul weniger auf einer stabilen SH3-Bindung als auf einem zweizähligen Interaktionsmechanismus von C-terminaler Grb2-SH3-Domäne und der Dok-3-Proteinstruktur selbst.





**Abbildung 7.2: Dok-3 und Grb2 bilden ein inhibitorisches Signalmodul der BCR-induzierten  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung**

In Abhängigkeit der BCR-induzierten Rekrutierung an plasmamembranlokalisierendes Dok-3 vermittelt die C-terminale Grb2-SH3-Domäne eine Negativregulation der  $Ca^{2+}$ -Antwort in B-Lymphocyten (vorliegende Studie) (A). Die kompetitive Membranrekrutierung von Grb2 durch das entwicklungsabhängig exprimierte Adapterprotein NTAL ist mit der Aufhebung des  $Ca^{2+}$ -inhibitorischen Grb2-Effekts verbunden (STORK et al., 2004) (B). Positivregulatorische Elemente der  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung sind in weiß dargestellt, negativregulatorische Elemente in schwarz. Der BCR ist grau dargestellt.

Unabhängig der ausstehenden Aufklärung der detaillierten Funktionsweise des Dok-3/Grb2-Signalmoduls belegt eine kürzlich veröffentlichte Studie von *dok-3*<sup>-/-</sup> Mäusen die physiologische Relevanz der Negativregulation BCR-induzierter Signale durch Dok-3 (NG et al., 2007). Zwar zeigen die Dok-3-defizienten Mäuse eine normale B-Zell-Entwicklung und -Population, jedoch wird eine verstärkte B-Zellreaktion auf T-Zell-unabhängige Antigene beobachtet, die mit einem erhöhten IgM-Titer im Serum verbunden ist. *In vitro*-Analysen der primären *dok-3*<sup>-/-</sup> B-Zellen bestätigen eine Hyperproliferation der Zellen nach BCR-Quervernetzung. In Übereinstimmung mit der in der eigenen Arbeit dokumentierten Inhibition der BCR-induzierten  $Ca^{2+}$ -Antwort durch Dok-3 zeigen die isolierten Milz-B-Zellen *dok-3*<sup>-/-</sup> Mäuse ein verstärktes  $Ca^{2+}$ -Signal nach BCR-Stimulation (NG et al., 2007). In Ergänzung der eigenen Daten beobachten Ng et al. eine beeinträchtigte SHIP-

Aktivierung bei gleichzeitig unveränderter Plasmamembranlokalisation der Phosphatase in *dok-3<sup>-/-</sup>* B-Zellen (Ng et al., 2007). Arbeiten von Robson et al. beschreiben das Dok-3/SHIP-Modul als Negativregulator des JNK-Signalweges (ROBSON et al., 2004). Konsistent mit dieser Beobachtung zeigen die B-Zellen der *dok-3<sup>-/-</sup>* Mäuse eine verstärkte Aktivierung der JNK-Signalkaskade sowie eine ebenfalls verstärkte Aktivierung der p38-MAP-Kinase (Ng et al., 2007). Inwiefern diese Dok-3-Funktionen an die Regulation der SHIP-Aktivität, der BCR-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort oder an weitere Dok-3-Signalwege gekoppelt sind, bleibt aufzuklären.

Basierend auf der heterologen Expression von Dok-3 in 293T Zellen schlagen Cong et al. zudem eine Inhibition des Ras/Erk-Signalweges (*extracellular signal-regulated kinase*) durch Dok-3 vor (CONG et al., 1999). Ebenfalls unter Verwendung von 293T Zellen führen Honma et al. die beobachtete Inhibition des Ras/Erk-Signalweges auf die kompetitive Rekrutierung von Grb2 durch Dok-3 gegenüber der Einbindung von Grb2 in die Ras/Erk-Aktivierung durch den Ras-GEF (*Ras guanine nucleotide exchange factor*) SOS (*son of sevenless*) zurück (HONMA et al., 2006). Ob dieser Mechanismus auf die BCR-induzierte Aktivierung der Ras/Erk-Signalkaskade zutrifft, ist trotz der selbst dokumentierten Dok-3/Grb2-Interaktion fraglich. Nach Daten von Oh-hora et al. erfolgt die BCR-induzierte Aktivierung des Ras/Erk-Signalweges im Gegensatz zur EGFR-induzierten (*epidermal growth factor receptor*) Ras-Aktivierung in B-Lymphocyten über RasGRP3 (*Ras guanine nucleotide releasing protein 3*) und nicht über SOS (OH-HORA et al., 2003). Darüber hinaus wird in den B-Zellen *dok-3<sup>-/-</sup>* Mäuse im Unterschied zur Aktivierung von JNK und p38 keine verstärkte Aktivierung der MAP-Kinase Erk in Abwesenheit von Dok-3 beobachtet (Ng et al., 2007). In Kombination identifizieren sowohl die eigenen Studien als auch die Arbeiten von Ng et al. Dok-3 als einen wichtigen Negativregulator der BCR-Signalleitung. Die hyperproliferative Reaktion der B-Zellen *dok-3<sup>-/-</sup>* Mäuse auf T-Zell-unabhängige Antigene könnte einen Hinweis auf eine Dok-3-Funktion bei der Etablierung der immunologischen Toleranz von B-Zellen darstellen.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig der direkte Zusammenhang von räumlicher Reorganisation von Proteinkomplexen und B-Zellfunktionen *in vivo* dokumentiert werden. Die Analyse der Bildung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Initiationskomplexes durch SLP-65 und der Negativregulation der BCR-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung durch das Zusammenspiel von Grb2 und Dok-3 verdeutlicht, dass Adapterproteine über ihre Funktion als Organisationsplattformen hinaus eine zentrale Bedeutung als molekulare Schalter der Signalleitung besitzen. Sie ermöglichen eine differentielle Modulation von Signalprozessen, indem sie die Zusammensetzung von Proteinmodulen vorgeben und ihre Verschaltung in Signalleitungsnetzwerken kontrollieren.

Die gezeigten Daten stellen einen Ausgangspunkt für weiterführende Analysen dynamischer Vorgänge von BCR-Signalmodulen dar. Insbesondere durch den Einsatz von verschiedenen *in vivo-imaging*-Techniken können wertvolle Erkenntnisse für ein besseres Verständnis der komplexen Signalleitungsabläufe in B-Lymphocyten gewonnen werden.

## 8. Literatur

- Aman, M. J., and Ravichandran, K. S. (2000). A requirement for lipid rafts in B cell receptor induced Ca(2+) flux. *Curr Biol* **10**, 393-396.
- Baba, T. W., Giroir, B. P., and Humphries, E. H. (1985). Cell lines derived from avian lymphomas exhibit two distinct phenotypes. *Virology* **144**, 139-151.
- Baba, T. W., and Humphries, E. H. (1984). Differential response to avian leukosis virus infection exhibited by two chicken lines. *Virology* **135**, 181-188.
- Baba, Y., Hashimoto, S., Matsushita, M., Watanabe, D., Kishimoto, T., Kurosaki, T., and Tsukada, S. (2001). BLNK mediates Syk-dependent Btk activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2582-2586.
- Baeuerle, P. A., and Henkel, T. (1994). Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* **12**, 141-179.
- Blaikie, P., Immanuel, D., Wu, J., Li, N., Yajnik, V., and Margolis, B. (1994). A region in Shc distinct from the SH2 domain can bind tyrosine-phosphorylated growth factor receptors. *J Biol Chem* **269**, 32031-32034.
- Bobe, R., Wilde, J. I., Maschberger, P., Venkateswarlu, K., Cullen, P. J., Siess, W., and Watson, S. P. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent translocation of phospholipase Cgamma2 in mouse megakaryocytes is independent of Bruton tyrosine kinase translocation. *Blood* **97**, 678-684.
- Bolland, S., Pearse, R. N., Kurosaki, T., and Ravetch, J. V. (1998). SHIP modulates immune receptor responses by regulating membrane association of Btk. *Immunity* **8**, 509-516.
- Boomer, J. S., and Tan, T. H. (2005). Functional interactions of HPK1 with adaptor proteins. *J Cell Biochem* **95**, 34-44.
- Brdicka, T., Imrich, M., Angelisova, P., Brdickova, N., Horvath, O., Spicka, J., Hilgert, I., Luskova, P., Draber, P., Novak, P., *et al.* (2002). Non-T cell activation linker (NTAL): A transmembrane adaptor protein involved in immunoreceptor signaling. *Journal of Experimental Medicine* **196**, 1617-1626.
- Brown, D. A., and Rose, J. K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**, 533-544.
- Cambier, J. C. (1995). Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). *J Immunol* **155**, 3281-3285.

- Campbell, K. S., and Cambier, J. C. (1990). B lymphocyte antigen receptors (mIg) are non-covalently associated with a disulfide linked, inducibly phosphorylated glycoprotein complex. *Embo J* **9**, 441-448.
- Cao, M. Y., Davidson, D., Yu, J., Latour, S., and Veillette, A. (1999). Clnk, a novel SLP-76-related adaptor molecule expressed in cytokine-stimulated hemopoietic cells. *J Exp Med* **190**, 1527-1534.
- Carsetti, R., Kohler, G., and Lamers, M. C. (1995). Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. *J Exp Med* **181**, 2129-2140.
- Cesareni, G., Panni, S., Nardelli, G., and Castagnoli, L. (2002). Can we infer peptide recognition specificity mediated by SH3 domains? *FEBS Lett* **513**, 38-44.
- Cheng, P. C., Brown, B. K., Song, W., and Pierce, S. K. (2001a). Translocation of the B cell antigen receptor into lipid rafts reveals a novel step in signaling. *J Immunol* **166**, 3693-3701.
- Cheng, P. C., Cherukuri, A., Dykstra, M., Malapati, S., Sproul, T., Chen, M. R., and Pierce, S. K. (2001b). Floating the raft hypothesis: the roles of lipid rafts in B cell antigen receptor function. *Semin Immunol* **13**, 107-114.
- Cheng, P. C., Dykstra, M. L., Mitchell, R. N., and Pierce, S. K. (1999). A role for lipid rafts in B cell antigen receptor signaling and antigen targeting. *J Exp Med* **190**, 1549-1560.
- Chiu, C. W., Dalton, M., Ishiai, M., Kurosaki, T., and Chan, A. C. (2002). BLNK: molecular scaffolding through 'cis'-mediated organization of signaling proteins. *EMBO J* **21**, 6461-6472.
- Clark, E. A., and Ledbetter, J. A. (1994). How B and T cells talk to each other. *Nature* **367**, 425-428.
- Clark, S. G., Stern, M. J., and Horvitz, H. R. (1992). C. elegans cell-signalling gene sem-5 encodes a protein with SH2 and SH3 domains. *Nature* **356**, 340-344.
- Cong, F., Yuan, B., and Goff, S. P. (1999). Characterization of a novel member of the DOK family that binds and modulates Abl signaling. *Mol Cell Biol* **19**, 8314-8325.
- Corcoran, A. E. (2005). Immunoglobulin locus silencing and allelic exclusion. *Semin Immunol* **17**, 141-154.
- Cornall, R. J., Goodnow, C. C., and Cyster, J. G. (1995). The regulation of self-reactive B cells. *Curr Opin Immunol* **7**, 804-811.
- Crabtree, G. R., and Clipstone, N. A. (1994). Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu Rev Biochem* **63**, 1045-1083.

- Crabtree, G. R., and Olson, E. N. (2002). NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* **109 Suppl**, S67-79.
- Dal Porto, J. M., Gauld, S. B., Merrell, K. T., Mills, D., Pugh-Bernard, A. E., and Cambier, J. (2004). B cell antigen receptor signaling 101. *Mol Immunol* **41**, 599-613.
- Di Paolo, G., and De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **443**, 651-657.
- Dillon, S. R., Mancini, M., Rosen, A., and Schlissel, M. S. (2000). Annexin V binds to viable B cells and colocalizes with a marker of lipid rafts upon B cell receptor activation. *J Immunol* **164**, 1322-1332.
- DiNitto, J. P., and Lambright, D. G. (2006). Membrane and juxtamembrane targeting by PH and PTB domains. *Biochim Biophys Acta* **1761**, 850-867.
- Dolmetsch, R. E., Lewis, R. S., Goodnow, C. C., and Healy, J. I. (1997). Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration. *Nature* **386**, 855-858.
- Douglass, A. D., and Vale, R. D. (2005). Single-molecule microscopy reveals plasma membrane microdomains created by protein-protein networks that exclude or trap signaling molecules in T cells. *Cell* **121**, 937-950.
- Drake, J. R., Webster, P., Cambier, J. C., and Mellman, I. (1997). Delivery of B cell receptor-internalized antigen to endosomes and class II vesicles. *J Exp Med* **186**, 1299-1306.
- Engelke, M., Engels, N., Dittmann, K., Stork, B., and Wienands, J. (2007). Ca<sup>2+</sup> signaling in antigen receptor-activated B lymphocytes. *Immunol Rev* **218**, 235-246.
- Engels, N., Wollscheid, B., and Wienands, J. (2001). Association of SLP-65/BLNK with the B cell antigen receptor through a non-ITAM tyrosine of Ig-alpha. *Eur J Immunol* **31**, 2126-2134.
- Falasca, M., Logan, S. K., Lehto, V. P., Baccante, G., Lemmon, M. A., and Schlessinger, J. (1998). Activation of phospholipase C gamma by PI 3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting. *Embo J* **17**, 414-422.
- Flaswinkel, H., and Reth, M. (1994). Dual role of the tyrosine activation motif of the Ig-alpha protein during signal transduction via the B cell antigen receptor. *Embo J* **13**, 83-89.
- Flemming, A., Brummer, T., Reth, M., and Jumaa, H. (2003). The adaptor protein SLP-65 acts as a tumor suppressor that limits pre-B cell expansion. *Nat Immunol* **4**, 38-43.

- Fluckiger, A. C., Li, Z., Kato, R. M., Wahl, M. I., Ochs, H. D., Longnecker, R., Kinet, J. P., Witte, O. N., Scharenberg, A. M., and Rawlings, D. J. (1998). Btk/Tec kinases regulate sustained increases in intracellular Ca<sup>2+</sup> following B-cell receptor activation. *Embo J* **17**, 1973-1985.
- Fruman, D. A., Satterthwaite, A. B., and Witte, O. N. (2000). Xid-like phenotypes: a B cell signalosome takes shape. *Immunity* **13**, 1-3.
- Fu, C., Turck, C. W., Kurosaki, T., and Chan, A. C. (1998). BLNK: A central linker protein in B cell activation. *Immunity* **9**, 93-103.
- Fuentes-Panana, E. M., Bannish, G., and Monroe, J. G. (2004). Basal B-cell receptor signaling in B lymphocytes: mechanisms of regulation and role in positive selection, differentiation, and peripheral survival. *Immunol Rev* **197**, 26-40.
- Fusaki, N., Tomita, S., Wu, Y., Okamoto, N., Goitsuka, R., Kitamura, D., and Hozumi, N. (2000). BLNK is associated with the CD72/SHP-1/Grb2 complex in the WEHI231 cell line after membrane IgM cross-linking. *Eur J Immunol* **30**, 1326-1330.
- Futterer, K., Wong, J., Grucza, R. A., Chan, A. C., and 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**, 523-537.
- Gangi-Peterson, L., Peterson, S. N., Shapiro, L. H., Golding, A., Caricchio, R., Cohen, D. I., Margulies, D. H., and Cohen, P. L. (1998). bca: an activation-related B-cell gene. *Mol Immunol* **35**, 55-63.
- Gauld, S. B., Merrell, K. T., and Cambier, J. C. (2006). Silencing of autoreactive B cells by anergy: a fresh perspective. *Curr Opin Immunol* **18**, 292-297.
- Goitsuka, R., Fujimura, Y.-I., Mamada, H., Umeda, A., Morimura, T., Uetsuka, K., Doi, K., Tsuji, S., and Kitamura, D. (1998). BASH, a novel signaling molecule preferentially expressed in B cells of the Bursa of Fabricius. *J Immunol* **161**, 5804-5808.
- Gold, M. R. (2002). To make antibodies or not: signaling by the B-cell antigen receptor. *Trends Pharmacol Sci* **23**, 316-324.
- Grabbe, A., and Wienands, J. (2006). Human SLP-65 isoforms contribute differently to activation and apoptosis of B lymphocytes. *Blood* **108**, 3761-3768.
- Griesbeck, O., Baird, G. S., Campbell, R. E., Zacharias, D. A., and Tsien, R. Y. (2001). Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications. *J Biol Chem* **276**, 29188-29194.

- Guo, B., Kato, R. M., Garcia-Lloret, M., Wahl, M. I., and Rawlings, D. J. (2000). Engagement of the human pre-B cell receptor generates a lipid raft-dependent calcium signaling complex. *Immunity* **13**, 243-253.
- Haj, F. G., Verveer, P. J., Squire, A., Neel, B. G., and Bastiaens, P. I. (2002). Imaging sites of receptor dephosphorylation by PTP1B on the surface of the endoplasmic reticulum. *Science* **295**, 1708-1711.
- Hansson, H., Okoh, M. P., Smith, C. I., Vihinen, M., and Hard, T. (2001a). Intermolecular interactions between the SH3 domain and the proline-rich TH region of Bruton's tyrosine kinase. *FEBS Lett* **489**, 67-70.
- Hansson, H., Smith, C. I., and Hard, T. (2001b). Both proline-rich sequences in the TH region of Bruton's tyrosine kinase stabilize intermolecular interactions with the SH3 domain. *FEBS Lett* **508**, 11-15.
- Harden, T. K., and Sondek, J. (2006). Regulation of phospholipase C isozymes by ras superfamily GTPases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **46**, 355-379.
- Harlan, J. E., Hajduk, P. J., Yoon, H. S., and Fesik, S. W. (1994). Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* **371**, 168-170.
- Hashimoto, A., Okada, H., Jiang, A., Kurosaki, M., Greenberg, S., Clark, E. A., and Kurosaki, T. (1998). Involvement of guanosine triphosphatases and phospholipase C-gamma 2 in extracellular signal-regulated kinase, c-Jun NH2-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase activation by the B cell antigen receptor. *Journal of Experimental Medicine* **188**, 1287-1295.
- Hashimoto, A., Takeda, K., Inaba, M., Sekimata, M., Kaisho, T., Ikehara, S., Homma, Y., Akira, S., and Kurosaki, T. (2000). Cutting edge: essential role of phospholipase C-gamma 2 in B cell development and function. *J Immunol* **165**, 1738-1742.
- Hashimoto, S., Iwamatsu, A., Ishiai, M., Okawa, K., Yamadori, T., Matsushita, M., Baba, Y., Kishimoto, T., Kurosaki, T., and 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**, 2357-2364.
- Hayashi, K., Nittono, R., Okamoto, N., Tsuji, S., Hara, Y., Goitsuka, R., and Kitamura, D. (2000). The B cell-restricted adaptor BASH is required for normal development and antigen receptor-mediated activation of B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2755-2760.
- Hempel, W. M., Schatzman, R. C., and DeFranco, A. L. (1992). Tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 2 upon cross-linking of membrane Ig on murine B lymphocytes. *J Immunol* **148**, 3021-3027.



- Hikida, M., and Kurosaki, T. (2005). Regulation of Phospholipase C-gamma2 Networks in B Lymphocytes. *Adv Immunol* **88**, 73-96.
- Hombach, J., Tsubata, T., Leclercq, L., Stappert, H., and Reth, M. (1990). Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class. *Nature* **343**, 760-762.
- Honma, M., Higuchi, O., Shirakata, M., Yasuda, T., Shibuya, H., Iemura, S., Natsume, T., and Yamanashi, Y. (2006). Dok-3 sequesters Grb2 and inhibits the Ras-Erk pathway downstream of protein-tyrosine kinases. *Genes Cells* **11**, 143-151.
- Hope, H. R., and Pike, L. J. (1996). Phosphoinositides and phosphoinositide-utilizing enzymes in detergent-insoluble lipid domains. *Mol Biol Cell* **7**, 843-851.
- Horejsi, V. (2003). The roles of membrane microdomains (rafts) in T cell activation. *Immunol Rev* **191**, 148-164.
- Howell, B. W., Lanier, L. M., Frank, R., Gertler, F. B., and Cooper, J. A. (1999). The disabled 1 phosphotyrosine-binding domain binds to the internalization signals of transmembrane glycoproteins and to phospholipids. *Mol Cell Biol* **19**, 5179-5188.
- Humphries, L. A., Dangelmaier, C., Sommer, K., Kipp, K., Kato, R. M., Griffith, N., Bakman, I., Turk, C. W., Daniel, J. L., and Rawlings, D. J. (2004). Tec kinases mediate sustained calcium influx via site-specific tyrosine phosphorylation of the phospholipase Cgamma Src homology 2-Src homology 3 linker. *J Biol Chem* **279**, 37651-37661.
- Irvin, B. J., Williams, B. L., Nilson, A. E., Maynor, H. O., and Abraham, R. T. (2000). Pleiotropic contributions of phospholipase C-gamma1 (PLC-gamma1) to T-cell antigen receptor-mediated signaling: reconstitution studies of a PLC-gamma1-deficient Jurkat T-cell line. *Mol Cell Biol* **20**, 9149-9161.
- Ishiai, M., Kurosaki, M., Pappu, R., Okawa, K., Ronko, I., Fu, C., Shibata, M., Iwamatsu, A., Chan, A. C., and Kurosaki, T. (1999b). BLNK required for coupling Syk to PLC $\gamma$ 2 and Rac1-JNK in B cells. *Immunity* **10**, 1-20.
- Ishiai, M., Sugawara, H., Kurosaki, M., and Kurosaki, T. (1999a). Association of phospholipase C- $\gamma$ 2 Src homology 2 domain with BLNK is critical for B cell antigen receptor signaling. *J Immunol* **163**, 1746-1749.
- Jackman, J. K., Motto, D. G., Sun, Q., Tanemoto, M., Turck, C. W., Peltz, G. A., Koretzky, G. A., and Findell, P. R. (1995). Molecular cloning of SLP-76, a 76-kDa tyrosine phosphoprotein associated with Grb2 in T cells. *J Biol Chem* **270**, 7029-7032.

- Johmura, S., Oh-hora, M., Inabe, K., Nishikawa, Y., Hayashi, K., Vigorito, E., Kitamura, D., Turner, M., Shingu, K., Hikida, M., and Kurosaki, T. (2003). Regulation of Vav localization in membrane rafts by adaptor molecules Grb2 and BLNK. *Immunity* **18**, 777-787.
- Jordan, J. D., Landau, E. M., and Iyengar, R. (2000). Signaling networks: the origins of cellular multitasking. *Cell* **103**, 193-200.
- Jordan, M. S., Singer, A. L., and Koretzky, G. A. (2003). Adaptors as central mediators of signal transduction in immune cells. *Nature Immunol* **4**, 110-116.
- Jumaa, H., Bossaller, L., Portugal, K., Storch, B., Lotz, M., Flemming, A., Schrappe, M., Postila, V., Riikonen, P., Pelkonen, J., *et al.* (2003). Deficiency of the adaptor SLP-65 in pre-B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **423**, 452-456.
- Jumaa, H., Wollscheid, B., Mitterer, M., Wienands, J., Reth, M., and Nielsen, P. J. (1999). Abnormal development and function of B lymphocytes in mice deficient for the signaling adaptor protein SLP-65. *Immunity* **11**, 547-554.
- Kabak, S., Skaggs, B. J., Gold, M. R., Affolter, M., West, K. L., Foster, M. S., Siemasko, K., Chan, A. C., Aebersold, R., and Clark, M. R. (2002). The direct recruitment of BLNK to immunoglobulin alpha couples the B-cell antigen receptor to distal signaling pathways. *Mol Cell Biol* **22**, 2524-2535.
- Kagan, J. C., and Medzhitov, R. (2006). Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell* **125**, 943-955.
- Kang, S. W., Wahl, M. I., Chu, J., Kitaura, J., Kawakami, Y., Kato, R. M., Tabuchi, R., Tarakhovskiy, A., Kawakami, T., Turck, C. W., *et al.* (2001). PKCbeta modulates antigen receptor signaling via regulation of Btk membrane localization. *Embo J* **20**, 5692-5702.
- Kersseboom, R., Middendorp, S., Dingjan, G. M., Dahlenborg, K., Reth, M., Jumaa, H., and Hendriks, R. W. (2003). Bruton's tyrosine kinase cooperates with the B cell linker protein SLP-65 as a tumor suppressor in Pre-B cells. *J Exp Med* **198**, 91-98.
- Kessels, H. W., Ward, A. C., and Schumacher, T. N. (2002). Specificity and affinity motifs for Grb2 SH2-ligand interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8524-8529.
- Khan, W. N., Alt, F. W., Gerstein, R. M., Malynn, B. A., Larsson, I., Rathbun, G., Davidson, L., Muller, S., Kantor, A. B., Herzenberg, L. A., and *et al.* (1995). Defective B cell development and function in Btk-deficient mice. *Immunity* **3**, 283-299.
- Kim, Y. J., Sekiya, F., Poulin, B., Bae, Y. S., and Rhee, S. G. (2004). Mechanism of B-cell receptor-induced phosphorylation and activation of phospholipase C-gamma2. *Mol Cell Biol* **24**, 9986-9999.

- Kimura, T., Sakamoto, H., Appella, E., and 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**, 1471-1478.
- Kohler, F., Storch, B., Kulathu, Y., Herzog, S., Kuppig, S., Reth, M., and Jumaa, H. (2005). A leucine zipper in the N terminus confers membrane association to SLP-65. *Nat Immunol* **6**, 204-210.
- Koncz, G., Bodor, C., Kovesdi, D., Gati, R., and Sarmay, G. (2002). BCR mediated signal transduction in immature and mature B cells. *Immunology Letters* **82**, 41-49.
- Koretzky, G. A., Abtahian, F., and Silverman, M. A. (2006). SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. *Nat Rev Immunol* **6**, 67-78.
- Kovesdi, D., Koncz, G., Ivanyi-Nagy, R., Caspi, Y., Ishiai, M., Kurosaki, T., Gergely, J., Haimovich, J., and Sarmay, G. (2002). Developmental differences in B cell receptor-induced signal transduction. *Cell Signal* **14**, 563-572.
- Kurosaki, T. (2002). Regulation of B-cell signal transduction by adaptor proteins. *Nat Rev Immunol* **2**, 354-363.
- Kurosaki, T., Johnson, S. A., Pao, L., Sada, K., Yamamura, H., and Cambier, J. C. (1995). Role of the Syk autophosphorylation site and SH2 domains in B cell antigen receptor signaling. *J Exp Med* **182**, 1815-1823.
- Kurosaki, T., Takata, M., Yamanashi, Y., Inazu, T., Taniguchi, T., Yamamoto, T., and Yamamura, H. (1994). Syk activation by the Src-family tyrosine kinase in the B cell receptor signaling. *J Exp Med* **179**, 1725-1729.
- Kurosaki, T., and Tsukada, S. (2000). BLNK: Connecting Syk and Btk to calcium signals. *Immunity* **12**, 1-5.
- Lam, K. P., Kuhn, R., and Rajewsky, K. (1997). In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* **90**, 1073-1083.
- Landschulz, W. H., Johnson, P. F., and McKnight, S. L. (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**, 1759-1764.
- Langlet, C., Bernard, A. M., Drevot, P., and He, H. T. (2000). Membrane rafts and signaling by the multichain immune recognition receptors. *Curr Opin Immunol* **12**, 250-255.
- Lemay, S., Davidson, D., Latour, S., and Veillette, A. (2000). Dok-3, a novel adapter molecule involved in the negative regulation of immunoreceptor signaling. *Mol Cell Biol* **20**, 2743-2754.

- Lemmon, M. A., and Ferguson, K. M. (1998). Pleckstrin homology domains. *Curr Top Microbiol Immunol* **228**, 39-74.
- Lemmon, M. A., and Ferguson, K. M. (2000). Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem J* **350 Pt 1**, 1-18.
- Lemmon, M. A., Ferguson, K. M., O'Brien, R., Sigler, P. B., and Schlessinger, J. (1995). Specific and high-affinity binding of inositol phosphates to an isolated pleckstrin homology domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10472-10476.
- Leo, A., Wienands, J., Baier, G., Horejsi, V., and Schraven, B. (2002). Adapters in lymphocyte signaling. *Journal of Clinical Investigation* **109**, 301-309.
- Lichtenberg, D., Goni, F. M., and Heerklotz, H. (2005). Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. *Trends Biochem Sci* **30**, 430-436.
- Liou, J., Kiefer, F., Dang, A., Hashimoto, A., Cobb, M. H., Kurosaki, T., and Weiss, A. (2000). HPK1 is activated by lymphocyte antigen receptors and negatively regulates AP-1. *Immunity* **12**, 399-408.
- Liou, J., Kim, M. L., Heo, W. D., Jones, J. T., Myers, J. W., Ferrell, J. E., Jr., and Meyer, T. (2005). STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx. *Curr Biol* **15**, 1235-1241.
- Liu, B. A., Jablonowski, K., Raina, M., Arce, M., Pawson, T., and Nash, P. D. (2006). The human and mouse complement of SH2 domain proteins-establishing the boundaries of phosphotyrosine signaling. *Mol Cell* **22**, 851-868.
- Loffert, D., Ehlich, A., Muller, W., and Rajewsky, K. (1996). Surrogate light chain expression is required to establish immunoglobulin heavy chain allelic exclusion during early B cell development. *Immunity* **4**, 133-144.
- Lowenstein, E. J., Daly, R. J., Batzer, A. G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E. Y., Bar-Sagi, D., and Schlessinger, J. (1992). The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* **70**, 431-442.
- Malissen, M., Trucy, J., Jouvin-Marche, E., Cazenave, P. A., Scollay, R., and Malissen, B. (1992). Regulation of TCR alpha and beta gene allelic exclusion during T-cell development. *Immunol Today* **13**, 315-322.
- Marshall, A. J., Niiron, H., Yun, T. J., and Clark, E. A. (2000). Regulation of B-cell activation and differentiation by the phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase Cgamma pathway. *Immunol Rev* **176**, 30-46.
- Mayer, B. J. (2001). SH3 domains: complexity in moderation. *J Cell Sci* **114**, 1253-1263.

- Mayer, B. J., Ren, R., Clark, K. L., and Baltimore, D. (1993). A putative modular domain present in diverse signaling proteins. *Cell* **73**, 629-630.
- McLaughlin, S., Wang, J., Gambhir, A., and Murray, D. (2002). PIP(2) and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **31**, 151-175.
- Melamed, D., Benschop, R. J., Cambier, J. C., and Nemazee, D. (1998). Developmental regulation of B lymphocyte immune tolerance compartmentalizes clonal selection from receptor selection. *Cell* **92**, 173-182.
- Melchers, F. (1995). B cell differentiation in bone marrow. *Clin Immunol Immunopathol* **76**, S188-191.
- Melchers, F., Haasner, D., Grawunder, U., Kalberer, C., Karasuyama, H., Winkler, T., and Rolink, A. G. (1994). Roles of IgH and L chains and of surrogate H and L chains in the development of cells of the B lymphocyte lineage. *Annu Rev Immunol* **12**, 209-225.
- Minegishi, Y., Rohrer, J., Coustan-Smith, E., Lederman, H. M., Pappu, R., Campana, D., Chan, A. C., and Conley, M. E. (1999). An essential role for BLNK in human B cell development. *Science* **286**, 1954-1957.
- Miosge, L., and Zamoyska, R. (2007). Signalling in T-cell development: is it all location, location, location? *Curr Opin Immunol* **19**, 194-199.
- Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R. S., Herrup, K., Tonegawa, S., and Papaioannou, V. E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* **68**, 869-877.
- Monroe, J. G. (2006). ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes. *Nat Rev Immunol* **6**, 283-294.
- Morita, S., Kojima, T., and Kitamura, T. (2000). Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* **7**, 1063-1066.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and 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., and Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-350.
- Munro, S. (2003). Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* **115**, 377-388.
- Nemazee, D. (2000). Receptor selection in B and T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* **18**, 19-51.

- Nemazee, D., Kouskoff, V., Hertz, M., Lang, J., Melamed, D., Pape, K., and Retter, M. (2000). B-cell-receptor-dependent positive and negative selection in immature B cells. *Curr Top Microbiol Immunol* **245**, 57-71.
- Nemazee, D. A., and Burki, K. (1989). Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature* **337**, 562-566.
- Neuberger, M. S. (1997). Antigen receptor signaling gives lymphocytes a long life. *Cell* **90**, 971-973.
- Neuberger, M. S., Patel, K. J., Dariavach, P., Nelms, K., Peaker, C. J., and Williams, G. T. (1993). The mouse B-cell antigen receptor: definition and assembly of the core receptor of the five immunoglobulin isotypes. *Immunol Rev* **132**, 147-161.
- Ng, C. H., Xu, S., and Lam, K. P. (2007). Dok-3 plays a nonredundant role in negative regulation of B-cell activation. *Blood* **110**, 259-266.
- Niirö, H., and Clark, E. A. (2002). Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol* **2**, 945-956.
- Nishida, M., Sugimoto, K., Hara, Y., Mori, E., Morii, T., Kurosaki, T., and Mori, Y. (2003). Amplification of receptor signalling by Ca<sup>2+</sup> entry-mediated translocation and activation of PLCgamma2 in B lymphocytes. *Embo J* **22**, 4677-4688.
- Nossal, G. J., and Pike, B. L. (1980). Clonal anergy: persistence in tolerant mice of antigen-binding B lymphocytes incapable of responding to antigen or mitogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 1602-1606.
- Nussenzweig, M. C., Shaw, A. C., Sinn, E., Danner, D. B., Holmes, K. L., Morse, H. C., 3rd, and Leder, P. (1987). Allelic exclusion in transgenic mice that express the membrane form of immunoglobulin mu. *Science* **236**, 816-819.
- Oancea, E., and Meyer, T. (1998). Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals. *Cell* **95**, 307-318.
- Oh-Hora, M., Johmura, S., Hashimoto, A., Hikida, M., and Kurosaki, T. (2003). Requirement for Ras guanine nucleotide releasing protein 3 in coupling phospholipase C-gamma 2 to Ras in B cell receptor signaling. *Journal of Experimental Medicine* **198**, 1841-1851.
- Okoh, M. P., and Vihinen, M. (2002). Interaction between Btk TH and SH3 domain. *Biopolymers* **63**, 325-334.
- Olivier, J. P., Raabe, T., Henkemeyer, M., Dickson, B., Mbamalu, G., Margolis, B., Schlessinger, J., Hafen, E., and Pawson, T. (1993). A Drosophila SH2-SH3 adaptor protein implicated in coupling the sevenless tyrosine kinase to an activator of Ras guanine nucleotide exchange, Sos. *Cell* **73**, 179-191.

- Ong, H. L., Liu, X., Tsaneva-Atanasova, K., Singh, B. B., Bandyopadhyay, B. C., Swaim, W. D., Russell, J. T., Hegde, R. S., Sherman, A., and Ambudkar, I. S. (2007). Relocalization of STIM1 for activation of store-operated Ca(2+) entry is determined by the depletion of subplasma membrane endoplasmic reticulum Ca(2+) store. *J Biol Chem* **282**, 12176-12185.
- Pappu, R., Cheng, A. M., Li, B., Gong, Q., Chiu, C., Griffin, N., White, M., Sleckman, B. P., and Chan, A. C. (1999). Requirement for B cell linker protein (BLNK) in B cell development. *Science* **286**, 1949-1954.
- Parekh, A. B., and Penner, R. (1997). Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* **77**, 901-930.
- Parekh, A. B., and Putney, J. W., Jr. (2005). Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* **85**, 757-810.
- Park, D. J., Rho, H. W., and Rhee, S. G. (1991). CD3 stimulation causes phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 on serine and tyrosine residues in a human T-cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5453-5456.
- Patterson, H. C., Kraus, M., Kim, Y. M., Ploegh, H., and Rajewsky, K. (2006). The B cell receptor promotes B cell activation and proliferation through a non-ITAM tyrosine in the Igalpha cytoplasmic domain. *Immunity* **25**, 55-65.
- Patterson, R. L., Boehning, D., and Snyder, S. H. (2004). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors as signal integrators. *Annu Rev Biochem* **73**, 437-465.
- Pawson, T. (2003). Organization of cell-regulatory systems through modular-protein-interaction domains. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* **361**, 1251-1262.
- Pawson, T. (2004). Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell* **116**, 191-203.
- Pawson, T., and Nash, P. (2003). Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* **300**, 445-452.
- Pelanda, R., and Torres, R. M. (2006). Receptor editing for better or for worse. *Curr Opin Immunol* **18**, 184-190.
- Petrie, R. J., Schnetkamp, P. P., Patel, K. D., Awasthi-Kalia, M., and 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**, 1220-1227.
- Putney, J. W., Jr., Broad, L. M., Braun, F. J., Lievreumont, J. P., and Bird, G. S. (2001). Mechanisms of capacitative calcium entry. *J Cell Sci* **114**, 2223-2229.

- Putney, J. W., Jr., and McKay, R. R. (1999). Capacitative calcium entry channels. *Bioessays* **21**, 38-46.
- Rajewsky, K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* **381**, 751-758.
- Ravichandran, K. S., Zhou, M. M., Pratt, J. C., Harlan, J. E., Walk, S. F., Fesik, S. W., and Burakoff, S. J. (1997). Evidence for a requirement for both phospholipid and phosphotyrosine binding via the Shc phosphotyrosine-binding domain in vivo. *Mol Cell Biol* **17**, 5540-5549.
- Rawlings, D. J., Saffran, D. C., Tsukada, S., Largaespada, D. A., Grimaldi, J. C., Cohen, L., Mohr, R. N., Bazan, J. F., Howard, M., Copeland, N. G., and et al. (1993). Mutation of unique region of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficient XID mice. *Science* **261**, 358-361.
- Rebecchi, M. J., and Pentylala, S. N. (2000). Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev* **80**, 1291-1335.
- Reth, M. (1989). Antigen receptor tail clue. *Nature* **338**, 383.
- Reth, M. (1992). Antigen Receptors on B Lymphocytes. *Annual Review of Immunology* **10**, 97-121.
- Reth, M., and Wienands, J. (1997). Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* **15**, 453-479.
- Reth, M., and Wienands, J. (1999). The maintenance and the activation signal of the B-cell antigen receptor. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **64**, 323-328.
- Rhee, S. G. (2001). Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem* **70**, 281-312.
- Rhee, S. G., and Bae, Y. S. (1997). Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J Biol Chem* **272**, 15045-15048.
- Robson, J. D., Davidson, D., and Veillette, A. (2004). Inhibition of the Jun N-terminal protein kinase pathway by SHIP-1, a lipid phosphatase that interacts with the adaptor molecule Dok-3. *Mol Cell Biol* **24**, 2332-2343.
- Rodriguez, R., Matsuda, M., Perisic, O., Bravo, J., Paul, A., Jones, N. P., Light, Y., Swann, K., Williams, R. L., and Katan, M. (2001). Tyrosine residues in phospholipase Cgamma 2 essential for the enzyme function in B-cell signaling. *J Biol Chem* **276**, 47982-47992.
- Roos, J., DiGregorio, P. J., Yeromin, A. V., Ohlsen, K., Lioudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J. A., Wagner, S. L., Cahalan, M. D., et al. (2005). STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca<sup>2+</sup> channel function. *J Cell Biol* **169**, 435-445.



- Rowen, L., Koop, B. F., and Hood, L. (1996). The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science* **272**, 1755-1762.
- Rowley, R. B., Burkhardt, A. L., Chao, H. G., Matsueda, G. R., and 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**, 11590-11594.
- Saijo, K., Mecklenbrauker, I., Santana, A., Leitger, M., Schmedt, C., and Tarakhovsky, A. (2002). Protein kinase C beta controls nuclear factor kappaB activation in B cells through selective regulation of the I kappaB kinase alpha. *J Exp Med* **195**, 1647-1652.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Salamero, J., Humbert, M., Cosson, P., and Davoust, J. (1990). Mouse B lymphocyte specific endocytosis and recycling of MHC class II molecules. *Embo J* **9**, 3489-3496.
- Sanchez, M., Misulovin, Z., Burkhardt, A. L., Mahajan, S., Costa, T., Franke, R., Bolen, J. B., and Nussenzweig, M. (1993). Signal transduction by immunoglobulin is mediated through Ig alpha and Ig beta. *J Exp Med* **178**, 1049-1055.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- Satterthwaite, A. B., Li, Z., and Witte, O. N. (1998). Btk function in B cell development and response. *Semin Immunol* **10**, 309-316.
- Sauer, K., Liou, J., Singh, S. B., Yablonski, D., Weiss, A., and Perlmutter, R. M. (2001). Hematopoietic progenitor kinase 1 associates physically and functionally with the adaptor proteins B cell linker protein and SLP-76 in lymphocytes. *J Biol Chem* **276**, 45207-45216.
- Schamel, W. W., and Reth, M. (2000). Monomeric and oligomeric complexes of the B cell antigen receptor. *Immunity* **13**, 5-14.
- Schatz, D. G., Oettinger, M. A., and Schlissel, M. S. (1992). V(D)J recombination: molecular biology and regulation. *Annu Rev Immunol* **10**, 359-383.
- Secrist, J. P., Karnitz, L., and Abraham, R. T. (1991). T-cell antigen receptor ligation induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1. *J Biol Chem* **266**, 12135-12139.
- Sefton, B. M., and Campbell, M. A. (1991). The role of tyrosine protein phosphorylation in lymphocyte activation. *Annu Rev Cell Biol* **7**, 257-274.

- Shibasaki, F., Price, E. R., Milan, D., and McKeon, F. (1996). Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4. *Nature* **382**, 370-373.
- Siggs, O. M., Makaroff, L. E., and Liston, A. (2006). The why and how of thymocyte negative selection. *Curr Opin Immunol* **18**, 175-183.
- Simons, K., and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 31-39.
- Sohn, H. W., Tolar, P., Jin, T., and Pierce, S. K. (2006). Fluorescence resonance energy transfer in living cells reveals dynamic membrane changes in the initiation of B cell signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 8143-8148.
- Songyang, Z., Shoelson, S. E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W. G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R. J., and et al. (1993). SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* **72**, 767-778.
- Sparks, A. B., Rider, J. E., Hoffman, N. G., Fowlkes, D. M., Quillam, L. A., and Kay, B. K. (1996). Distinct ligand preferences of Src homology 3 domains from Src, Yes, Abl, Cortactin, p53bp2, PLCgamma, Crk, and Grb2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1540-1544.
- Sparks, A. B., Rider, J. E., and Kay, B. K. (1998). Mapping the specificity of SH3 domains with phage-displayed random-peptide libraries. *Methods Mol Biol* **84**, 87-103.
- Spitaler, M., and Cantrell, D. A. (2004). Protein kinase C and beyond. *Nat Immunol* **5**, 785-790.
- Stoddart, A., Fleming, H. E., and Paige, C. J. (2000). The role of the preBCR, the interleukin-7 receptor, and homotypic interactions during B-cell development. *Immunol Rev* **175**, 47-58.
- Stork, B., Engelke, M., Frey, J., Horejsi, V., Hamm-Baarke, A., Schraven, B., Kurosaki, T., and Wienands, J. (2004). Grb2 and the non-T cell activation linker NTAL constitute a Ca(2+)-regulating signal circuit in B lymphocytes. *Immunity* **21**, 681-691.
- Stork, B., Neumann, K., Goldbeck, I., Alers, S., Kahne, T., Naumann, M., Engelke, M., and Wienands, J. (2007). Subcellular localization of Grb2 by the adaptor protein Dok-3 restricts the intensity of Ca<sup>2+</sup> signaling in B cells. *Embo J* **26**, 1140-1149.
- Su, T. T., Guo, B., Kawakami, Y., Sommer, K., Chae, K., Humphries, L. A., Kato, R. M., Kang, S., Patrone, L., Wall, R., et al. (2002). PKC-beta controls I kappa B kinase lipid raft recruitment and activation in response to BCR signaling. *Nat Immunol* **3**, 780-786.

- Su, Y.-W., Zhang, Y., Schweikert, J., Koretzky, G. A., Reth, M., and Wienands, J. (1999). Interaction of SLP adaptors with the SH2 domain of Tec family kinases. *Eur J Immunol* **29**, 3702-3711.
- Taddie, J. A., Hurley, T. R., Hardwick, B. S., and Sefton, B. M. (1994a). 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**, 13529-13535.
- Taddie, J. A., Hurley, T. R., and Sefton, B. M. (1994b). B-cell activation by wild type and mutant Ig-beta cytoplasmic domains. *Adv Exp Med Biol* **365**, 23-34.
- Takata, M., Homma, Y., and Kurosaki, T. (1995). Requirement of Phospholipase C-Gamma-2 Activation in Surface-Immunoglobulin M-Induced B-Cell Apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* **182**, 907-914.
- Takata, M., Sabe, H., Hata, A., Inazu, T., Homma, Y., Nukada, T., Yamamura, H., and Kurosaki, T. (1994). Tyrosine Kinases Lyn and Syk Regulate B-Cell Receptor-Coupled Ca<sup>2+</sup> Mobilization through Distinct Pathways. *Embo Journal* **13**, 1341-1349.
- Thomas, J. D., Sideras, P., Smith, C. I., Vorechovsky, I., Chapman, V., and Paul, W. E. (1993). Colocalization of X-linked agammaglobulinemia and X-linked immunodeficiency genes. *Science* **261**, 355-358.
- Tiegs, S. L., Russell, D. M., and Nemazee, D. (1993). Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J Exp Med* **177**, 1009-1020.
- Timmerman, L. A., Clipstone, N. A., Ho, S. N., Northrop, J. P., and Crabtree, G. R. (1996). Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca<sup>2+</sup> signals and immunosuppression. *Nature* **383**, 837-840.
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* **302**, 575-581.
- Tong, A. H., Drees, B., Nardelli, G., Bader, G. D., Brannetti, B., Castagnoli, L., Evangelista, M., Ferracuti, S., Nelson, B., Paoluzi, S., *et al.* (2002). A combined experimental and computational strategy to define protein interaction networks for peptide recognition modules. *Science* **295**, 321-324.
- Trub, T., Choi, W. E., Wolf, G., Ottinger, E., Chen, Y., Weiss, M., and Shoelson, S. E. (1995). Specificity of the PTB domain of Shc for beta turn-forming pentapeptide motifs amino-terminal to phosphotyrosine. *J Biol Chem* **270**, 18205-18208.
- Tsukada, S., Saffran, D. C., Rawlings, D. J., Parolini, O., Allen, R. C., Klisak, I., Sparkes, R. S., Kubagawa, H., Mohandas, T., Quan, S., and *et al.* (1993). Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell* **72**, 279-290.

- Varnai, P., Rother, K. I., and Balla, T. (1999). Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent membrane association of the Bruton's tyrosine kinase pleckstrin homology domain visualized in single living cells. *J Biol Chem* **274**, 10983-10989.
- Veillette, A., Latour, S., and Davidson, D. (2002). Negative regulation of immunoreceptor signaling. *Annual Review of Immunology* **20**, 669-707.
- Venkitaraman, A. R., Williams, G. T., Dariavach, P., and Neuberger, M. S. (1991). The B-cell antigen receptor of the five immunoglobulin classes. *Nature* **352**, 777-781.
- Vetrie, D., Vorechovsky, I., Sideras, P., Holland, J., Davies, A., Flinter, F., Hammarstrom, L., Kinnon, C., Levinsky, R., Bobrow, M., and et al. (1993). The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature* **361**, 226-233.
- Vihinen, M., Iwata, T., Kinnon, C., Kwan, S. P., Ochs, H. D., Vorechovsky, I., and Smith, C. I. (1996). BTKbase, mutation database for X-linked agammaglobulinemia (XLA). *Nucleic Acids Res* **24**, 160-165.
- Wagle, N. M., Cheng, P., Kim, J., Sproul, T. W., Kausch, K. D., and Pierce, S. K. (2000). B-lymphocyte signaling receptors and the control of class-II antigen processing. *Curr Top Microbiol Immunol* **245**, 101-126.
- Wang, D., Feng, J., Wen, R., Marine, J. C., Sangster, M. Y., Parganas, E., Hoffmeyer, A., Jackson, C. W., Cleveland, J. L., Murray, P. J., and Ihle, J. N. (2000). Phospholipase Cgamma2 is essential in the functions of B cell and several Fc receptors. *Immunity* **13**, 25-35.
- Wang, L. D., and Clark, M. R. (2003). B-cell antigen-receptor signalling in lymphocyte development. *Immunology* **110**, 411-420.
- Wang, Y., Horvath, O., Hamm-Baarke, A., Richelme, M., Gregoire, C., Guinamard, R., Horejsi, V., Angelisova, P., Spicka, J., Schraven, B., et al. (2005). Single and combined deletions of the NTAL/LAB and LAT adaptors minimally affect B-cell development and function. *Mol Cell Biol* **25**, 4455-4465.
- Watanabe, D., Hashimoto, S., Ishiai, M., Matsushita, M., Baba, Y., Kishimoto, T., Kurosaki, T., and Tsukada, S. (2001). Four tyrosine residues in phospholipase C-gamma 2, identified as Btk-dependent phosphorylation sites, are required for B cell antigen receptor-coupled calcium signaling. *J Biol Chem* **276**, 38595-38601.
- Weber, K., and Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* **244**, 4406-4412.
- Weigert, M., Perry, R., Kelley, D., Hunkapiller, T., Schilling, J., and Hood, L. (1980). The joining of V and J gene segments creates antibody diversity. *Nature* **283**, 497-499.

- Weintraub, B. C., Jun, J. E., Bishop, A. C., Shokat, K. M., Thomas, M. L., and Goodnow, C. C. (2000). Entry of B cell receptor into signaling domains is inhibited in tolerant B cells. *J Exp Med* **191**, 1443-1448.
- Wienands, J., Freuler, F., and Baumann, G. (1995). Tyrosine-phosphorylated forms of Ig beta, CD22, TCR zeta and HOSS are major ligands for tandem SH2 domains of Syk. *Int Immunol* **7**, 1701-1708.
- Wienands, J., Hombach, J., Radbruch, A., Riesterer, C., and Reth, M. (1990). Molecular components of the B cell antigen receptor complex of class IgD differ partly from those of IgM. *Embo J* **9**, 449-455.
- Wienands, J., Schweikert, J., Wollscheid, B., Jumaa, H., Nielsen, P. J., and 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**, 791-795.
- Winslow, M. M., Neilson, J. R., and Crabtree, G. R. (2003). Calcium signalling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* **15**, 299-307.
- Wong, J., Ishiai, M., Kurosaki, T., and Chan, A. C. (2000). Functional complementation of BLNK by SLP-76 and LAT linker proteins. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 33116-33122.
- Wu, J. N., and Koretzky, G. A. (2004). The SLP-76 family of adapter proteins. *Semin Immunol* **16**, 379-393.
- Xavier, R., Brennan, T., Li, Q., McCormack, C., and Seed, B. (1998). Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity* **8**, 723-732.
- Yamadori, T., Baba, Y., Matsushita, M., Hashimoto, S., Kurosaki, M., Kurosaki, T., Kishimoto, T., and Tsukada, S. (1999). Bruton's tyrosine kinase activity is negatively regulated by Sab, the Btk-SH3 domain-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6341-6346.
- Yamanashi, Y., Tamura, T., Kanamori, T., Yamane, H., Nariuchi, H., Yamamoto, T., and Baltimore, D. (2000). Role of the rasGAP-associated docking protein p62(dok) in negative regulation of B cell receptor-mediated signaling. *Genes Dev* **14**, 11-16.
- Ye, M., and Graf, T. (2007). Early decisions in lymphoid development. *Curr Opin Immunol* **19**, 123-128.
- Yu, P., Constien, R., Dear, N., Katan, M., Hanke, P., Bunney, T. D., Kunder, S., Quintanilla-Martinez, L., Huffstadt, U., Schroder, A., *et al.* (2005). Autoimmunity and inflammation due to a gain-of-function mutation in phospholipase C gamma 2 that specifically increases external Ca<sup>2+</sup> entry. *Immunity* **22**, 451-465.

- Zhang, S. L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J. A., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Stauderman, K. A., and Cahalan, M. D. (2005). STIM1 is a Ca<sup>2+</sup> sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca<sup>2+</sup> store to the plasma membrane. *Nature* **437**, 902-905.
- Zhao, M., Schmitz, A. A., Qin, Y., Di Cristofano, A., Pandolfi, P. P., and Van Aelst, L. (2001). Phosphoinositide 3-kinase-dependent membrane recruitment of p62(dok) is essential for its negative effect on mitogen-activated protein (MAP) kinase activation. *J Exp Med* **194**, 265-274.
- Zhou, M. M., Ravichandran, K. S., Olejniczak, E. F., Petros, A. M., Meadows, R. P., Sattler, M., Harlan, J. E., Wade, W. S., Burakoff, S. J., and Fesik, S. W. (1995). Structure and ligand recognition of the phosphotyrosine binding domain of Shc. *Nature* **378**, 584-592.

## 9. Anhang

### 9.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Signalmoleküle des Ca <sup>2+</sup> -Initiationskomplexes.....	11
Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Ca <sup>2+</sup> -Fluxregulation durch Grb2.....	17
Abb. 6.1: Morphologische Merkmale von DT40 B-Lymphocyten.....	49
Abb. 6.2: Tyrosinphosphorylierung von Cit SLP-65.....	51
Abb. 6.3: Cit SLP-65 ist Ca <sup>2+</sup> -kompetent.....	53
Abb. 6.4: SLP-65 wird BCR-induziert an die Plasmamembran rekrutiert.....	54
Abb. 6.5: Tyrosinphosphorylierung von SLP-65 GFP.....	56
Abb. 6.6: SLP-65 GFP ist Ca <sup>2+</sup> -kompetent.....	57
Abb. 6.7: SLP-65 wird BCR-induziert an die Plasmamembran rekrutiert.....	58
Abb. 6.8: Grb2 GFP-Expression.....	59
Abb. 6.9: Grb2 GFP ist ein funktioneller Negativregulator der Ca <sup>2+</sup> -Antwort.....	61
Abb. 6.10: Grb2 unterliegt einer BCR-induzierten Translokation an die Plasmamembran in Abhängigkeit der SH2-Domäne.....	62
Abb. 6.11: Die Plasmamembranrekrutierung von Grb2 erfordert die Aktivität der PTK Lyn.....	63
Abb. 6.12: Tyrosinphosphorylierung von Dok-3.....	66
Abb. 6.13: Dok-3 ist ein Negativregulator der Ca <sup>2+</sup> -Mobilisierung in DT40 B-Lymphocyten.....	68
Abb. 6.14: Tyrosinphosphorylierung von Dok-3 GFP.....	70
Abb. 6.15: Dok-3 GFP ist ein Negativregulator der Ca <sup>2+</sup> -Mobilisierung.....	72
Abb. 6.16: Dok-3 ist konstitutiv an der Plasmamembran lokalisiert.....	73
Abb. 6.17: Dok-3 rekrutiert Grb2 an die Plasmamembran.....	75
Abb. 6.18: Dok-3 unterliegt einer stimulationsabhängigen Homo-Oligomerisierung.....	76
Abb. 6.19: Schematische Darstellung der Dok-3/Grb2-Chimären.....	77
Abb. 6.20: Expression und Tyrosinphosphorylierung der chimären Dok-3/Grb2-Proteine.....	78

---

Abb. 6.21: Die C-terminale Grb2-SH3-Domäne und Dok-3 $\Delta$ YENI bilden ein negativregulatorisches Modul der $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung.....	79
Abb. 6.22: Das minimale Dok-3/Grb2-Modul ist an der Plasmamembran lokalisiert.....	80
Abb. 6.23: Schematische Darstellung der Plasmamembran- <i>targeting</i> -Chimären.....	81
Abb. 6.24: Tyrosinphosphorylierung membranassoziierter Dok-3-Fusionsproteine.....	82
Abb. 6.25: Die chimären Dok-3-Fusionsproteine sind an der Plasmamembran lokalisiert.....	83
Abb. 6.26: Vergleich der Phospholipid-Bindungsspezifität der PLC $\delta$ 1- und Dok-3-PH-Domäne.....	84
Abb. 6.27: Die plasmamembranassoziierten Dok-3-Chimären sind funktionelle Negativregulatoren der $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort in DT40-Zellen.....	85
Abb. 6.28: Die $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort in NTAL-exprimierenden <i>dok-3</i> <sup>-/-</sup> DT40-Zellen ist unverändert.....	86
Abb. 7.1: Die BCR-induzierte Plasmamembranrekrutierung von SLP-65 erfordert sowohl die Funktion des <i>leucine zipper</i> -Motivs als auch der SH2-Domäne.....	91
Abb. 7.2: Dok-3 und Grb2 bilden ein inhibitorisches Signalmodul der BCR-induzierten $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung.....	99
Abb. 9.1: Aminosäuresequenz von SLP-65 GFP.....	124
Abb. 9.2: Aminosäuresequenz von Citrin SLP-65.....	125
Abb. 9.3: Aminosäuresequenz von Grb2 GFP.....	126
Abb. 9.4: Aminosäuresequenz von Dok-3 GFP.....	127
Abb. 9.5: Aminosäuresequenz von Dok-3 $\Delta$ YENI SH3 GFP.....	128
Abb. 9.6: Aminosäuresequenz von Lyn[PM] Dok-3 $\Delta$ PH GFP.....	129
Abb. 9.7: Aminosäuresequenz von NTAL[TM] Dok-3 $\Delta$ PH GFP.....	130
Abb. 9.8: Aminosäuresequenz von PLC $\delta$ 1[PH] Dok-3 $\Delta$ PH GFP.....	131



## 9.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 4.1: Antikörper .....	21
Tab. 4.2: Vektoren .....	23
Tab. 4.3: Primer .....	24
Tab. 4.4: cDNA-Konstrukte .....	27
Tab. 4.5: verwendete Bakterienstämme .....	29
Tab. 4.6: verwendete DT40-Zelllinien .....	30
Tab. 5.1: Standard-PCR-Ansatz .....	36
Tab. 5.2: Standard-PCR-Programm .....	36
Tab. 5.3: Fluorophoreigenschaften .....	43

### 9.3 Aminosäuresequenzen

#### SLP-65 GFP

```

MDKLNKLAVPAGEKFRKLOKMHVDIKKNESGIINKFKKFQNEQVALICKT 50
GKDTWDRLLKKKPPPSLPRRDYASEHADNEEEQWSDDFDSDYENPDGHSDS 100
EMYVVPSEENPDDSYEPPPSEQEKKKIIPSSFPISRGEYADNRTSHHQLPP 150
INKPLPSTPSSALPRPKKPSLPSPAAKPKLPLKPRECSDDENYIVPVDN 200
DDDNYIEPTESSTPPPAKPPVNRFMKPPAKSALPTPPKPSLASDMQEVYE 250
VPEEEEEELSPPPVTRFTKPLPATRAQNAEHSMHSMSTRESPKLDASRNIL 300
PLPRNRLHPKTDHEANNNDENHSFSNTQESKFPPGAAPSPLPRALKKTSN 350
AVNPAKPCLPSRDTFTVNEDKPTAADRRRGSSHEFPLPPLPSGTPKSSLQ 400
KPLVLPKVPEAPSRALGTSPHSSISSISSTADQDAGVHSKAWYAATCDRK 450
TAEDALYRSNKDGSFLIRKSSGODSROPYTLVVFYNRRVYNIPIRFIEST 500
ROYALGREKCGEERFDSVAEIVENHQHTSLVLIDSONNTKDSTKLKYIVR 550
VSDPPVATMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGK 600
LTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEG 650
YVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKL 700
EYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDG 750
PVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYK*

```

#### Abbildung 9.1: Aminosäuresequenz von SLP-65 GFP

Die Aminosäuresequenz von Hühner SLP-65 ist in schwarz dargestellt. Das *leucine zipper*-Motiv ist durch einfache Unterstreichung gekennzeichnet, die C-terminale SH2-Domäne durch doppelte. Die substituierten Tyrosinreste sind in rot hervorgehoben. Die GFP-Aminosäuresequenz ist in grün dargestellt, verbindende Aminosäuren in grau.

## Citrin SLP-65

MVSKGEELFTGVVPILEVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICT 50  
 TGKLPVPWPPTLVTTTFGYGLMCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIF 100  
 FKDDGNYKTRAEVKFEEDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYN SHN 150  
 VYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDG SVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNH 200  
 YLSYQSKLSKDPNEKRDMVLLLEFVTAAGITLGMDELYKEFVDIMDKLNK 250  
LAVPAGEKFRKLQKMHVDIKKNESGIINKFKKQNEQVALICKTGKDTWD 300  
 RLKKKPPPSLPRRDYASEHADNEEEQWSDDFDSDYENPDGHS DSEMYVVP 350  
 SEENPDDS YEPPPSEQEKKKIPSSFPI SRGEYADNRTSHHQLPPINKPLP 400  
 STPSSALPRPKPSLPSPAAKPKLPLKPRECS DDEDNYIVPVDNDDDN YI 450  
 EPTESSTPPPAPPPVNRFMKPPAKSALPTPPKPSLASDMQEVYEVPEEEEE 500  
 ELSPPPVTREFTKPLPATRAQNAEHSMHSM TRESPKLDASRNILPLPRNR 550  
 LHPKTDHEANNNDENHSFSNTQESKFPPGAAPSPLPRALKKTSNAVNPAK 600  
 PCLPSRDTFTVNEDKPTAADRRRGS SHEFPLPPLPSGTPKSSLQKPLVLP 650  
 KVPEAPSRALGTSPHSSISSISSTADQDAGVH SKAWYAATCDRKTAE DAL 700  
YRSNKDGSFLIRKSSGODSRQPYTLVVFYNR RVYNIPIRFIESTROYALG 750  
REKCGEERFDSVAEIVENHQHTSLVLIDSONNTKDSTK LKYIVRVS\*

### Abbildung 9.2: Aminosäuresequenz von Citrin SLP-65

Die Citrin-Aminosäuresequenz ist in gelb dargestellt, verbindende Aminosäuren in grau. Die Aminosäuresequenz von Hühner SLP-65 ist in schwarz dargestellt. Das *leucine zipper*-Motiv ist durch einfache Unterstreichung gekennzeichnet, die C-terminale SH2-Domäne durch doppelte. Die substituierten Tyrosinreste sind in rot hervorgehoben.

**Grb2 GFP**

```

MEAIAKYDFKATADDELSFKRGDILKVLNEECDQNWYKAELNGKDGFIPK 50
NYIEMKPHPWFFGKIPRAKAEEMLGKQRHDGAFLIRESESAPGDFSLSVK 100
FGNDVQHFKVLRDGAGKYFLWVVKFNSLNELVDYHRSTSVSRNQQIFLRD 150
IEQVPQQPTYVQALFDFDPQEEGELGFRRGDFIQVLDNSDPNWWKGACHG 200
QTGMFPRNYVTPVNRNIPGSIATMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHK 250
FSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQCFSRYPD 300
HMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELK 350
GIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSV 400
QLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTA 450
AGITLGMDELYK*

```

**Abbildung 9.3: Aminosäuresequenz von Grb2 GFP**

Die Aminosäuresequenz von Hühner Grb2 ist in schwarz dargestellt. Die N- und C-terminalen SH3-Domänen sind durch einfache Unterstreichung gekennzeichnet, die zentrale SH2-Domäne durch gepunktete Unterstreichung. Die substituierten Prolin-, Arginin- und Tryptophanreste sind in rot hervorgehoben. Die GFP-Aminosäuresequenz ist in grün dargestellt, verbindende Aminosäuren in grau.

### Dok-3 GFP

MERPVKDGI IYVQHCKFGKRTWRKI**RAQLFAAS**PFGVARMEKFDARDHGT 50  
VSDISLQRCARRVIRLSDCVSVGPMGTESCPKATAAFYLTTTEKNYVLAA 100  
EQRDEWIEQLCQLAFQGKKEAEQSSSTGLQPIPMEENCL**Y**SSWQDLTEFP 150  
VLVLRTEAAARCELHGHYVLAALPHSLTLKDAQSQOPLLTPYPFL**R**KFG 200  
QDONIFSFEAGRRSDSGEGTFTFSTPRAAELCRAVAAAIACQQQGOESPQ 250  
PSAQGLSNQPWGAEAEDPQCSPTLGRAHSGSHSASYPSLNLLRFPPEPE 300  
APAPIV**Y**ASIARGQQPHFRPCPGQPLPEHL**Y**ENIFTAQRPLAEEEEEEE 350  
EGRWELGCRQAPEGHSSEAAVPYPARSAPQPHTQRWAPGGSRGGAEEPSR 400  
PKPORTLRAKLVRLLSRDGPGARDWSLPVATMVSKGEELFTGVVPILVEL 450  
DGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGV 500  
QCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDT 550  
LVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIR 600  
HNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHM 650  
VLLEFVTAAGITLGMDELYK\*

#### Abbildung 9.4: Aminosäuresequenz von Dok-3 GFP

Die Aminosäuresequenz von Hühner Dok-3 ist in schwarz dargestellt. Die PH-Domäne ist durch einfache Unterstreichung gekennzeichnet, die PTB-Domäne durch gepunktete Unterstreichung. Die substituierten Arginin- und Tyrosinreste sind in rot hervorgehoben. Die im chimären Dok-3/Grb2-Protein Dok-3  $\Delta$ YENI SH3 GFP deletierte C-terminale Aminosäuresequenz ist durch doppelte Unterstreichung markiert (vergl. Abb. 9.5). Die GFP-Aminosäuresequenz ist in grün dargestellt, verbindende Aminosäuren in grau.

**Dok-3  $\Delta$ YENI SH3 GFP**

MERPVKDGI IYVQHCKFGKRTWRKIRAQLFAAS PFGVARMEKFDARDHGT 50  
VSDISLQRCARRVIRLSDCVSVGPMGTESCPKATAAFYLTTEKNYVLAA 100  
EQRDEWIEQLCQLAFQGGKKEAEQSSSTGLQPI PMEENCLYSSWQDLTEFP 150  
VLVLRTEAAARCELHGHYVLAALPHSLTLKDAQSQOPLLTPYPFLRKFG 200  
QDQNI FSFEAGRRSDSGEGTFTTFSTPRAAELCRAVAAA IACQQQGOESPQ 250  
PSAQGLSNQPFWGAEAE DPQCSPTLGRAHSGSHSASYPSLNLLRFPPEPE 300  
APAPIVYASIARGQQPHFRPCPIEQVPQQPTYVQALFDFDPQEEGELGFR 350  
RGDFIQVLDNSDPN **W**WKGACHGQTGMFPRNYVTPVNRNI **PGSIATMVSKG** 400  
**EELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKLP** 450  
**VPWPTLVTTLT YGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDG** 500  
**NYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYN SHNVYIMA** 550  
**DKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNH YLSTQ** 600  
**SALSKDPNEKRDMVLLFVTAAGITLGMDELYK\***

**Abbildung 9.5: Aminosäuresequenz von Dok-3  $\Delta$ YENI SH3 GFP**

Die Aminosäuresequenz von Hühner Dok-3 ist in schwarz dargestellt. Die PH-Domäne ist durch einfache Unterstreichung gekennzeichnet, die PTB-Domäne durch gepunktete Unterstreichung. Die Aminosäuresequenz der C-terminalen Grb2-SH3-Domäne ist in blau dargestellt. Der substituierte Tryptophanrest in Dok-3  $\Delta$ YENI SH3\* GFP ist in rot hervorgehoben. Die GFP-Aminosäuresequenz ist in grün dargestellt, verbindende Aminosäuren in grau.

## Lyn[PM] Dok-3 ΔPH GFP

```

MGCIKSKRKDNLNDDEVDSKTADLTMAFQGKKEAEQSSTGLQPIPMEEN 50
CLYSSWQDLTEFPVLVLRTEAARCELHGHYVLAALPHSLTLKDAQSQQP 100
.....
LLTWPYPFLRKFGDQNIFSFEAGRRSDSGEGTFTFSTPRAELCRAVAA 150
.....
AIACQQQQQESPQPSAQGLSNQPWGAEAEDPQCSPTLGRAHSGSHSASYP 200
.....
SLNLLRFPPVEPEAPIVYASIARGQQPHFRPCPGQPLPEHLYENIFTA 250
.....
QPRPLAEEEEEEGRWELGCRQAEGHSSEAAVPYPARSAPQPHTQRWA 300
.....
PGSRGGAEEPSRPKPQRTLRAKLVRLLSRDGPGARDWSLPVATMVSKGE 350
.....
ELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPV 400
.....
PWPTLVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGN 450
.....
YKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNSHNVYIMAD 500
.....
KQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQS 550
.....
ALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYK*

```

### Abbildung 9.6: Aminosäuresequenz von Lyn[PM] Dok-3 ΔPH GFP

Die Lyn-Aminosäuresequenz (Maus) ist blau markiert, das Myristoylierungsmotiv GxxxS und das Palmitoylierungsmotiv GC ist in hellblau hervorgehoben. Die Aminosäuresequenz von Hühner Dok-3 ist in schwarz dargestellt. Die PTB-Domäne ist durch gepunktete Unterstreichung gekennzeichnet, Tyrosinmotive sind in rot hervorgehoben. Die GFP-Aminosäuresequenz ist in grün dargestellt, verbindende Aminosäuren in grau.

## NTAL[TM] Dok-3 ΔPH GFP

```

MAQPELLWAAAGLMLLGVAVSACVRCQLYATKRGKDGSGSRLERPQRFE 50
VIRSCSAVTRRPERIKEPEHLARKAPEELSTSCHVGFESSAEPRAFQGKK 100
EAEQSSSTGLQPI PMEENCLYSSWQDLTEFPVLVLRTEAAARCELHGHYV 150
LAALPHSLTLKDAQSQOPLLTPYPFLRKFQDQNI FSFEAGRRSDSGEG 200
TFTFSTPRAAELCRAVAAA IACQQQGOES PQPSAQGLSNQPWGAEAE DPQ 250
CSPTLGRAHSGSHSASYPSLNLLRFPPVEPEAPAPIVYASIARGQQPHFR 300
PCPGQPLPEHLYENIFTAQPRPLAE EEEAE EEEGRWELGCRQAPEGHSSEA 350
AVPYPARSAPQPHTQRWAPGGSRGGAEEPSRPKPQRTLRAKLVRLLSRDG 400
PGARDWSL PVATMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDA 450
TYGKLT LKFICTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSA 500
MPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFE GDTLVNRIELKGIDFKEDGNIL 550
GHKLEYNYN SHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDG SVQLADHYQQNTP 600
IGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMVLLFVTAAGITLGMDELY 650
K*

```

### Abbildung 9.7: Aminosäuresequenz von NTAL[TM] Dok-3 ΔPH GFP

Die NTAL-Aminosäuresequenz (Huhn) ist blau markiert. Die Aminosäuresequenz von Hühner Dok-3 ist in schwarz dargestellt. Die PTB-Domäne ist durch gepunktete Unterstreichung gekennzeichnet, Tyrosinmotive sind in rot hervorgehoben. Die GFP-Aminosäuresequenz ist in grün dargestellt, verbindende Aminosäuren in grau.



## PLCδ1[PH] Dok-3 ΔPH GFP

```

MDSGRDFLTLHGLQDDPDLQALLKGSOLLKVKSSSWRRERFYKLOEDCKT 50
IWQESRKVMRSPESQLFSIEDIQEVRMGHRTEGLEKFARDIPEDRCFSIV 100
FKDQRNTLDLIAPSPADVQHWVQGLRKIIDRSGSMTGRDLTMAFQ GKKEA 150
EQSSSTGLQPIPMEENCLYSSWQDLTEFPVLVLRTEAAARCELHGHYVLA 200
ALPHSLTLKDAQSQOPLLTPYPFLRKFGODONIFSF EAGRRSDSGEGTF 250
TFSTPRAAELCRAVAAAIACQOQGQESPOPSAQGLSNQPWGAE AEDPQCS 300
PTLGRAHSGSHSASYP SLNLLRFPPVEPEAPAPIVYASIARGQQPHFRPC 350
PGQPLPEHL YENIFTAQPRPLAE EEEEEEGRWELGCRQAPEGHSSEAAV 400
PYPARSAPQPHTQRWAPGGSRGGAE EPSRKPQRTLRAKLVRLLSRDGPG 450
ARDWSLPVATMVSKGEELFTGVVPI LVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY 500
GKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLT YGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMP 550
EGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGH 600
KLEYNYN SHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDG SVQLADHYQQNTPIG 650
DGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK* 700

```

### Abbildung 9.8: Aminosäuresequenz von PLCδ1[PH] Dok-3 ΔPH GFP

Die Aminosäuresequenz der PLCδ1PH-Domäne (Maus) ist blau markiert. Die Aminosäuresequenz von Hühner Dok-3 ist in schwarz dargestellt. Die PTB-Domäne ist durch gepunktete Unterstreichung gekennzeichnet, Tyrosinmotive sind in rot hervorgehoben. Die GFP-Aminosäuresequenz ist in grün dargestellt, verbindende Aminosäuren in grau.

# Lebenslauf

Ingo Goldbeck

**Geburtsdatum** 10. November 1976  
**Geburtsort** Bielefeld  
**Familienstand** ledig  
**Nationalität** deutsch

## Schulbildung

1983-1987 Grundschule Ummeln, Bielefeld  
1987-1996 Brackweder Gymnasium, Bielefeld  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

## Ersatzdienst

1996-1997 Bielefelder Werkstätten für Behinderte, Werkhaus GmbH

## Studium

1997-2003 Studiengang Biochemie an der Universität Bielefeld  
Diplomarbeit in der Abteilung Biochemie I, Fakultät für Chemie,  
Universität Bielefeld, Prof. Dr. J. Wienands  
Titel: Identifizierung spezifischer Interaktionsmotive des B-Zell-  
Adapterproteins SLP-65 für nachgeschaltete Effektormoleküle  
02/2003 Abschluss: Diplom

## Promotion

05/2003-12/2004 Wissenschaftlicher Angestellter in der Abteilung Biochemie I,  
Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld, Prof. Dr. J. Wienands  
Seit 01/2005 Wissenschaftlicher Angestellter in der Abteilung Zelluläre und  
Molekulare Immunologie, Universität Göttingen, Prof. Dr. J.  
Wienands

### **Eidesstattliche Erklärung**

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

Göttingen, den 02.11.2007

Ingo Goldbeck