

Funktion von $Ig\alpha$, $Ig\beta$ und SHIP in der Fc γ R11b1-vermittelten Signaltransduktion in B-Zellen

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades

vorgelegt von

Shi Li

Fakultät für Chemie
der Universität Bielefeld

April 2001

Referent: Prof. Dr. J. Frey

Coreferent: Prof. Dr. J. Wienands

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Mai. 01

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Biochemie II der Fakultät für Chemie unter der wissenschaftlichen Leitung von Prof. Dr. J. Frey durchgeführt. Bei ihm und Dr. P. Budde bedanke ich mich herzlich für die Überlassung des Themas, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die fachliche und finanzielle Unterstützung, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dem Graduiertenkolleg "Zelluläre Grundlagen biotechnischer Prozesse" der Universität Bielefeld danke ich auch für die finanzielle Unterstützung und in diesem Rahmen durchgeführten vielen interdisziplinären Veranstaltungen.

Prof. Dr. J. Wienands und Prof. Dr. Tschesche möchte ich für die Bereitstellung der rekombinanten SH2/SH3-Domänen und des Anti-BLNK-Antikörpers bzw. die Protein-Sequenzierungen danken. Mein Dank gilt auch Dr. M. Jücker und Prof. Dr. G. W. Mayr (Universität Hamburg) für die SHIP-Aktivitätsmessungen und die Bereitstellung des Anti-NPXY(SHIP)-Antikörpers.

Christina Geerds und Melanie Duckert danke ich für ihre hervorragende technische Assistenz. Allen Mitgliedern der Abteilung Biochemie II, die durch ständige Diskussionsbereitschaft und Ratschläge eine gute Arbeitsatmosphäre geschaffen haben, schulde ich Dank. Namentlich erwähnen möchte ich anbei Dr. N. Bewarder, Dr. V. Weinrich, Dr. W. Engelhardt, Dipl. Chem. O. Friedrich, Dipl. Chem. C. Schäffer und Dipl. Biochem. M. Engekel.

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung und Fragestellung	1
1.1 Signalübermittlung in B-Zellen	1
1.1.1 Die Antigenrezeptoren der B-Zellen und Fc-Rezeptoren	2
1.1.2 BCR-induzierte Aktivierung über ITAM-tragende Ig α - und Ig β -Ketten	6
1.1.3 Inhibition der BCR-Signaltransduktion über ITIM-tragende Fc γ RIIb1	12
1.2 Die Struktur und biologische Funktionen der SHIP-Proteine	15
1.2.1 Struktur von p145 SHIP, SHIP-Isoformen und SHIP-Homologen	16
1.2.2 Enzymaktivität von SHIP und ihre Assoziationen mit anderen Proteinen	18
1.3 Fragestellung	21
2. Material	23
2.1 Zelllinien	23
2.2 Bakterienstämme	23
2.3 Plasmide	24
2.4 cDNA-Moleküle	25
2.5 Oligonucleotide	25
2.6 Rekombinante Proteine	27
2.7 Antikörper	27
2.8 Enzyme	28
2.9 Chemikalien	28
2.10 Medien, Puffer und Lösungen	28
2.11 Sonstige Materialien	31
2.12 Geräte	32
3. Methoden	34
3.1 Molekularbiologische Methoden	34
3.1.1 Kultivierung und Lagerung von Bakterien	34
3.1.2 Präparation von Plasmid-DNA	34
a) Schnellisolierung in kleinem Maßstab	34
b) Großisolierung	35
3.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	36
3.1.4 Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonucleasen	36
3.1.5 DNA-Fällung	37
3.1.6 Agarosegelelektrophorese	37
3.1.7 Insertion von DNA-Fragmenten in Vektor-DNA	38
a) Dephosphorylierung von 5' Phosphatgruppen linearisierter Vektor-DNA	38
b) Auffüllen und Abbauen inkompatibler DNA-Enden	38
c) Ligation	38
3.1.8 Herstellung und Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i>	39
3.1.9 Stabile Transfektion von IIA1.6-Zellen mittels Elektroporation	40

3.1.10	Präparation von RNA aus Eukaryontenzellen	41
3.1.11	Reverse Transkription	42
3.1.12	PCR	42
3.1.13	DNA-Sequenzierung	43
3.2	Zellbiologische Methoden	43
3.2.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen und Techniken	43
a)	Zählen von Zellen	43
b)	Einfrieren und Auftauen von Zellen	44
c)	DAPI-Färbung	44
d)	Einzelzellklonierung (Subklonierung)	44
3.2.2	Quantitative Bestimmung der Oberflächenfluoreszenz mittels Durchflußcytometrie	44
3.2.3	Analyse des intrazellulären Calciumflusses in IIA1.6-Zellen am Durchflußcytometer	45
3.2.4	Induktion der Tyrosinphosphorylierung in B-Zellen	46
a)	Stimulation durch Vernetzung von Oberflächenrezeptoren	46
b)	Pervanadat/H ₂ O ₂ Inkubation	46
3.3	Proteinchemische und immunochemische Methoden	47
3.3.1	Quantitative Proteinbestimmung	47
a)	Methode nach Lowry	47
b)	Methode nach Bradford	47
3.3.2	SDS-PAGE	47
3.3.3	Western Blot	48
a)	Proteintransfer	48
b)	Antikörper Inkubation und Detektion	49
c)	<i>Stripping</i> von Immunblots	49
3.3.4	Proteinfärbung	50
a)	Silberfärbung von Proteingelen	50
b)	Coomassiefärbung von Proteingelen und auf PVDF transferierten Proteinen	50
c)	Ponceaufärbung von Proteinen auf Membranen	50
3.3.5	Immunpräzipitation und Affinitätsbindung	51
a)	Immunpräzipitation von chimärem IgM-Rezeptor	51
b)	Repräzipitation von IgM-Chimärrezeptor-assoziierten Protein-Tyrosininasen	51
c)	Immunpräzipitation von FcγRIIb	51
d)	GST-SH2 bzw. -SH3 Domäne Affinitätsreinigung	52
e)	Immunpräzipitation von SHIP	52
3.3.6	<i>In vitro</i> Kinase-Test	52
3.3.7	Expression und Affinitätsreinigung rekombinanter Proteine	53
a)	Induktion der Fremdproteinexpression in <i>E. coli</i>	53
b)	Native Aufarbeitung des Fremdproteins aus der Testexpression	53
c)	Bestimmung der Lokalisation von in <i>E. coli</i> exprimierten Proteinen	53
d)	Denaturierende Aufarbeitung von His ₆ -Fusionsproteinen an Ni-NTA-Agarose	54
e)	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen an Glutathion-Agarose/Sepharose unter nativen Bedingungen im großen	54

	Maßstab	
	f) Aufreinigung und Renaturierung von enzymatisch aktiven GST-Fusionsproteinen mittels Sarcosyl	55
	g) Thrombinspaltung von aufgereinigten GST-Fusionsproteinen	55
3.3.8	Protein-Sequenzierung	55
3.3.9	Substrattest für SHIP	56
3.3.10	Herstellung von polyklonalen Antikörpern	56
4.	Ergebnisse	57
4.1	Negative Regulation von Ig α /Ig β in der Signaltransduktion	57
4.1.1	Expression des IgM/Ig α -Chimärrezeptors in Fc γ RIIb1- und Fc γ RIIb2- exprimierenden IIA1.6-Zellen	58
4.1.2	Inhibierung des IgM/Ig α -induzierten Calciumionenanstiegs nach der Fc γ RIIb-Coquervernetzung	60
4.1.3	Bedeutung von Ig α und Ig β für die Tyrosinphosphorylierung von Fc γ RIIb1 nach der Coquervernetzung	62
4.1.4	Untersuchung der Tyrosinphosphorylierung von Fc γ RIIb bei Pervanadat/H ₂ O ₂ Inkubation	66
4.1.5	Regulation der Tyrosinphosphorylierung von IgM/Ig α nach der Fc γ RIIb-Coquervernetzung	68
4.1.6	Analyse der Tyrosinphosphorylierung von endogenen Ig α - und Ig β -Ketten	71
4.1.7	Assoziation von der Tyrosinkinase Lyn und Fyn an die chimären IgM-Rezeptoren	73
4.2	Untersuchungen des SHIP-Proteins	75
4.2.1	Expression der rekombinanten SH2-Domäne von SHIP in <i>E. coli</i> und Herstellung von polyklonaler Antikörper	75
4.2.2	Expression der enzymatisch aktiven katalytischen Domäne von SHIP in <i>E. coli</i> und Herstellung von polyklonaler Antikörper	78
4.2.3	Transfektion von Fc γ RIIb1- und Fc γ RIIb2-exprimierenden IIA1.6-Zellen mit SHIP katalytischen Domänen, Wt SHIP und einer <i>Antisense</i> -Sequenz	82
4.2.4	Nachweis von endogenem SHIP in IIA1.6-Zellen	83
	a) RT-PCR	83
	b) Immunpräzipitation	85
	c) Affinitätsbindung an verschiedene SH3-Domänen	87
5.	Diskussion	91
5.1	Unterschiedliche Funktionen von Ig α und Ig β in der negativen Fc γ RIIb1-Signalübermittlung	92
5.2	Wesentliche Rolle der SHIP-Proteine in Fc γ RIIb1-vermittelten Signalkaskaden	98
5.3	Modellsysteme für weitere SHIP-Untersuchungen	104
6.	Zusammenfassung	110

7. Literaturverzeichnis	112
8. Anhang	133
8.1 Klonierungsschemata	133
a) Konstrukte der SH2-Domäne von SHIP	133
b) Konstrukte der katalytischen Domänen von SHIP	133
c) Maus SHIP und Human SHIP	134
d) <i>Antisense</i> -SHIP-Konstrukt	134
8.2 DNA- und Protein-Sequenzen der hergestellten Konstrukte	135
a) SH2(SHIP)	135
b) KD(SHIP) (krt)	135
c) KD(SHIP) (n1)	137
d) KD(SHIP) (n2)	138
e) KD(SHIP) (n3)	139
f) KD(SHIP) (5n3n)	141
8.3 Abkürzungsverzeichnis	143
8.3.1 Spezielle Abkürzungen	143
8.3.2 Allgemeine Abkürzungen	149
8.4 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	149

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

1.1 Signalübermittlung in B-Zellen

B-Zellen oder B-Lymphocyten spielen eine wichtigste Rolle für die humorale Immunantwort, da sie Antikörper sezernieren, die extrazelluläre Mikroorganismen binden und diese neutralisieren. Gebundene Antikörper aktivieren eine Vielzahl von akzessorischen Zellen mit Fc-Rezeptoren dazu, Pathogene zu beseitigen und die Verbreitung intrazellulärer Infektionen zu verhindern.

Die B-Zellen entwickeln sich bei erwachsenen Säugern im Knochenmark aus Stammzellen. Nach einer Reihe von Umordnungen der Immunglobulingene während der die Pro-B-Zellen zu Prä-B-Zellen differenzieren, wird zuerst IgM auf der Zelloberfläche unreifer B-Zellen exprimiert. Dieses Zelloberflächenimmunglobulin oder sIg (membranständiges Immunglobulin) wird als Antigenrezeptor der B-Zelle oder auch B-Zell-Rezeptor (BCR) bezeichnet. Unreife B-Zellen, die körpereigene Antigene erkennen, werden klonal deletiert, und nur die IgM⁺/IgD⁺-B-Zellen können das Knochenmark verlassen und durch Milz und Lymphknoten zirkulieren (Rajewsky, 1996). Treffen ihre Antigenrezeptoren dort auf Antigene, treten diese B-Zellen in eine Phase stärkerer Proliferation ein. Diesen antigenabhängigen Prozeß nennt man B-Zell-Aktivierung. Abschließend differenzieren die klonal expandierten Nachkommen naiver B-Zellen zu Plasmazellen, die Antikörper mit der Spezifität des ursprünglichen Rezeptors sezernieren.

Die Vernetzung des BCRs durch Antigene, die multiple identische Epitope enthalten, ist für die Aktivierung von Enzymen in der Zelle notwendig. Die ausgelösten biochemischen Prozesse und besonders die Initiation der Signaltransduktion werden in Absatz 1.1.2 diskutiert. Die Bindung der meisten Antigene an Oberflächenimmunglobuline führt nicht zu einer starken Aggregation des Rezeptors. T-Helferzellen, die die an MHC-Klasse-II-Moleküle der B-Zelle gebundenen Peptidfragmente eines Antigens erkennen, aktivieren diese B-Zelle. Intensive Proliferation und Differenzierung der B-Zelle, die an ein Antigen mit hoher Affinität bindet, werden durch Vernetzung ihrer Rezeptoren nach Präsentation des Antigens durch follikuläre dendritische Zellen in den Lymphknoten und der Milz induziert.

Die B-Zell-Aktivierung wird vor allem durch die Zelloberflächenmoleküle der B-Zelle CD19, CD22 und Fc γ RIIb1 reguliert (Cambier et al., 1994b; Doody et al., 1996). Der CD19-B-Zell-Corezeptorkomplex verstärkt die B-Zell-Antwort auf T-Zell-abhängige Antigene, während CD22 und Fc γ RIIb1 negative Signale vermitteln: CD22 beschränkt die B-Zell-Antwort auf die T-Zell-Regionen der sekundären lymphatischen Gewebe und Fc γ RIIb1 reguliert negativ die Immunantwort auf die Antigene, für die Antikörper bereits vorhanden sind. Der Absatz 1.1.3 behandelt die Rückkopplung nach Fc γ RIIb1-Coquervernetzung mit dem BCR im Detail.

1.1.1 Die Antigenrezeptoren der B-Zelle und Fc-Rezeptoren

Der Unterschied zwischen den membranständigen und sezernierten Immunglobulinformen ergibt sich aus der unterschiedlichen Weiterverarbeitung der RNA der schweren Ketten (oder H-Ketten). Im Verlauf der B-Zell-Entwicklung exprimieren die Zellen membranständige IgM, IgD oder/und IgG, die als Antigenrezeptoren fungieren.

Der in Abb. 1 gezeigte BCR ist ein Komplex aus mehreren Proteinketten und gehört wie der T-Zell-Rezeptor (TCR), Fc ϵ RI, Fc γ RI und Fc γ RIII zur Familie der MIRR (*Mutisubunit Immune Recognition Receptor*) (Keegan et al., 1992). Diese Familie zeichnet sich dadurch aus, daß die Aufgabe der Ligandenbindung und der Signalübermittlung von unterschiedlichen über ihre Transmembranbereiche assoziierten Polypeptidketten wahrgenommen wird. Die Transmembranform von IgM hat nur einen kurzen cytoplasmatischen Schwanz. Zwei glykosylierte Ketten, das von CD79a/mb-1-Gen kodierte 34 kDa Ig α -Protein (Sakaguchi et al., 1988) und das CD79b/B29 kodierte 39 kDa Ig β -Protein (Hermanson et al., 1988), bilden Heterodimere, die nicht-kovalent mit der hydrophoben Transmembrandomäne des Immunglobulinmoleküls assoziieren, und dienen als Signaltransduktionsketten des BCRs (Reth, 1992; Neuberger et al., 1993; Pleiman et al., 1994a; Gold et al., 1994). Durch alternatives Spleißen der H-Ketten-Transkripte entstehen IgD und später IgG an der Zelloberfläche der B-Zelle. Durch funktionelle Studien wurde nachgewiesen, daß diese ebenfalls mit Ig α /Ig β -Heterodimeren assoziieren (Williams et al., 1993; Weiser et al., 1994). Experimente haben gezeigt, daß die Ig α - und Ig β -Ketten nicht nur eine kritische Rolle in der intrazellulären Signalübertragung nach der

Antigenbindung spielen, sondern auch für den Transport der Transmembranimmunglobuline zur Zelloberfläche erforderlich sind (DeFranco, 1993). Außerdem sind $Ig\alpha/Ig\beta$ für die B-Zell-Entwicklung wichtig und werden sogar im Pro-B-Zellen Stadium vor den slg schweren Ketten exprimiert (Gong et al., 1996).

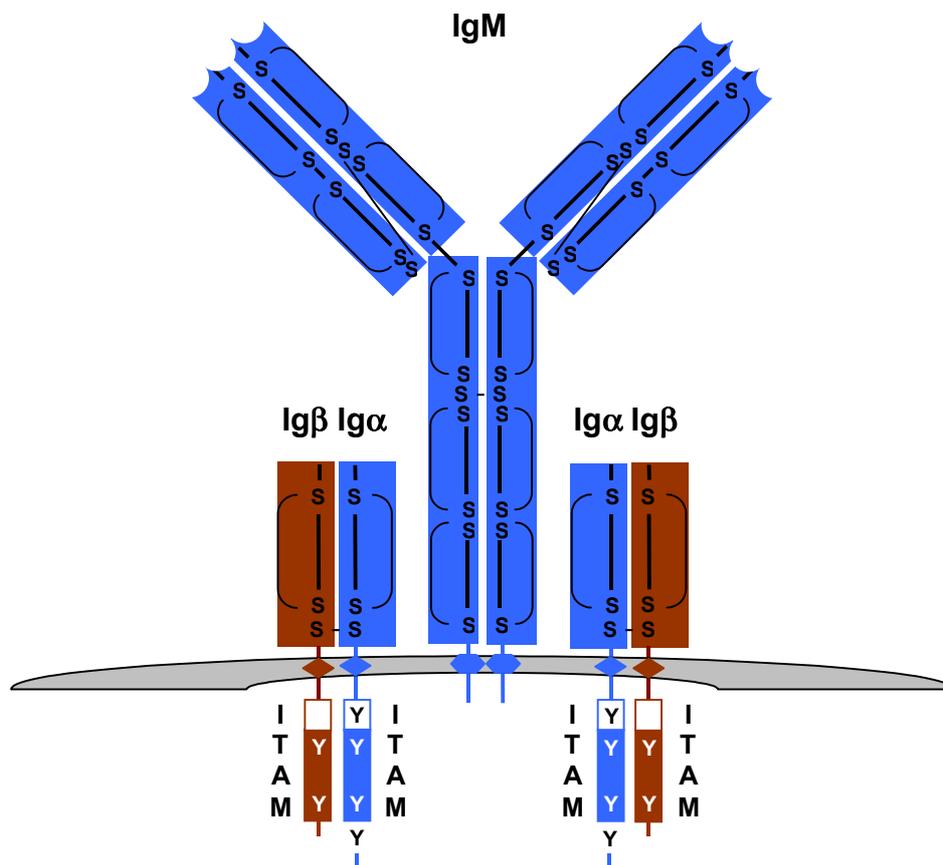


Abb. 1 Strukturmodell eines BCR-Komplexes. Der Antigenrezeptor der B-Zelle, BCR, besteht aus ligandenbindenden Transmembranimmunglobulinen (IgM, IgD und IgG), die nicht-kovalent mit den signalvermittelnden Heterodimere $Ig\alpha/Ig\beta$ assoziiert sind. Die glykosylierten Immunglobulindomäne in den extrazellulären Bereichen des Rezeptors sind als Disulfid-verbrückte Schlaufen dargestellt. Die ITAM und besonders die Tyrosinreste der cytoplasmatischen Teile von $Ig\alpha$ (61 AS) und $Ig\beta$ (48 AS) sind hervorgehoben.

Sowohl $Ig\alpha$ als auch $Ig\beta$, die auch zur Ig-Superfamilie gehören, besitzen im cytoplasmatischen Teil ein 26-Aminosäuren langes Motiv mit der Konsensussequenz: D/E-x₂-Y-x₂-L-x₇₋₁₂-Y-x₂-L/I. Dieses sog. ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*), das man in zahlreichen signalvermittelnden Ketten und manche viralen Membranproteinen findet (Tab. 1), wurde erstmals von M. Reth (1989) beschrieben. Eine Fülle von Studien hat gezeigt, daß das ITAM eine zentrale Rolle in der Signalweiterleitung spielt. Besonders die beiden Tyrosinreste sind

essentiell, da sie nach der Aktivierung Bindungsstellen für Effektorproteine darstellen (Cambier et al., 1994a; Reth, 1995; Cambier, 1995). Punktmutationen der ITAM-Tyrosine von Ig α -Kette oder CD8-Chimärrezeptoren mit den cytoplasmatischen Teilen von Ig α bzw. Ig β (Flaswinkel et al., 1994; Sanchez et al., 1993; Law et al., 1993; Taddie et al., 1994; Kim et al., 1993; Choquet et al., 1994) haben gezeigt, daß diese für die BCR-Signalübermittlung erforderlich sind.

Tab. 1 ITAM verschiedener signalvermittelnder Ketten im Sequenzvergleich. Konservierte Aminosäuren sind eingerahmt.

Konsensus	D	x	x	Y	x	x	L	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	Y	x	x	L
	E						I																I
m/Ig α	E	N	L	Y	E	G	L	N	L	D	D	C	S	M	Y	E	D	I
m/Ig β	D	H	T	Y	E	G	L	N	I	D	Q	T	A	T	Y	E	D	I
mTCR- ζ/η a	N	Q	L	Y	N	E	L	N	L	G	R	R	E	E	Y	D	V	L
mTCR- ζ/η b	E	G	V	Y	N	A	L	Q	K	D	K	M	A	E	A	Y	S	E	I
mTCR- ζ c	D	G	L	Y	Q	G	L	S	T	A	T	K	D	T	Y	D	A	L
mTCR- η c	D	G	L	Y	D	S	H	F	Q	A	V	Q	F	.	.	.	G	N	R	R	E	R	E
mCD3- γ	E	Q	L	Y	Q	P	L	K	D	R	E	Y	D	Q	Y	S	H	L
mCD3- δ	E	Q	L	Y	Q	P	L	R	D	R	E	D	T	Q	Y	S	R	L
mCD3- ϵ	N	P	D	Y	E	P	I	R	K	G	Q	R	D	L	Y	S	G	L
mFc ϵ RI- γ	D	A	V	Y	T	G	L	N	T	R	N	Q	E	T	Y	E	T	L
mFc ϵ RI- β	D	R	L	Y	E	E	L	N	H	V	Y	S	P	I	Y	S	E	L
hFc γ RIIa	D	G	G	Y	M	T	L	N	P	R	A	P	T	D	D	D	K	N	I	Y	L	T	L

Auch viele membranständige Fc-Rezeptoren besitzen mindestens ein ITAM im cytoplasmatischen Teil. Den hochaffinen Fc ϵ RI findet man auf Mastzellen und basophilen Granulocyten. Die Verknüpfung mehrerer Fc ϵ RI durch die Bindung von Antigen an IgE-Monomere kann die Degranulation und Aktivierung der Mastzellen auslösen. Basierend auf Unterschieden in der relativen Molmasse, Ligandenbindung, cDNA-Sequenz und Antikörperreaktivität werden Fc-Rezeptoren für IgG-Molekülen in drei Klassen eingeteilt: Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) und Fc γ RIII (CD16) (Ravetch et al., 1986; van de Winkel et al., 1993). Die meisten binden IgG nur in aggregierter Form. Man findet sie auf Phagocyten, B-Zellen, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen)

und folliculären dendritischen Zellen. Als Bindeglied zwischen Antikörperbindung und den akzessorischen Effektorzellen, die selbst keine spezifische Antigenerkennung vermitteln, spielen Fc γ -Rezeptoren eine Schlüsselrolle bei der humoralen Immunität.

Die Fähigkeit von Fc γ RIIb1, die BCR-vermittelte B-Zell-Aktivierung bei Coquervernetzung von BCR und Fc γ RIIb1 zu inhibieren, ist abhängig von einem cytoplasmatischen Sequenzabschnitt von 13 AS (Amigorena et al., 1992). Dieses Motiv, mit der Konsensussequenz T/S-I/V-x-Y-x-x-L, wird wegen der besonderen Bedeutung ihres Tyrosinrestes in Anlehnung an das ITAM als ITIM (*Immunorezeptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*) bezeichnet (D'Ambrosio et al., 1995; Thomas, 1995). Viele Transmembranproteine, die ebenfalls an der Auslösung von inhibitorischen Signalkaskaden beteiligt sind, enthalten ähnliche Sequenzmotive (Tab. 2). Dazu gehören das B-Zell-spezifische Glykoprotein CD22 (Lankester et al., 1995), KIR (*Killer cell Inhibitory Receptor*) (Olcese et al., 1996), gp49B1 (Castells et al., 1994), Erythropoietin-Rezeptor (EPO-R) (Klingmüller et al., 1995), c-Kit-Rezeptor (Stone et al., 1994), IL-2-Rezeptor und IL-3-Rezeptor (Yi et al., 1993).

Tab. 1 ITIM verschiedener Rezeptoren im Sequenzvergleich. Konservierte Aminosäuren sind eingerahmt.

Konsensus	T	V	x	Y	x	x	L
mFc γ RIIB	T	I	I	Y	S	L	L
hFc γ RIIb	T	I	T	Y	S	L	L
mCD22 780	T	V	S	Y	A	I	L
mCD22 840	S	I	H	Y	S	E	L
mCD22 859	D	V	D	Y	V	T	L
mEPO-R	H	L	K	Y	L	Y	L
hIL-2 β R	S	Q	V	Y	F	T	Y
hIL-3 β R	S	L	E	Y	L	C	L

Während ihrer Entwicklung und Differenzierung von Prä-B-Zellen zu Antikörpersezernierenden Plasmazellen exprimieren humane B-Zellen bis zu vier verschiedene Isoformen der Klasse II Fc γ -Rezeptoren (Brooks et al., 1989). Davon gibt es außer den ITAM-tragenden Fc γ RIIa und Fc γ RIIc durch differentielles Spleißen zwei ITIM-tragende Fc γ RIIb-Isoformen, während bei der Maus nur die Fc γ RIIb1-Form (oder

Fc γ RIIB) als Protein nachgewiesen wurde. Der Fc γ RIIB2-Form fehlt nur eine 19 AS Insertion in der cytoplasmatischen Region am N-Terminus vor dem konservierten ITIM im Vergleich zu Fc γ RIIB1. Diese führt zu einer unterschiedlichen physiologischen Funktion, der rezeptorvermittelter Endocytose der Antigen:Antikörper-Komplexe (van den Herik-Oudijk et al., 1994; Budde et al., 1994b). Die Struktur humaner Fc γ RIIB ist in Abb. 2 dargestellt.

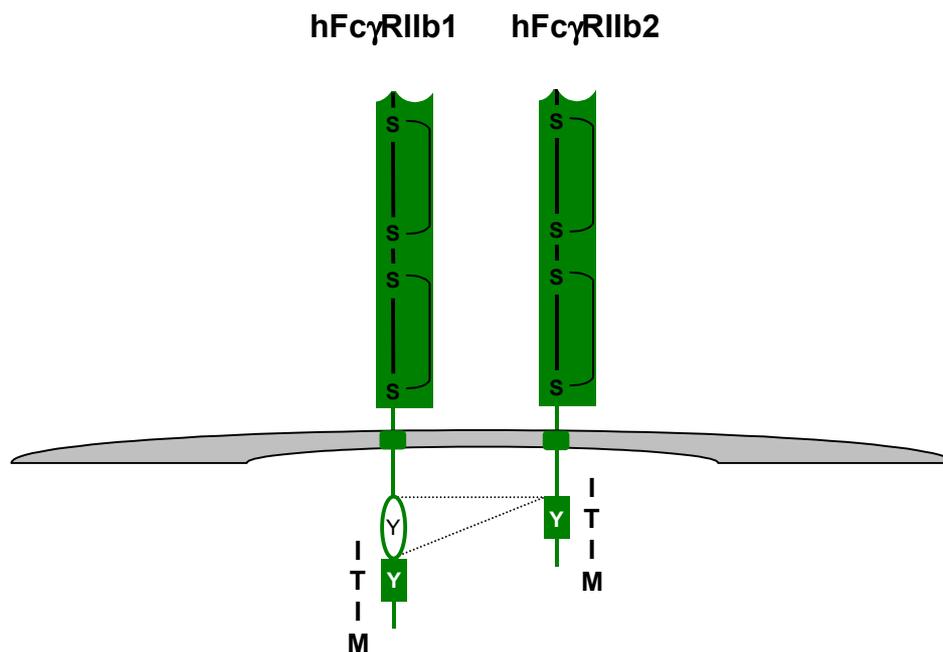


Abb. 2 Schematische Darstellung der humanen Fc γ RIIB. Beide Rezeptoren besitzen zwei glykosylierte extrazelluläre immunglobulinähnliche Domänen, die durch Disulfidbrücken stabilisiert sind. In den cytoplasmatischen Teile sind die signalübermittelnden ITIM und die Tyrosinreste hervorgehoben. Die Insertion, die die Schwänze von Fc γ RIIB1 (62 AS) und Fc γ RIIB2 (43 AS) unterscheidet, ist kenntlich gemacht worden.

1.1.2 BCR-induzierte Aktivierung über ITAM-tragende Ig α - und Ig β -Ketten

Experimentell werden B-Zellen durch Vernetzung die Oberflächenimmunglobuline durch F(ab')₂ Fragmente polyklonaler Anti-Immunglobulin-Antikörper stimuliert. Dadurch aggregieren nur die Antigenrezeptoren und nicht die Fc-Rezeptoren.

Aktivierung der Tyrosinkinassen

Werden die Rezeptoren vernetzt, so werden zuerst die mit dem BCR-Komplex assoziierten Proteintyrosinkinassen (PTK) aktiviert (Campbell et al, 1990; Sefton et al., 19991), die die spezifischen Substrate, einschließlich der Tyrosinreste der ITAM von

Ig α und bis zu geringerem Grad von Ig β , phosphorylieren (Gold et al., 1991). Eine hochaffine Bindung an die phosphorylierten ITAM (pITAM) erfolgt von verschiedenen SH2- (*Src homology 2*) Domänen der Tyrosinkinase und anschließend eine weitere Aktivierung dieser Tyrosinkinase (Clark et al., 1994; Burg et al., 1994; Wienands et al., 1995; Torres et al., 1996). Über pITAM verbindet der BCR auch eine Reihe von Adapterproteinen, Enzymen und Komponenten des Cytoskeletts. Durch die induzierte Tyrosinphosphorylierung werden viele Signalkaskaden initiiert.

Biochemische und genetische Experimente haben gezeigt, daß intrazelluläre Tyrosinkinase mehrerer Familien an der BCR-Signaltransduktion beteiligt sind, vor allem die Tyrosinkinase der Src-Familie Lyn, Fyn, Blk und Lck (Yamanashi et al., 1991; Burkhardt et al., 1991; Lin et al., 1992; Campbell et al., 1992; Yamanashi et al., 1992; Burg et al., 1994) und die Tyrosinkinase Syk der Syk/ZAP-70-Familie (Hutchcroft et al., 1992; Kurosaki et al., 1994). Der zeitliche Verlauf der Tyrosinphosphorylierung zeigt, daß die Aktivität der Src-ähnlichen Tyrosinkinase innerhalb weniger Sekunden nach Stimulierung der Zelle zunimmt (Saouaf et al., 1994) und wahrscheinlich für die Regulation der Syk-Aktivität verantwortlich ist (Kurosaki et al., 1994; Takata et al., 1994). Durch die Phosphorylierung einer Reihe von Substraten einschließlich der ITAM von Ig α und Ig β (Yamanashi et al., 1993; Baumann et al., 1994) spielen Tyrosinkinase der Src-Familie eine wichtige Rolle, die für die B-Zell-Aktivierung erforderlichen Signalen weiterzuleiten und zu amplifizieren (Takata et al., 1994; Takata et al., 1995; Nishizumi et al., 1995; Hibbs et al., 1995), während Syk über seine Tandem-SH2-Domäne die pITAM von Ig α und Ig β und phosphorylierte Formen von CD22 bindet (Wienands et al., 1995). Syk phosphoryliert spezifisch Phospholipase C- γ (PLC- γ) und steuert den Calciumsignalweg in B-Zellen (Takata et al., 1994; Kurosaki et al., 1995; Sillman et al., 1995; Law et al., 1996a).

Die in B-Zellen vorherrschende Tyrosinkinase der Tec-Familie "*Bruton's tyrosine kinase*" (Btk), die nach BCR-Vernetzung von Src-ähnlichen Tyrosinkinase aktiviert wird (Mahajan et al., 1995; Rawlings et al., 1996), ist auch durch Phosphorylierung von PLC- γ an der Regulation der intrazellulären Calciumspiegel beteiligt (Takata et al., 1996; Fluckiger et al., 1998). Neue Untersuchungen zeigten, daß die Btk-

Aktivierung von der Phosphatidyl-Inositol-3'-Kinase (PI3-K) abhängig ist. Nach der Rekrutierung durch tyrosinphosphoryliertes CD19 (Tuveson et al., 1993; Weng et al., 1994) assoziiert die PI3-Kinase über die SH3-Domänen an Lyn und Fyn. Dies führt zu einer Aktivierung des Enzyms und anschließender Akkumulation von Phosphatidyl-Inositol-3-phosphat (PI-3-P), Phosphatidyl-Inositol-3,4-bisphosphat (PI-3,4-P₂) und Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-Trisphosphat (PI-3,4,5-P₃). Dadurch werden viele wichtige signalvermittelnde Proteine, wie Btk (Salim et al., 1996; Rameh et al., 1997) und die Serin/Threonin-Kinase Akt/PKB (Boudewijn et al., 1995), über ihre PH- (*Pleckstrin Homology*) Domäne an die Plasmamembran rekrutiert. Davon ist PI-3,4,5-P₃, das auch an die SH2-Domänen der PI3-Kinase binden kann (Rameh et al., 1995), das häufigste Produkt und für den langanhaltenden Calciumionenanstieg erforderlich (Scharenberg et al., 1998a). Die hochaffine Bindung von Btk an PI-3,4,5-P₃ bewirkt, daß es zu plasmamembranverankerten Tyrosinkinasen wie z. B. Lyn gebracht und aktiviert wird (Scharenberg et al., 1998a). Dadurch konnte aufgeklärt werden, warum Mutationen in der Btk PH-Domäne allein nicht ausreichend sind, um die BCR-vermittelten positiven Wachstumssignale zu unterbrechen (Conley et al., 1995; Rawlings et al., 1995).

In aktivierten B-Zellen werden Src-ähnliche Tyrosinkinasen und Syk durch hintereinander stattfindende Wechselwirkungen mit den pTAM von Igα/Igβ, Transphosphorylierung/Autophosphorylierung und Rekrutierung zu den Substraten aktiviert (DeFranco 1995; Rowley et al., 1995; Kurosaki et al., 1995). Die katalytische Aktivität der Src-ähnlichen Tyrosinkinasen wird häufig durch einen C-terminalen Tyrosinrest kontrolliert. Phosphorylierung dieses Tyrosinrestes von Csk (*C-terminal Src kinase*) inhibiert diese Kinasen (Thomas et al., 1991; Cooper et al., 1993). Eine in B-Zellen exprimierte Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTP) CD45 (B220) kann den C-terminalen regulatorischen Tyrosinrest der Src-Familie dephosphorylieren (Mustelin et al., 1993; Justment et al., 1994), und damit die Aktivierung dieser Kinasen verstärken. Während CD45-Knockout-Mäuse eine normale Anzahl peripherer B-Zellen besitzen, wird der IgM-Vernetzung-induzierte Einbau von Thymidin komplett aufgehoben (Kishihara et al., 1993; Benatar et al., 1996). Dies bedeutet, daß CD45 die Signalübertragung durch den BCR fördert.

Untersuchungen von Clark et al. (1994) und Pleiman et al. (1994b) demonstrierten, daß die Tyrosinkinasen der Src-Familie Fyn, Lyn und Lck, aber nicht Src, über ihre erste 10 N-terminalen Aminosäuren mit dem nicht-phosphorylierten ITAM von Ig α assoziieren können. Die Lyn-negative Mutante der Hühner B-Zelllinie DT40, in der Lyn als die einzige Tyrosinkinase der Src-Familie exprimiert wird, zeigte trotz Signaltransduktionsdefekt detektierbare BCR-induzierte Phosphorylierung von Substraten der Tyrosinkinasen (Takata et al., 1994). Auch in Csk-negativen DT40-Zellen, in denen Lyn und Syk hyperaktiv sind, führt die Rezeptorvernetzung zu zunehmender Proteintyrosinphosphorylierung und erhöhter intrazellulärer Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) (Hata et al., 1994). Nach einem " *Transducer Complex*" Modell der Initiation der BCR-Signaltransduktion (Reth et al., 1997) koppeln die BCRs in ruhenden B-Zellen über die cytoplasmatischen Teile der Ig α /Ig β -Heterodimere an einen bis jetzt unbekanntem *Transducer*, der selber eine Tyrosinkinase oder ein kinaseregulierendes Element ist (Wienands et al., 1996). Diese Bindung könnte einerseits die Aktivität dieses Elements unterdrücken andererseits eine unkontrollierbare Phosphorylierung des ITAMs vermeiden. Die Rezeptorvernetzung führt zur Freisetzung und Aktivierung des *Transducers*, der anschließend durch Aktivierung weiterer Tyrosinkinasen die ungeschützten Tyrosinreste des ITAMs phosphoryliert. Diese Reaktion des BCRs wird durch Dephosphorylierung des pITAMs durch tyrosinspezifische Phosphatasen und erneuerte Bindung an den *Transducer* beendet. Das Modell des BCR:Transducer-Komplexes wird durch Experimente mit dem Phosphataseinhibitor Pervanadat/H₂O₂ unterstützt (Wienands et al., 1996). Die Pervanadat/H₂O₂-induzierte Phosphorylierung der meisten Substrate von Tyrosinkinasen findet in BCR-transfizierten J558L-Zellen statt, aber nicht in BCR-negativen Kontrollzellen, in denen die signalübermittelnden Elemente nicht durch den BCR:*Transducer*-Komplex organisiert sind. Diese Organisation wird wahrscheinlich durch Detegenzien zerstört, so daß bis jetzt noch kein *Transducer* mit dem BCR zusammen isoliert wurde.

Aktivierung von Signalkaskaden ins Zellinnere

Die Quervernetzung des BCRs führt sehr schnell zur Bildung von Inositol-3,4,5-Trisphosphat (I-3,4,5-P₃) und Diacylglycerin (DAG). Die Phospholipase-Isoform PLC-

$\gamma 2$, die durch Syk und Btk (Takata et al., 1996) phosphoryliert und aktiviert wird, ist für die Spaltung von Phosphatidyl-Inositol-4,5-bisphosphat (PI-4,5-P₂) in die beiden "second messenger" in B-Zellen verantwortlich. Die Bindung von I-3,4,5-P₃ an den I-3,4,5-P₃-Rezeptor im Endoplasmatischen Retikulum (ER) induziert die Calciumfreisetzung aus den internen Speichern. Der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration triggert dann das Öffnen von Calciumkanälen der sog. SOC Familie (*Store Operated Calcium channel*) in der Plasmamembran (Patterson et al., 1999). Der dadurch bis zu mehrere Stunden erhöhte intrazelluläre Calciumspiegel ist eine der Voraussetzungen für die Modifikationen sowohl der mit der B-Zell-Aktivierung einhergehenden als auch für die normale B-Zell-Entwicklung notwendigen Genexpression (Cheng et al., 1995; Berridge et al., 1998).

Die stromabwärts Aktivierung der Serin/Threonin-Kinasen, einschließlich verschiedener Isoformen der Proteinkinase C (PKC) durch DAG und weitere Proteinphosphorylierungen, die der Aktivierung der rezeptorassoziierten Tyrosinkinase folgen, stellen in B-Zellen die Verbindung zwischen der Antigenbindung an BCR und der Regulation spezifischer Gentranskription her. Die Ras/Raf/MAPK-Kaskade ist für die Wachstums- und Differenzierungsvorgänge von besonderer Bedeutung. p21Ras gehört zu den monomeren GTPasen der sog. Ras-Superfamilie, die Signale von Rezeptor-Tyrosinkinase, von Rezeptoren mit assoziierter Tyrosinkinase und von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren empfangen und ins Zellinnere weiterleiten können. Nach der Aktivierung schaltet Ras eine assoziierte serin/threoninspezifische Kinase Raf-1 an. Dadurch aufeinander folgende Phosphorylierungsschritte wird zunächst MEK (MAPK/Erk-Kinase), dann die MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) und schließlich p90^{Rsk} sowie p70^{S6k} (*ribosomal S6 kinase*) aktiviert. Diese phosphorylieren intrazelluläre Proteine einschließlich Transkriptionsfaktoren wie z. B. c-myc, die an der Genregulation beteiligt sind (Denhardt, 1996). Eine zweite GTPase-Familie, Rho/Rac/Cdc42, ist an der Umordnung des Aktin-Cytoskeletts beteiligt. Der essentiellen Regulator für diese GTPasen, das GEF-Molekül (*Guanine nucleotide Exchange Factor*) p^{95Vav}, ist nach der BCR-Vernetzung phosphoryliert (Matin et al., 1999). Dies führt zur Aktivierung der JNK- (*c-Jun NH2-terminal Kinase*), der Erk- (*Extracellular signal-regulated protein kinase*) und der p38-vermittelten Signalkaskaden. Die Tyrosinphosphorylierung von

HS1 (*Hematopoietic-lineage Specific protein 1*) durch Syk und Src-ähnliche Tyrosinkinassen (Ruzzene et al., 1996) kann ein Apoptosesignal liefern. Die PI3-Kinase- und Syk-abhängige Rekrutierung und Aktivierung der Akt/PKB (Li et al., 1999) ist dagegen für das weitere Überleben notwendig (Yang et al., 1995; White, 1996).

Rekrutierung von Adapterproteinen

Adapterproteine, die keine katalytische Aktivität zeigen aber eine oder mehrere Protein-Protein-Wechselwirkungsdomäne(n) wie SH2-, SH3-, PTB- (*Phosphotyrosine Binding*), PH-Domäne (Pawson, 1995) sowie Tyrosinreste besitzen, spielen eine wesentliche Rolle für die Verbindung von BCR-aktivierten Tyrosinkinassen mit Enzymen, die für B-Zell-Antworten wichtig sind. Durch aktivierende BCR-Komplexe werden eine Reihe von diesen signalvermittelnden Proteinen rekrutiert, was zur Induktion mehrere Signalkaskaden führt.

Die SH2-Domänen des allgegenwärtigen Adapterproteins Shc (*Src homologous and collagen*) können direkt an die pTAM des aktivierten BCRs binden (Baumann et al., 1994). Phosphorylierung von Shc durch Lyn und Syk (Nagai et al., 1995) führt zur Rekrutierung einer SH2-Domäne des zweiten Adapterproteins Grb2 (Smit et al., 1994; Saxton et al., 1994), das mittels SH3-Domänen an ein GEF-Molekül Sos bindet. Auf diese Weise kann ursprünglich cytosolischvorliegendes Sos mit dem GTP-bindenden Protein Ras assoziieren und durch Austausch von GDP gegen GTP in seine aktive Form überführen (Denhardt, 1996), wodurch der Ras/Raf/MAPK-Weg aktiviert wird (Rozakis-Adcock et al., 1992; Lewis et al., 1998). Ein wichtiges Shc-assoziiertes Protein, *SH2-domain containing Inositol polyphosphate 5'-Phosphatase* (SHIP), wird im Absatz 1.2 näher diskutiert.

Das B-Zell-spezifische Adapterprotein BLNK (*B-cell Linker protein*), oder BASH (*B cell Adapter containing Src Homology 2 domain*), wurde kürzlich als ein zentraler Bestandteil in der B-Zell-Aktivierung identifiziert und ist für die B-Zell-Entwicklung erforderlich (Pappu et al., 1999; Minegishi et al., 1999). Aufgrund seiner Homologie zu dem T-Zell-spezifischen Adapter SLP-76 (*Src Homology 2 domain-containing Leukocyte Protein*) wurde BLNK auch als SLP-65 genannt. BLNK gehört zu den ersten tyrosinphosphorylierten Proteinen in B-Zellen, die man nach BCR-Vernetzung

oder Behandlung mit dem Phosphataseinhibitor Pervanadat/H₂O₂ nachweisen kann (Wienands et al., 1998; Zhang et al., 1998). Experimente zeigten, daß BLNK nach der Phosphorylierung durch die Tyrosinkinase Syk mit vielen Enzymen stromabwärts, einschließlich PLC- γ 2, Btk, p^{95^{vav}}, sowie Adapterproteinen Grb2 und Nck, assoziiert (Fu et al., 1998; Goitsuka et al., 1998). Die essentielle Rolle von BLNK für die B-Zell-Aktivierung wurde an BLNK-negativen DT40-Zellen demonstriert. In diesen Zellen fehlen nach der IgM-Vernetzung die PLC- γ 2 Aktivierung und der Anstieg der intrazellulären Calciumspiegel, sowie die effizienten Aktivierungen der Erk-, JNK- und p38-vermittelten Signalkaskaden (Ishiai et al., 1999). Durch *in vitro* Mutagenese wurde von Takata et al. (1996) gezeigt, daß sowohl die PH- als auch die SH2-Domäne von Btk essentiell für die PLC- γ 2 Aktivierung sind. Dieses Ergebnis, zusammen mit der neuen Identifizierung von BLNK als einem Hauptliganden der SH2-Domäne von Btk (Hashimoto et al., 1999a; Su et al., 1999), legen die Vermutung nahe, daß das mit BLNK assoziierte Btk nach der BLNK-Phosphorylierung durch Syk in die Nähe von PLC- γ 2 gebracht wird. Die aktivierte Btk kann dann PLC- γ 2 phosphorylieren. Dies führt zur vollständigen Aktivierung von PLC- γ 2 (Kurosaki et al., 2000a).

Die Gab-Familie-Proteine, Gab1 und Gab2, sind kürzlich klonierte Adapterproteine, die in vielen Cytokin-, Wachstumsfaktor-, BCR- und TCR-induzierten Signalkaskaden eine Rolle spielen (Huyer et al., 1999). Abgesehen von direkten Wechselwirkungen zwischen Gab-Proteinen und Grb2, der p85 Untereinheit der PI3-Kinase und SHP-2 (PTP1D, SH-PTP2 oder Syp) in verschiedenen Signalkaskaden (Holgado-Madruga et al., 1996; Carlberg et al., 1997; Gu et al., 1998; Nishida et al., 1999) wurden Gab1/Gab2:SHIP-Komplexe in EPO-stimulierten UT-7-Zellen und in der M-CSF- (*Colony-Stimulating Factor*) stimulierten myeloiden Vorläuferzelllinie FD/fms nachgewiesen (Lecoq-Lafon et al., 1999; Rohrschneider et al., 2000).

1.1.3 Inhibition der BCR-Signaltransduktion über ITIM-tragende Fc γ RIIb1

Die Rückkopplung der BCR-Signalübermittlung durch Fc γ RIIb1 findet physiologisch bei der gleichzeitigen Bindung von Antigen:Antikörper-Komplexen an beide Rezeptoren auf B-Zellen statt (Sinclair et al., 1987). Hierdurch wird sichergestellt, daß bei einer ausreichenden Menge an Antikörpern gegen ein Antigen keine weitere

Produktion von spezifischen Antikörpern stattfindet. Was man bisher über das negative Rückkopplungssignal weiß, stammt aus *in vitro* Experimenten, bei denen die Antigenrezeptoren durch komplette Anti-Immunglobulin-Antikörper mit dem Fc γ RIIb1 coquervernetzt werden. Analysen mehrerer Labors haben gezeigt, daß diese Coquervernetzung eine negative Wirkung auf die Proliferation, Expression verschiedener Gene, Differenzierung und schließlich die Antikörperproduktion der B-Zelle hat (Phillips et al., 1983; Phillips et al., 1984; Uher et al., 1985; Phillips et al., 1987; Gottschalk et al., 1994). Es kann sogar in einigen Zelllinien zur Btk-abhängigen Apoptose dieser Zelle führen (Ashman et al., 1996; Pearse et al., 1999).

Experimente mit Maus Fc γ RIIB zeigen, daß das ITIM von Fc γ RIIb1 bzw. der Tyrosinrest essentiell für die Inhibierung des BCR-induzierten Calciumeinstroms ist (Muta et al., 1994). Coquervernetzung von BCR und Fc γ RIIB führt zur Tyrosinphosphorylierung des ITIMs, wobei die von BCR-induzierte gesamte Proteintyrosinphosphorylierung mit wenigen Ausnahmen, wie z. B. von SHIP und CD22 (Chacko et al., 1996; D'Ambrosio et al., 1996; Panofen, 1996) deutlich inhibiert wird. Als eines dieser Proteine konnte PLC- γ 2 identifiziert werden (Sarkar et al., 1996). Die Daten mit heterolog exprimierten humanen Fc γ RIIb-Isoformen aus unserem Labor zeigen ebenfalls eine schnelle und effiziente Tyrosinphosphorylierung von Fc γ RIIb1 bei Coquervernetzung mit dem BCR. Erstaunlicherweise ist die Phosphorylierung von Fc γ RIIb2 unter der selben Bedingungen nicht detektierbar, obwohl die Inhibierung des Calciumeinstroms von beiden Fc γ RIIb-Isoformen ähnlich ist (Budde et al., 1994b). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Insertion in Fc γ RIIb1 einen entscheidenden Einfluß auf die negative Funktion nimmt und es in der Fc γ RIIb1-Signalübermittlung phosphorylierungabhängige Signale geben muß.

Der Mechanismus der negativen Rückkopplung zwischen BCR und Fc γ RIIb1 ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Vor allem wird die Aktivität bestimmter Calciumkanäle in der Plasmamembran der B-Zelle durch das ITIM inhibiert, da hauptsächlich der Calciumeinstrom über Plasmamembran durch diese Coquervernetzung unterbunden ist (Choquet et al., 1993; Diegel et al., 1994). Die Tyrosinphosphorylierung des ITIMs hat außerdem einen negativen Einfluß auf die

Transkription und Genexpression. Sie könnte mit pITAM der Ig α - und Ig β -Ketten bei der Rekrutierung zahlreicher signalvermittelnder Moleküle konkurrieren. Außerdem konnten mehrere Arbeitsgruppe zeigen, daß das pITIM eine Bindungsstelle für negative Regulatoren einschließlich tyrosinspezifischer Phosphatasen darstellt, die für die schnellere Dephosphorylierung bei Coquervernetzung von BCR und Fc γ RIIb1 verantwortlich sind.

Bindung von SHP-1 (*SH2-domain containing Phosphatase 1*, auch PTP1C, SH-PTP1 oder HCP) an pITIM von Fc γ RIIB via ihrer C-terminalen SH2-Domäne wurde *in vitro* nachgewiesen (D'Ambrosio et al., 1995). Diese 68 kDa tyrosinspezifische Phosphatase besitzt zwei N-terminale SH2-Domänen, eine C-terminale Phosphatase Domäne und wird spezifisch in Epithelzellen und hämatopoetischen Zellen exprimiert. In unstimulierten Zellen liegt SHP-1 im Cytoplasma durch Selbstinhibierung der katalytischen Domäne durch die N-terminalen SH2-Domäne inaktiv vor. Für die Enzymaktivität benötigt SHP-1 sowohl Serin- als auch Tyrosinphosphorylierung. Dies ermöglicht die Bindung des Enzyms an das pITIM verschiedener Rezeptoren einschließlich Fc γ RIIB (Imboden et al., 1995; Shifrin et al., 1997; Sato et al., 1998). Viele Untersuchungen lassen klar erkennen, daß SHP-1 von phosphorylierten inhibitorischen Rezeptoren wie z.B. CD22 und KIR rekrutiert wird und in der Ras/Raf/MAPK-Signalkaskade eingreift (Burshtyn et al., 1996; Law et al., 1996b). *Motheaten (me)* und *Motheaten-viable (me^v)* Mäuse, die ein defektes Gen von SHP-1 besitzen, zeigen zahlreiche hämatopoetische Abnormitäten einschließlich das Fehlen der B2-Zellen. Dagegen wurde eine Zunahme von B1-Zellen, die hyperaktiv sind und Autoantikörper produzieren, beobachtet (Schulz et al., 1993). SHP-1 reguliert offenbar den Schwellenwert der B-Zell-Antwort auf Antigene und hat ein negativen Einfluß auf die B-Zell-Aktivierung (Cyster et al., 1995). Zur Inhibierung des BCR-induzierten Calciumeinstroms von Fc γ RIIB ist SHP-1 jedoch nicht erforderlich (Nadler et al., 1997).

Obwohl SHP-1 einerseits die Tyrosinkinase Src durch Dephosphorylierung des C-terminalen inhibitorischen Tyrosinrestes aktiviert, andererseits Syk dephosphorylieren und inaktivieren kann, wird die Aktivität beider BCR-assoziierten Tyrosinkinasen nicht durch Fc γ RIIB beeinflusst (Sarkar et al., 1996). Wird Fc γ RIIb1

mit dem BCR coquervernetzt, kann Fc γ RIIb1-assoziierte SHP-1 spezifisch die Ig α - und Ig β -Ketten dephosphorylieren und damit das Aktivierungssignal vorzeitig beenden (Daeron, 1997). Die Kinetik der Fc γ RIIb1-Phosphorylierung und -Dephosphorylierung weist darauf hin, daß Fc γ RIIb1 wahrscheinlich selbst ein Substrat von SHP-1 ist (Budde et al., 1994b). Diese Annahme wurde von dem *in vitro* Ergebnis unterstützt, daß das pTIM-Peptid von Fc γ RIIb1 nach der Inkubation mit SHP-1 dephosphoryliert wird (Pei et al., 1996).

Mehre tyrosinspezifische Phosphatasen könnten an den Fc γ RIIb1-Signalkaskaden beteiligt sein. Eine 72 kDa SHP-1-ähnliche Phosphatase SHP-2, die man in verschiedenen Geweben findet und besonders im Gehirn, Herz und Nieren hoch exprimiert wird, assoziiert *in vitro* mit dem pTIM von Fc γ RIIB (D'Ambrosio et al., 1995; Koncz et al., 1999). Dies wurde durch Plasmonresonanz-Messungen (BIAcore) nachgewiesen (Famiglietti et al., 1999). Obwohl SHP-2 an vielen positiven Signalkaskaden beteiligt ist (Tauchi et al., 1994; Bennett et al., 1994) und ihr positiver Einfluß in der BCR-Signalübermittlung durch Fc γ RIIb1 inhibiert werden konnte (Nakamura et al., 1998), wird ihre Aktivität nach Bindung an das pTIM von Fc γ RIIB erhöht und scheint für die Herunterregulierung der PI3-Kinase-Phosphorylierung verantwortlich zu sein (Koncz et al., 1999; Sarmay et al., 1999). Die SHP-2-Aktivität wird ebenfalls durch ihre N-terminale SH2-Domäne reguliert, während die C-terminale SH2-Domäne spezifisch an bestimmte phosphorylierte Tyrosinreste bindet und zur Substratspezifität beiträgt (Freeman et al., 1992; Feng et al., 1993; Vogel et al., 1993; Hof et al., 1998).

Das kürzlich klonierte Enzym SHIP, wurde als wichtiger Ligand von Fc γ RIIb1 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* identifiziert (D'Ambrosio et al., 1996; Ono et al., 1996; Ono et al., 1997; Kiener et al., 1997; Nadler et al., 1997; Tridandapani et al., 1997a). Untersuchungen mit chimären Fc γ RIIB/SHIP-Rezeptoren und B-Zellen aus SHIP^{-/-} Mäusen zeigten, daß SHIP eine wesentliche Rolle in den Fc γ RIIb1-vermittelten Signalkaskaden spielt.

1.2 Die Struktur und biologische Funktionen der SHIP-Proteine

Im Jahr 1996 und 1997 wurde eine SH2-Domäne erhaltende Inositol 5'-Phosphatase unabhängig von mehreren verschiedenen Arbeitsgruppen kloniert (Lioubin et al., 1996;

Damen et al., 1996; Kavanaugh et al., 1996; Drayer et al., 1996; Ono et al., 1996; Osborne et al., 1996; Liu et al., 1997a). Das spezifisch in hämatopoetischen und spermatogenen Zellen (Liu et al., 1998a) exprimierte Enzym p145 SHIP wurde zuerst als ein mit dem Adapterprotein p52 Shc assoziiertes Protein beschrieben, das nach Stimulationen mit verschiedenen Cytokinen und Wachstumsfaktoren sowie durch Rezeptorvernetzung in B-Zellen tyrosinphosphoryliert wird (Damen et al., 1993; Kavanaugh et al., 1994; Lioubin et al., 1994; Liu et al., 1994; Matsuguchi et al., 1994; Saxton et al., 1994; Drachman et al., 1995; Chacko et al., 1996; Crowley et al., 1996). Die cDNA für ein zweites SHIP-ähnliches Protein wurde später mit degenerierten Primern, die den hochkonservierten Motiven innerhalb der katalytischen Domänen der Inositol Polyphosphat 5'-Phosphatasen entsprachen, durch RT-PCR kloniert (Pesesse et al., 1997). Dieses sog. SHIP2 zeigt eine viel breitere Expression als SHIP und wurde auch in Blutplättchen nachgewiesen (Bruyns et al., 1999; Wisniewski et al., 1999).

1.2.1 Struktur von p145 SHIP, SHIP-Isoformen und SHIP-Homologen

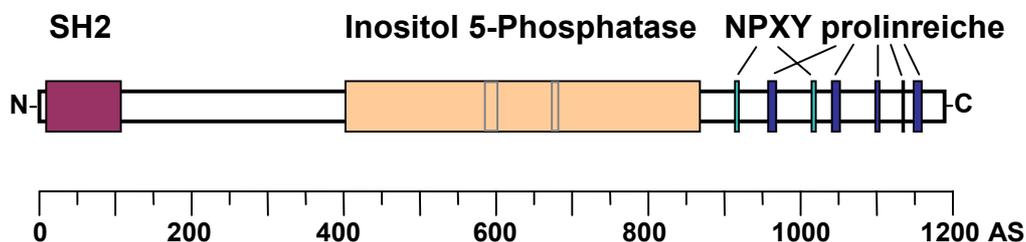


Abb. 3 Domänenstruktur von p145 SHIP. Die N-terminale SH2-Domäne, die zentrale Inositol 5'-Phosphatasedomäne mit zwei hoch konservierten Motiven, die NPXY-Sequenzen und mehrere prolinreiche Bereiche (PxxP-Motiv) am C-Terminus von p145 SHIP sind als verschiedenen Kästen dargestellt. Die Skala unter der schematischen Darstellung bezeichnet die Länge in Aminosäuren (1188 Aminosäuren beim Mensch und 1190 Aminosäuren in der Maus; 87,2% durchschnittliche Sequenzidentität auf Aminosäureebene).

Aufgrund der vorhersagten Aminosäuresequenz von p145 SHIP, auch als SHIP1 oder SHIP α bezeichnet (Rohrschneider et al., 2000), wurde eine N-terminale SH2-Domäne und eine zentrale katalytische Domäne mit zwei auch in anderen 5'-Phosphatasen hoch konservierten Motiven nachgewiesen. Weiterhin wurden zwei NPXY Sequenzen, die nach Phosphorylierung an PTB Domänen und SH2-Domänen binden können, gefunden. Am C-Terminus befinden sich mehrere prolinreiche

Bereiche (PxxP-Motiv). Die können theoretisch mit vielen SH3-Domänen-enthaltenden Proteinen assoziieren (Abb. 3).

Normalerweise können 4 unterschiedliche SHIP-Proteine von 145-, 135-, 125- und 110-kDa detektiert werden (Lioubin et al., 1996; Ono et al., 1996; Lucas et al., 1999). Die Banden der niedrigeren Molmassen enthalten mehrere Isoformen, die meistens durch *in vivo* Abspaltung des prolinreichen C-Terminus des 145-kDa Proteins (Damen et al., 1998) sowie durch unterschiedliches mRNA-Spleißen (Lucas et al., 1999; Rohrschneider et al., 2000) entstehen können. Diese Formen werden als SHIP β , SHIP γ und SHIP δ bezeichnet. Eine zusätzliche Isoform, SIP (*Signaling Inositol Phosphatase*) -110, der die SH2-Domäne fehlt, könnte durch alternatives Spleißen (Kavanaugh et al., 1996) oder durch alternative Transkriptionsinitiation (Rohrschneider et al., 2000) entstehen. Abgesehen von der vorherrschenden 5-kb mRNA wurden tatsächlich 6-kb, 4,5-kb und kleinere mRNA-Formen gefunden. Interessanterweise ändern sich die relativen Verhältnisse verschiedener SHIP-Isoformen während der hämatopoetischen Entwicklung, Differenzierung und Leukämiegenese. Dies weist auf verschiedene Funktionen jeder Form hin (Geier et al., 1997; Lucas et al., 1999; Sattler et al., 1999). Nach Expression der cDNA von p145 SHIP assoziiert z. B. nur das kleinste Protein (p110) mit dem Cytoskelett (Damen et al., 1998), und hat daher offenbar eine unterschiedliche Rolle in der Signaltransduktion.

Die relative Molmasse von SHIP2 ist leicht größer (1258 Aminosäuren beim Mensch, 155 kDa) als die von SHIP1. SHIP2 hat die selbe Gesamtstruktur wie SHIP1, allerdings wurde am C-Terminus nur eine NPXY-Domäne gefunden. Die durchschnittliche Sequenzidentität ist ca. 40% auf Aminosäureebene, wobei die katalytische Domäne (64% Identität) stärker konserviert ist als die SH2-Domäne (54%). Auch für SHIP2 wurden kleinere Isoformen beschrieben (Pesesse et al., 1997; Habib et al., 1998). Eine tyrosinphosphorylierte Isoform ohne die SH2-Domäne, 51C, bindet spezifisch an die PTB-Domäne von Shc (Hejna et al., 1995; Lioubin et al., 1996).

Abgesehen von der strukturellen Ähnlichkeit von SHIP und SHIP2 gibt es wichtige Unterschiede hinsichtlich bei der gewebespezifischen Expression und Substratspezifität (1.2.2) dieser beiden homologen Inositol 5'-Phosphatasen.

1.2.2 Enzymaktivität von SHIP und ihre Assoziation mit anderen Proteinen

Im Gegensatz zu den meisten Inositol 5'-Phosphatasen hydrolysieren SHIP- und SHIP2-Proteine, mit Ausnahme von SIP110 (Wisniewski et al., 1999), beide *in vitro* und *in vivo* spezifisch Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PI-3,4,5-P₃). *In vitro* wurde die Dephosphorylierung von löslichem Inositol-1,3,4,5-Tetrakisphosphat (I-1,3,4,5-P₄) durch SHIP gezeigt (Damen et al., 1996; Lioubin et al., 1996; Drayer et al., 1996; Pesesse et al., 1998). Viele *in vivo* Untersuchungen konnten zeigen, daß PI-3,4,5-P₃ zu PI-3,4-P₂ hauptsächlich von SHIP abgebaut wird (Giuriato et al., 1997; Scharenberg, et al., 1998b; Liu et al., 1999). Hierdurch wird z. B. in Mastzellen die Degranulation nach der *steel factor* Stimulation verhindert (Huber et al., 1998a; Huber et al., 1998b).

Da die Phosphataseaktivität von SHIP nach Stimulationen der Zellen mit verschiedenen Cytokinen und Wachstumsfaktoren kaum verändert wird, kommt der Rekrutierung von SHIP zur Plasmamembran bzw. zu Cholesterin-haltigen Mikrodomänen (sogenannten *lipid rafts*) durch Phosphorylierung und Wechselwirkungen mit verschiedenen Proteinen z. B. Adapterproteinen eine Schlüsselfunktion zu (Krystal et al., 1999; Rohrschneider et al., 2000; Retire et al., 2000). So führt die Expression der isolierten katalytischen Domänen von SHIP weder zu einer ausreichenden Herunterregulierung der Erythrocyten-Differenzierung in K562-Zellen noch zu der Fc γ RIIb1/SHIP-abhängigen Inhibition der B-Zellen (Bolland et al., 1998; Siegel et al., 1999; Aman et al., 2000). Wird dagegen die cytoplasmatische Domäne von Fc γ RIIB durch SHIP in einem Fc γ RIIB/SHIP-Chimärrezeptor ersetzt, kann dann durch diese Membranlokalisation die Inhibition wiederhergestellt werden. Die Expression verschiedener SHIP-Isoformen, die im C-terminale Bereich deletiert oder modifiziert werden, konnte in dem Fall die Funktion von SHIP modulieren.

Obwohl alle SHIP-Isoformen nach Cytokinstimulation an einem oder beiden NPXY-Motiven phosphoryliert werden, bindet nur die 145-kDa und etwas schlechter die

135-kDa Form *in vivo* an die PTB-Domäne von Shc (Lamkin et al., 1997; Krystal et al., 1999). Außerdem zeigten *in vitro* Analysen, daß tyrosinphosphoryliertes Shc direkt an die SH2-Domäne von SHIP binden kann (Liu et al., 1997b; Pradhan et al., 1997; Tridandapani et al., 1999). Damen et al. (1996) vermuteten, daß die prolinreichen Motive am C-Terminus von SHIP und auch die nicht-phosphorylierte Form SIP-110 (Kavanaugh et al., 1996) mit der SH3-Domäne von Grb2 assoziieren. Neue Untersuchungen an einer Grb2-negativen Zelllinie konnten zeigen, daß SHIP an ein Heterodimer aus Shc und Grb2 bindet (Harmer et al., 1999). Eine Shc-negative DT40-Zelllinie zeigte trotzdem eine normale Fc γ RIIb1-vermittelte Inhibition des Calciumeinstroms (Aman et al., 2000). Dies bedeutet, daß die Shc:Grb2:SHIP-Assoziation für die Hemmung des Calciumionenanstiegs nicht notwendig ist, sondern wahrscheinlich mit dem Shc:Grb2:Sos-Komplex konkurriert und somit einen negativen Einfluß von SHIP auf die Ras/Raf/MAPK-Kaskade ausübt (Tridandapani et al., 1998; Ingham et al., 1999). In nicht-hämatopoetischen Zellen hat SHIP2 wahrscheinlich dieselbe Funktion, da dieses Protein nach Stimulationen mit verschiedenen Wachstumsfaktoren auch tyrosinphosphoryliert wird und mit Shc assoziiert (Pesesse et al., 1998).

Wechselwirkungen von SHIP mit weiteren Adapterproteinen wurden inzwischen identifiziert. Dazu gehören das RasGAP-Bindungsprotein p62^{dok} und dessen Homolog Dok-3, die in aktivierten B-Zellen phosphoryliert werden. Während phosphoryliertes Dok-3 nach Überexpression durch Rekrutierung von SHIP und Csk die BCR Signalkaskade inhibiert (Lemay et al., 2000), wird p62^{dok} durch die Bindung an phosphoryliertes SHIP in den Fc γ RIIb1-vermittelten negativen Signalkaskaden eingebracht. Durch die Bindung von Dok-Proteinen an RasGAP wird die GTPase-Aktivität von Ras reduziert, jedoch wird der Calciumionenanstieg nicht beeinflusst (Tamir et al., 2000). Untersuchungen mit SHIP- und dok-Knockout-Mäusen konnten auch zeigen, daß sowohl SHIP als auch p62^{dok} für die Fc γ RIIb1-vermittelte Inhibierung der BCR-induzierten Erk Aktivierung essentiell sind (Liu et al., 1998b; Yamanashi et al., 2000).

Ein *Screening* in degenerierten Phosphopeptid-Banken mit der SH2-Domäne von SHIP ergab, daß das Erkennungsmotiv dieser Domäne auch in ITAM-Sequenzen

enthalten ist (Osburne et al., 1996). Wechselwirkungen von SHIP mit Fc γ RIIa, der Fc γ RI-assoziierten γ -Kette in Monocyten (Maresco et al., 1999), der γ -Kette von Fc ϵ RI in Mastzellen und *in vitro* mit dem CD3-Komplex und der ζ -Kette des TCRs wurden bereits nachgewiesen (Osburne et al., 1996).

Die Assoziation von SHP-2 und der SHIP-SH2-Domäne nach Stimulationen mit IL-3 und dem Wachstumsfaktor EPO in Mastzellen wurde gezeigt (Liu et al., 1997c; Sattler et al., 1997), obwohl diese Wechselwirkung auch indirekt sein könnte. Als ein positiver Vermittler der Wachstumsfaktor-vermittelten Signalkaskaden (Xiao et al., 1994; Yamauchi et al., 1995) könnte SHP-2 für die beobachtete Dephosphorylierung von SHIP nach der Stimulation verantwortlich sein. In CML (*Chronic Myelogenous Leukemia*) Vorläuferzellen ist SHIP2 dauerhaft tyrosinphosphoryliert und konnte mit Shc und dem chimären Onkogen-Produkt p210^{BCR/ABL}, das Tyrosinkinaseaktivität zeigt, coimmunpräzipitiert werden (Wisniewski et al., 1999). Crowley et al. (1996) zeigten, daß in aktivierten B-Zellen tyrosinphosphoryliertes SHIP mit Syk assoziiert vorliegt, aber die Funktion dieser Assoziation unklar ist. In der Fc γ RIIb1-vermittelten negativen Signalkaskaden haben trotz stärkerer Phosphorylierung von SHIP bis jetzt weder SHIP:SHP2- noch SHIP:Syk-Interaktionen nachgewiesen werden können.

Ein Erkennungsmotiv für die beiden SH2-Domänen der 85-kDa regulatorischen Untereinheit der PI3-Kinase (Felder et al., 1993; Songyang et al., 1993) wurde am C-Terminus von SHIP neben dem ersten NPXY-Motiv gefunden. Experimente mit der an GST fusionierten p85-SH2-Domäne zeigten, daß diese nur an das phosphorylierte volle Länge SHIP bindet (Gupta et al., 1999; Lucas et al., 1999). Die Assoziation der PI3-Kinase mit SHIP in den Fc γ RIIb1-vermittelten negativen Signalkaskaden bildet einen Enzymkomplex, der PI-4,5-P₂ zu PI-3,4,5-P₃ phosphoryliert und anschließend zu PI-3,4-P₂ hydrolysiert. Somit wird die Rekrutierung verschiedener PH-Domäne-enthaltenden Proteine beeinflusst. Die SH2-Domäne von SHIP ist wahrscheinlich für die Bindungen an PI3-Kinase-assoziierte, IRS- (*Insulin Receptor Substrate*) verwandte Phosphoproteine Gab1 und Gab2 erforderlich (Rohrschneider et al., 2000; Nishigaki et al., 2000), obwohl diese Wechselwirkung andere Proteine wie Grb2, p85(PI3-Kinase) oder SHP-2 erfordern

könnte. Die funktionelle Bedeutung dieser Assoziation erfordert noch weitere Experimente.

1.3 Fragestellung

Beide Ig α - und Ig β -Ketten besitzen ein ITAM als signalvermittelnde Domäne und üben eine wichtige Funktion bei der Initiation der BCR-Signalübermittlung aus. Wie die negative Regulation von Fc γ RIIb1 in der BCR-Signaltransduktion initiiert wird, ist noch nicht aufgeklärt. Coimmunpräzipitationsexperimente in unserem Labor haben gezeigt, daß aktiviertes Lyn, das möglicherweise das ITIM von Fc γ RIIb1 phosphoryliert, nicht direkt an die cytoplasmatische Region der Fc γ RIIb1 bindet, sondern mit BCR:Fc γ RIIb1-Komplexe assoziiert (Bewarder et al., 1996). Das bedeutet, daß das Ig α /Ig β -Heterodimer für die Initiierung der Fc γ RIIb1-vermittelten negativen Signalkaskaden erforderlich ist. Damit stellte sich die Frage, ob Ig α und Ig β in gleicher Art und Weise dies vermitteln können. Außerdem war unklar, ob die Tyrosinphosphorylierung von Ig α und Ig β nach der Fc γ RIIb-Coquervernetzung beeinflußt wird.

Für diese Fragen wird als Modellsystem die mit den humanen Fc γ RIIb-Isoformen transfizierten Fc γ RIIB-negativen Maus B-Zellen IIA1.6 gewählt. An diesen Transfektanten hat unser Labor bereits verschiedene Rollen der Fc γ RII-Isoformen für die Regulation der B-Zell-Aktivierung nachgewiesen (Budde et al., 1994b). Um die Notwendigkeit des Ig α /Ig β -Heterodimers in der negativen Signalübermittlung zu verstehen, wurde IgM/Ig α und IgM/Ig β chimäre Rezeptoren verwendet, bei denen die extrazelluläre Region von IgM an die Transmembranregion von einem MHC-I-Molekül und die cytoplasmatischen Regionen von Ig α oder Ig β fusioniert wurde (Patel et al., 1993; Aluvihare et al., 1997). Durch diese Chimärrezeptoren wurde bereits die wichtige Funktion des ITAMs für die B-Zell-Aktivierung nachgewiesen (Sanchez et al., 1993; Law et al., 1993; Taddie et al., 1994; Kim et al., 1993; Choquet et al., 1994). Im Rahmen dieser Arbeit sollte der regulatorischen Einfluß beider Fc γ RIIb-Isoformen auf die Ig α -vermittelten Signale unabhängig von Ig β analysiert werden.

Das Projekt von SHIP steht in engem thematischen Zusammenhang mit einem in der Arbeitsgruppe bearbeiteten Forschungsschwerpunkt, die Antigenrezeptor-

gesteuerter Calciumkanäle in der Plasmamembran der B-Zellen zu charakterisieren. Die genaue Regulation dieser Kanäle in den Fc γ RIIb1-vermittelten Signalkaskaden ist bislang unbekannt. Aufgrund dessen Enzymaktivität und Assoziation mit dem pT1M von Fc γ RIIb1 wird SHIP als wesentlicher Regulator des Calciumsignalwegs in der negativen Signalübermittlung vorgeschlagen. Nach Coquervernetzung von BCR und humanem Fc γ RIIb2 in Maus B-Zellen wird das Öffnen des Calciumkanals gehemmt. Da unter diesen Bedingungen Fc γ RIIb2 nicht tyrosinphosphoryliert wird, liegt die Vermutung nahe, daß SHIP nicht zur Plasmamembran gebracht werden kann. Die mögliche Beteiligung von SHIP bei der Regulation der Calciumkanäle in beiden Fc γ RIIb1 und Fc γ RIIb2 exprimierenden IIA1.6-Zellen sollte durch Überexpression des SHIP-Proteins bzw. *Antisense*-Expression untersucht werden.

Für diese Analyse ist die Herstellung effizienter Anti-SHIP-Antikörper die absolute Voraussetzung. Daneben sollte untersucht werden, ob im *E. coli* Expressionssystem biologisch aktives SHIP hergestellt werden kann, um die Substratspezifität in Zusammenarbeit mit von Dr. M. Jücker (Arbeitsgruppe Prof. Dr. G. W. Mayr, Universität Hamburg) untersuchen zu können und es in hochreiner größerer Menge für Kristallisationsexperimente einsetzen zu können.

2. MATERIAL

2.1 Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
IIA1.6	FcR ⁻ Maus B-Zelllinie (Abkömmling der A20-Zelllinie, ATCC-Nr. TIB 208), mit slgG (IgG2a)	Jones et al., 1986
IIA1.6-FcRIIb1*	IIA1.6 transfiziert mit FcγRIIb1	Schulzeck, 1994
IIA1.6-FcRIIb2*	IIA1.6 transfiziert mit FcγRIIb2	Budde, 1995
Daudi	Humane lymphoblastoide B-Zelllinie, Burkitt-Lymphom (ATCC-Nr. CCL-213), mit slg, FcγR ⁺	ATCC, 1988
Ramos	Humane lymphoide B-Zelllinie, Burkitt-Lymphom (ATCC-Nr. CRL-1596), mit slgM	ATCC, 1988

*Transfektant

2.2 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> BL21/(DE3)	<i>E. coli</i> B F ⁻ , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>gal</i> ; λ(DE3) **	Studier et al., 1986; Grodberg et al., 1988; Studier et al., 1990
<i>E. coli</i> M15[pREP4]	<i>nal</i> ^φ , <i>Str</i> ^φ , <i>rif</i> ^φ , <i>lac</i> ⁻ , <i>ara</i> ⁻ , <i>gal</i> , <i>mtf</i> , <i>recA</i> ⁺ , <i>uvr</i> ⁺ , <i>lon</i> ⁺ ; pREP4***	Villarejo et al., 1974; Farabaugh et al., 1978
<i>E. coli</i> MC1061	<i>araD139</i> , Δ(<i>ara-leu</i>)7696, Δ(<i>lac</i>)I74, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>hsdR2</i> (r _K -m _K ⁺), <i>mcrB1</i> , <i>rpsL</i> (<i>Str</i> ^r)	Hanahan, 1985
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lacF</i> ['] , <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^{qZ} , ΔM15, Tn10, (Tet ^r) ^c	Bullock et al., 1987

** ein λ-Phage, der Lysogen in *E. coli* vorliegt; mit T7 RNA-Polymerase-Gen unter *lacUV5* Kontrolle

*** ein 3,7 kb *E. coli* Expressionsvektor, mit *lacI*-Gen codiert für den *lac*-Repressor; Kanamycin-Resistenz

2.3 Plasmide

Name	Verwendung	Eigenschaften	Referenz
pBEHpAC18	Säugerzellen Expressionsvektor	4,8 kb; mit "frühen" Promotor und pA von SV40, pac-Gen (Puromycin-Resistenz) unter Kontrolle desselben Promotors; Ampicillin-Resistenz	Artelt et al., 1988
pBluescript KS(+)	Klonierungsvektor	3,0 kb Phagemid; Ampicillin-Resistenz, mit <i>lacZ</i> -Gen (Blau-Weiß-Selektion)	Yanish-Perron et al., 1985
pcDNA3	Säugerzellen Expressionsvektor	5,4 kb; mit hCMV "frühen" Promotor, BGH-pA, neo-gen (G418-Resistenz) mit SV40 pA unter Kontrolle des SV40 "frühen" Promotors; Ampicillin-Resistenz	Invitrogen
pET-12b	<i>E. coli</i> Expressionsvektor	4,7 kb; mit T7 Promotor, kein Tag, N-terminale Signalsequenz möglich; Ampicillin-Resistenz	Studier et al., 1990; Novagen
pET-32a(+)	<i>E. coli</i> Expressionsvektor	5,9 kb; mit T7/ <i>Lac</i> Promotor, N-terminaler Trx-Tag TM , His ₆ -Tag und S-Tag für erhöhte Löslichkeit des Fusionsproteins; Ampicillin-Resistenz	Novagen
pGEX-2T	<i>E. coli</i> Expressionsvektor	4,9 kb; <i>tac</i> -Promotor für induzierbare Expression der GST-Fusionsproteine, N-terminale GST durch Thrombin abspaltbar, Ampicillin-Resistenz	Smith et al., 1988; Amersham Pharmacia Biotech
pIRES2-EGFP	Säugerzellen Expressionsvektor (<i>"bicistronic"</i>)	5,3 kb; mit hCMV "frühen" Promotor und IRES-Sequenz zwischen MCS und EGFP-Gen, SV40 pA, neo-gen (G418-Resistenz) mit HSV TK-pA unter Kontrolle des SV40 "frühen" Promotors; Kanamycin-Resistenz	CLONTEC H
pQE-30	<i>E. coli</i> Expressionsvektor	3,5 kb; T5 Promotor- <i>lac</i> Operator, N-terminaler His ₆ -Tag, Ampicillin-Resistenz	QIAGEN
pQE-60	<i>E. coli</i> Expressionsvektor	3,4 kb; Expression von Sequenzen mit Startcodon unter Kontrolle eines T5 Promotors/ <i>lac</i> Operators, C-terminaler His ₆ -Tag, Ampicillin-Resistenz	QIAGEN

Name	Verwendung	Eigenschaften	Referenz
pQE-9	<i>E. coli</i> Expressionsvektor	3,4 kb; Expression unter Kontrolle eines T5 Promotors// <i>lac</i> Operators, N-terminale His ₆ -Tag, Ampicillin-Resistenz	QIAGEN
pSV2-gpt	Säugerzellen Expressionsvektor	Expression des Ecogpt-fragmentes unter Kontrolle eines "frühen" SV40-Promotors, (MPA/HAT/Xanthin Resistenz); Ampicillin-Resistenz	Williams et al., 1990; Venkitaraman et al., 1991
pUC18/19	Klonierungsvektor	2,7 kb; Ampicillin-Resistenz, mit <i>lacZ</i> -Gen (Blau-Weiß-Selektion)	Yanish-Perron et al., 1985

2.4 cDNA-Moleküle

Folgende cDNA-Moleküle wurden verwendet: Human FcγRIIb1 (Gorczytza, 1991), Human FcγRIIb2 (Engelhardt et al., 1990); Maus Igα (Sakaguchi et al., 1988), Maus Igβ (Hermanson et al., 1988); Maus SHIP (Lioubin et al., 1996; Damen et al., 1996), Human SHIP (Ware et al., 1996).

2.5 Oligonucleotide

Name	Sequenz	Merkmale
5'pGEX	5'-GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG-3'	Sequenzierprimer für pGEX-Vektoren
3'pGEX	5'-CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG-3'	
7-REV	5'-GTT GCT TGA TCT TCT GG-3'	Zur Sequenzierung der katalytischen Domänen von SHIP
8-SEQ	5'-GCT TCA CCC ACC TCT TC-3'	
REV-9n	5'-GAC AGA CCA CAT GCA CC-3'	
10-SEQ	5'-CCA CAC TGA AGA CCA AG-3'	
Aktin-5	5' -ACC AAC TGG GAC GAC ATG GA- 3'	Für Kontroll-RT-PCR
Aktin-3	5' -GCC ATC TCC TGC TCG AAG TC-3'	
h+mSHIP-RT5	5'-GGC AGG ACT GCC ATG CAG TG-3'	Zur Kontrolle der SHIP-Überexpression
pcDNA3-RT3	5'-CTG GCA ACT AGA AGG CAC AGT C-3'	
HSHIP2RT-5	5'-AGA GGA CAC AGG CGA CGA CC-3'	Zur Kontrolle der Human SHIP-Überexpression
HSHIP2RT-3	5'-GGC CGG TGC GGA GAC TCA GG-3'	

Material

Name	Sequenz	Merkmale
MSHIP2RT-5	5'-AGG AGG ATG CTA TTG ATG AGG-3'	Zur Kontrolle der endogenen SHIP-Expression
MSHIP2RT-3	5'-CGC CTG TTG GTA GAT TCT GAG-3'	
pcDNA3-SEQ	5'-AGA GCT CTC TGG CTA ACT AG-3'	Sequenzierprimer für pcDNA3 Vektor
PIB01	5'-ACC TCC CAC ACC TCC CCC TGA A-3'	Zur Umklonierung von Ig α bzw. Ig β
PIB17	5'-CCA TCC ACT GTC TCC AAC-3'	
pQEseq	5' -CGG ATA ACA ATT TCA CAC AG- 3'	Sequenzierprimer für pQE Vektoren
pQErev	3' -GTT CTG AGG TCA TTA CTG G- 3'	
Sequencing	5'-CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT- 3'	Allgemeine Sequenzierprimer für M13/pUC Vektoren
Reverse	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'	
SHIPasn1	5'-GAT CCA TGG GTC TCC TGG ACT GGG TCA GCA G-3'	Zur Klonierung von <i>Antisense</i> SHIP und Kontrolle der <i>Antisense</i> -Expression
SHIPasn2	5'-AAT TCT GCT GAC CCA GTC CAG GAG ACC CAT G-3'	
SHIP-cat5	5'-TTA TAG ATC TTC CAA GGG GCA GGG AAA G-3'	Amplifikation der SHIP-katalytische Domäne von AS 430-808
SHIP-cat3	5'-ATA AAG ATC TAA TGC TGA TCA GGA TAT GCT G-3'	
SHIPcat-5n	5'-TGC TGG TAC CAT ATG CAT TCG GAG CAG CCA GAG-3'	Amplifikation der SHIP-katalytische Domänen von AS 396-757, 396-768, 396-791; mit ATG/Stop
SHIPcat-3n1	5'-TTC AGG TAC CGT CGA CTA GCT TGA GTG GAA CTC CAA G-3'	
SHIPcat-3n2	5'-TCA TGG TAC CGT CGA CTA TCC TTC CTG ACT CTT GAC-3'	
SHIPcat-3n3	5'-TTA GGG TAC CGT CGA CTA GGG CTT TAG CTT GGG AAG-3'	
SHIPcat-e5	5'-AAT TGG TAC CAT ATG TCC AAG GGG CAG GGA AAG ACA C-3'	Amplifikation der SHIP-katalytische Domäne von AS 430-808, mit ATG/Stop)
SHIPcat-e3	5'-AGC TGG TAC CGT CGA CTA TCA AAT GCT GAT CAG GAT ATG C-3'	
SHIPREV-5	5'-CGA GGG ATC CGA ATC TAC C-3'	Zur Klonierung der SHIP-katalytischen Domäne von AS 288-791, mit ATG/Stop
SHIP5n3-3	5'-CTC TCC AAG GGG ATC CTC-3'	
SHIP-SH2-BamHI	5'-CAT GGA TCC ATC ACC CGC TCC-3'	Amplifikation der SHIP-SH2 Domäne von AS 13-109
SHIP-SH2-EcoRI	5'-CAT CAA TAG AAT TCT CCT CCT CC-3'	

Sequenzierprimer, die am 5' mit Cy5 markiert, wurden von Roche oder MWG bestellt und bei -20°C im Dunkeln gelagert. Andere Primer, bezogen von MWG und Roth, wurden bei einer Konzentration von $100\text{ pmol}/\mu\text{l}$ in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gelöst und bei -20°C gelagert. Für die Reverse Transkription wurde Oligo-dT (12-18 Desoxythymidylate) von Amersham Pharmacia Biotech gekauft, in $500\text{ ng}/\mu\text{l}$ gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.6 Rekombinante Proteine

GST-(SH2)₂(Syk) und GST-SH3_C(Grb2), GST-SH2-SH3_C(Grb2), GST-SH3(Lyn), GST-SH3(PI3K), GST-SH3(SH3P7), GST-SH3(Src) wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. J. Wienands als pGEX-2T oder pGEX-3 Konstrukte zur Verfügung gestellt, nach Standard-Vorschriften exprimiert und unter nativen Bedingungen aufgereinigt.

2.7 Antikörper

Ziege-Anti-Maus-IgM-Argarose stammte von Sigma. Die Kaninchenantiseren gegen Lyn und Fyn wurden bei Biomol bezogen. Kaninchen-Anti-NPXY(SHIP)- und Kaninchen-Anti-BLNK-Antikörper wurden von Dr. M. Jücker (Hamburg) bzw. Prof. Dr. J. Wienands zur Verfügung gestellt. Andere unkonjugierte oder konjugierte Polyklonale Antikörper wurden von Dianova bezogen.

Die verwendeten monoklonalen Antikörper lauten folgendermaßen (für Kontrolle wurde mlgG1 von Sigma gekauft):

Bezeichnung	Spezifität	Subklasse	Einsatzform	Bezugsquelle
II1A5	Fc γ RII	mlgG1	Kulturüberstand	Arbeitskreis (Weinrich, 1992)
II8D2	Fc γ RIIb	mlgG1	Kulturüberstand	Arbeitskreis (Weinrich, 1992)
4G10	Phosphotyrosin	mlgG1	gereinigter Ak	Biomol
AT10	Fc γ RII	mlgG1	Kulturüberstand	Dr. M. J. Glennie (Greenman et al., 1991)
Dia 900	His-Tag	mlgG1	gereinigter Ak	Dianova
KB61	Fc γ RII	mlgG1	Ascites	Dr. K. Pulford (Pulford et al., 1986)

2.8 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche
DNA-Polymerasen (<i>Taq</i> , <i>UITma</i>)	Perkin Elmer Applied Biosystems, Amersham Pharmacia Biotech, QIAGEN
DNase	Roche
Lysozym	Roche
Polymerase I (Klenow-Fragment)	MBI Fermentas
Restriktionsendonucleasen	Roche, MBI Fermentas, Takara, New England Biolabs
Reverse Transkriptasen (MML-V, Superscript™ II RNase H ⁻)	Gibco BRL
RNase	Roche
T ₄ -DNA-Ligase	MBI Fermentas
Thrombin	Roche

Alle benutzten Enzyme wurden nach Angaben der Hersteller gelagert und verwendet.

2.9 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien werden, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Roche, Fluka, Merck, Roth, Serva oder Sigma erworben und besaßen den Reinheitsgrad "zur Analyse".

2.10 Medien, Puffer und Lösungen

10x Ficoll-DNA-Probenpuffer	25% (w/v) Ficoll (Type 400, Amersham Pharmacia Biotech), 0,4% (w/v) Bromphenolblau, 0,4% (w/v) Xylencyanol FF; aliquotiert bei 4°C lagern
2x Laemmli-Puffer (nicht reduzierend)	250 mM Tris-HCl, pH 6,8, 8% (w/v) SDS, 40% (v/v) Glycerin, 0,004% (w/v) Bromphenolblau
2x Laemmli-Puffer (reduzierend)	2x Laemmli-Puffer (nicht reduzierend), 10% (v/v) β-Mercaptoethanol; frisch ansetzen oder aliquotiert bei -20°C lagern
2-YT-Medium	1,6% (w/v) Bacto Trypton, 1,0% (w/v) Hefe Extrakt, 0,5% (w/v) NaCl, pH 7,0; 15 min bei 121°C autoklavieren, aliquotiert bei 4°C lagern
Acrylamid-Stammlösung	30% (w/v) Acrylamid, 0,8% (w/v) N, N'-Methylenbisacrylamid; filtriert bei 4°C und dunkel lagern
<i>Blocking</i> -Puffer	PBS, 0,2% (w/v) Tween 20 oder 1-3% (w/v) BSA oder 3-5% (w/v) Magermilchpulver; frisch ansetzen

Bradford Reagenz	100 mg Coomassie <i>Brillant Blue</i> in 50 ml Ethanol lösen, 100 ml 85%-ige o-Phosphorsäure zugeben, mit H ₂ O _{bidest} auf 1 l auffüllen; bei 4°C und dunkel lagern
Click's Medium	RPMI 1640 Pulvermedium (Gibco BRL), 25 mM NaHCO ₃ , 10 mM Glutamin, 10 mM Na-Pyruvat, 50 µM β-Mercaptoethanol; sterilfiltriert und aliquotiert bei 4°C lagern
Coomassie-Entfärber	45,5% (v/v) Ethanol, 9% (v/v) Essigsäure
Coomassie-Lösung	0,2% (w/v) Coomassie <i>Brillant Blue</i> in Coomassie-Entfärber; dunkel lagern
CTAB-Lösung	5% (w/v) CTAB, 0,5 M NaCl; 30 min bei 121°C autoklavieren
Elektrophorese-Puffer (SDS-PAGE)	25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS
Entfärber-Lösung	45% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure
<i>Farmers Reducer</i>	30 mM K ₃ [Fe(CN) ₆], 30 mM Na ₂ S ₂ O ₃ ; frisch ansetzen
FCS	30 min hitzeinaktiviert bei 56°C, aliquotiert bei -20°C lagern
Geltrocknungslösung	20% (v/v) Ethanol, 1% (v/v) Methanol, 1% (v/v) Isopropanol, 1,5% (v/v) Glycerin
Kinase-Assay-Puffer	20 mM HEPES, pH 7,5, 100mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 5 mM MnCl ₂
Krebs-Ringer-Lösung	10 mM HEPES, pH 7,2, 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1mM MgCl ₂ , 1,5 mM CaCl ₂ , 10 mM Glucose
Lösung I	10 mM Na ₂ EDTA, pH 8,0
Lösung II	200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS
Lösung III	2,5 M Kaliumacetat/Essigsäure, pH 4,7
LB ^{Amp/kan} -Medium	LB-Medium, 100 mg/l Ampicillin, 25 mg/l Kanamycin; frisch ansetzen
LB ^{Amp} -Medium	LB-Medium, 100 mg/l Ampicillin; frisch ansetzen
LBG	LB-Medium, 20 mM Glucose; frisch ansetzen
LB-Medium	1% (w/v) Bacto Trypton (Difco), 0,5% (w/v) <i>Hefe Extrakt</i> (Difco), 0,5-1,0% (w/v) NaCl (Difco), pH 7,0, 1,5% (w/v) <i>Select Agar</i> (Difco) nur für Platten; 15 min bei 121°C autoklavieren, aliquotiert bei 4°C lagern
Low-A	49 ml 0,2 N NaOH, 49 ml 4% (w/v) Na ₂ CO ₃ , nach Mischen Zugabe von 1 ml 1% (w/v) CuSO ₄ und 1ml 2% (w/v) K-Na-Tartrat; frisch ansetzen
Low-B	5 ml Folin-Ciocalteausches Reagenz, 5 ml H ₂ O _{bidest} ; frisch ansetzen und dunkel behalten

Material

NP40-Lysepuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,8, 1% (w/v) NP40, 137 mM NaCl, 2 mM Na ₂ EDTA, 1 mM Na ₃ VO ₄ , 10% (v/v) Glycerin; bei 4°C lagern, vor der Benutzung 4 mM PMSF und 1,5 µg/ml Aprotinin oder je 10 ml eine Tablette "Proteaseinhibitor-Cocktail" zugeben
PBS	0,8% (w/v) NaCl, 0,02% (w/v) KCl, 0,114% (w/v) Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O, 0,02% (w/v) KH ₂ PO ₄ ; frisch von 10x Stammlösung verdünnen
PBS/T	PBS, 0,05% (w/v) Tween 20; frisch ansetzen
RIPA-Puffer-600	RIPA-Puffer mit 600 mM NaCl
Ponceau-Lösung	0,1% (w/v) Ponceau S, 5% (v/v) Essigsäure; dunkel lagern
Puffer 1	30 mM Tris-HCl, pH 8,0, 20% (w/v) Saccharose; bei 4°C lagern, 1 mg/ml Lysozym frisch ansetzen
Puffer 2	10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 2% (w/v) Triton X-100, 10 mM Na ₂ EDTA; bei 4°C lagern, 1 mM PMSF und 1,5 µg/ml Aprotinin frisch ansetzen
Puffer B	10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaH ₂ PO ₄ , 8 M Harnstoff
Puffer C	10 mM Tris-HCl, pH 6,3, 100 mM NaH ₂ PO ₄ , 8 M Harnstoff
RIPA-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1% (w/v) Triton X-100, 1% (w/v) Na-Deoxycholat, 0,1% (w/v) SDS, 158 mM NaCl, 5 mM Na ₂ EDTA, 1 mM Na ₃ VO ₄ , 10 mM, Na ₄ P ₂ O ₇ , 10 mM NaF;; vor der Benutzung 4 mM PMSF und 1,5 µg/ml Aprotinin oder je 10 ml eine Tablette "Proteaseinhibitor-Cocktail" zugeben
RNA-Lysepuffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 0,5% NP40 (w/v)
RPMI-Medium	RPMI 1640 Pulvermedium (Gibco BRL), 25 mM NaHCO ₃ , 25 mM HEPES, 2 mM Glutamin, 2 mM Na-Pyruvat, 50 µM 2-Mercaptoethanol; sterilfiltriert und aliquotiert bei 4°C lagern
STE	10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM Na ₂ EDTA; 30 min bei 121°C autoklavieren
STET-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 8% (w/v) Saccharose, 0,1% (w/v) Triton X-100, 50 mM Na ₂ EDTA; 30 min bei 121°C autoklavieren
<i>Stripping</i> -Puffer	62,5 mM Tris-HCl, pH 6,7, 2% (w/v) SDS; vor Benutzung 100 mM β-Mercaptoethanol zugeben
TAE	40 mM Tris-HCl, pH 7,8, 10 mM Natriumacetat, 1 mM Na ₂ EDTA
TE	10 mM Tris-HCl, pH 7,4 oder 8,0, 1 mM Na ₂ EDTA; 30 min bei 121°C autoklavieren
Tfbl	30 mM Kaliumacetat, 50 mM MnCl ₂ , 100 mM KCl, 10 mM CaCl ₂ , 15% (v/v) Glycerin; sterilfiltriert bei 4°C lagern

TfblI	10 mM MOPS, pH 7,0, 75 mM CaCl ₂ , 10 mM KCl, 15% (v/v) Glycerin; sterilfiltriert bei 4°C lagern
Transfer-Puffer (Protein-sequenzierung)	50 mM H ₃ BO ₃ /NaOH, pH 9,0, 20% (v/v) Ethanol, (1 mM DTT)
Transfer-Puffer (<i>Semi-dry</i> Western Blot)	25 mM Tris, 20 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol
TSS-Puffer	1,0% (w/v) Bacto Trypton, 0,5% (w/v) <i>Hefe Extrakt</i> , 0,5% (w/v) NaCl, 0,8% (w/v) PEG-3350, 0,5% (w/v) DMSO, 20 mM MgCl ₂ , pH 6,5; sterilfiltriert bei 4°C lagern
<i>TYM Broth</i>	2% (w/v) Bacto Trypton, 0,5% (w/v) <i>Hefe Extrakt</i> , 100 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , pH 7,0; frisch ansetzen, 15 min bei 121°C autoklavieren oder sterilfiltrieren

Alle verwendete Enzym-Puffer sowie die Zusätze wurden mit den Enzymen geliefert und nach den Empfehlungen des Herstellers benutzt. Die Zusammensetzung anderer Puffer ist in den entsprechenden Abschnitten aufgeführt.

2.11 Sonstige Materialien

3 MM CHR Chromatography Papier	Whatman
Centrieconeinheit (<i>Microsep</i> TM 3K, 10 K)	Filtron
DAPI	Roche
DNA Molekulargewichtsstandard (λ DNA/ <i>Eco911</i> , pUC <i>Mix (8) Marker</i> , <i>GeneRuler 1kb Ladder</i> , <i>Ladder Mix</i>)	MBI Fermentas
DNA-Sequenzierung Kit (<i>T7 Sequencing</i> , <i>Thermo Sequenase Cycle Sequencing</i>)	Amersham Pharmacia Biotech
<i>DryEasy Min-Gel Drying System</i> , Celluphanfolien	Novex
ECL-Chemilumineszenz Kit, Chemilumineszenzfilme Hyperfilm ECL	Amersham Pharmacia Biotech
FCS	Gibco BRL
Fluo-3-AM, Pluronic F-127, SNARF-1	Molecular Probes
Gene Pulser Küvette (0.4 cm)	BioRad, BTX
Genom-DNA Isolierung Kit (<i>PCR Template</i>)	Roche
Glutathion-Agarose	Sigma
Glutathion-Sepharose (4B)	Amersham Pharmacia Biotech
Ni ²⁺ -NTA-Agarose	QIAGEN
Nitrocellulosemembran (0.2 μ m)	Schleicher & Schüll
<i>PCR DNA and Gel Band Purification Kit</i> (GFX TM)	Amersham Pharmacia Biotech
Plasmid-DNA Isolierung Kit (<i>QiaPrep Spin Miniprep</i> , QIAGEN <i>Plasmid Midi</i> , <i>Maxi</i>)	QIAGEN

Protein-A-Sepharose (CL-4B)	Amersham Pharmacia Biotech
Protein-G-Sepharose (<i>GammaBind</i>)	Amersham Pharmacia Biotech
Protein-Molekulargewichtsstandard (LMW-, HMW-Marker)	Amersham Pharmacia Biotech
PVDF-Immobilon-Membran (0.2 µm)	Millipore
RNA Isolierung Kit (<i>High Pure Mini</i>)	Roche
RNA Isolierung Kit (<i>RNeasy Mini /QIAshredder</i>)	QIAGEN
Sterilfilter	Nalgene

Plastikartikel für die Zellkultur wurden von Nunc und Greiner bezogen. Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, Petrischalen, Kultur- und Zentrifugationsröhrchen wurden von Greiner, Brand und Waldeck geliefert.

2.12 Geräte

Begasungsbrutschrank	<i>Steri-Cult-200*</i> BBD 6220*	Forma Scientific Heraeus
Chromatographie	FPLC (Säule: <i>Mono-Q</i>)	Amersham Pharmacia Biotech
DNA-Sequenzierungseinrichtung	<i>ALFexpress</i>	Amersham Pharmacia Biotech
Durchflußcytometer	<i>FACSort</i>	Becton Dickinson
Gelelektrophorese- und <i>Semi-dry</i> Blotapparat		Werkstatt Universität Bielefeld
Elektroporator	<i>Gene Pulser</i>	BioRad
Fraktionssammler	FRAC-100	Amersham Pharmacia Biotech
Gelphotographiersystem	Bio Doc II	Biometra
Kühlzentrifugen	CS-6R*, GS-15R, J2-21, L7-65 (Ultrazentrifuge)	Beckman
PCR-Prozessor	<i>DNA Thermo-Cycler 480, GeneAmp PCR System 9700, GeneAmp PCR System 2400</i>	Perkin Elmer Applied Biosystems
pH-Meter	pH 540 GLP	WTW
Reinstwasseranlage	ELGA STAT	Elga
Sicherheitswerkbank	<i>Clean Air DLF BSS 4</i> <i>Hera Safe*, Lamin Air HBB 2472*</i>	Woerden Heraeus
Spannungsquellen	<i>Power Supply EPS 200, LKB GPS 200/400</i>	Amersham Pharmacia Biotech

Spektralphotometer	Ultrospec 3000	Amersham Pharmacia Biotech
Transiluminator 366 nm	KB3	Polaroid
Ultrafiltrationskammer, Fritte	<i>Model 52</i> (Membran YM 30)	Amicon
Vakuum Evaporator	<i>Speedvac Concentrator</i>	Savant
Waagen	A 120-S, L 610-D	Sartorius

*für die Zellkultur

3. METHODEN

3.1 Molekularbiologische Methoden

Allgemeine Methoden wurden nach Sambrook et al. (1989) und Ausubel et al. (1995) verwendet, die anderen sind in den entsprechenden Abschnitten aufgeführt.

3.1.1 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Die Kultivierung erfolgte nach Transformation in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika bei 37°C im Rundschtüttler. Zur Anzucht von Einzelkolonien wurden Antibiotika-haltige LB-Platten verwendet.

Bei 4°C wurden die Platten maximal bis zu einem Monat gelagert, flüssige Kulturen bis zu einer Woche. Zur langfristigen Lagerung wurden Bakterienkulturen der stationären Phase mit 15% Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Zum Wiederaufleben wurden diese auf LB-Platten ausgestrichen.

3.1.2 Präparation von Plasmid-DNA

a) Schnellisolierung in kleinem Maßstab

Zur Gewinnung kleiner Plasmid-DNA-Mengen von Transformationsklonen für Restriktionsanalysen wurde die schnell durchführbare CTAB-Minilyse (Del Sal et al., 1988) verwendet.

3 ml einer Übernachtskultur wurden 2 min bei 7000 rpm in einer Tischzentrifuge pelletiert und in 400 µl STET-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 8 µl frisch angesetzter Lysozymlösung (50 mg/ml) wurde das Peptidoglykangrüst der Zellwand unter Schütteln für 5 min zersetzt. Die Bakterien wurden dann durch osmotischen Druck und Hitzeschock (45 sec bei 95°C) lysiert, gleichzeitig wurden zelluläre Proteine, genomische DNA und Zelltrümmer denaturiert. Nach 10 min Zentrifugieren bei 13000 rpm wurde 8 µl CTAB-Lösung zum Überstand gegeben, kurz gevortext, und die gefällte DNA/RNA durch Zentrifugation bei 13000 rpm 5 min pelletiert. Durch Zugabe von 150 µl 1,2 M NaCl-Lösung wurde die Plasmid-DNA wieder gelöst und nach erneutem Zentrifugieren für 3 min mit 750 µl kaltem absolutem Ethanol gefällt. Nach 10 min Zentrifugation bei 4°C und 13000 rpm wurde das Pellet mit kaltem 70%

Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und je nach Plasmidtyp in 20-40 µl TE (pH 7, 4) aufgenommen.

Zur Sequenzierung wurden durch *QIAPrep Spin Miniprep Kit* oder *QIAGEN Plasmid Midi, Maxi Kit* gewonnene hochreine DNA-Proben verwendet. Dieses Verfahren ist im Prinzip eine modifizierte Methode der alkalischen Lyse (Birnboim et al., 1979) kombiniert mit der Anwendung von Silica-Gel-Membranen, die selektiv für die Absorption von DNA in Hochsalzpuffer und Elution in Niedrigsalzpuffer ist (Vogelstein et al., 1979). Die Reinheit der DNA, die in verschiedenen Bakterienstämmen variiert, ist laut Herstellerangaben vergleichbar mit CsCl-Gradienten gereinigter DNA.

b) Großisolierung

Aus einer von einer Einzelkolonie angewachsen Vorkultur wurde im Verhältnis 1:500 je nach Plasmid Kopieanzahl in 50-250 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium überimpft und die Bakterienkultur wurde für 12-16 h bei 37°C bis zur frühstationären Wachstumsphase kultiviert. Für die Isolierung von Plasmid-DNA in großen Mengen wurden die *QIAGEN Plasmid Midi/Maxi Kit* verwendet. Nach einer modifizierten alkalischen Lyse erfolgt die Bindung von Plasmid-DNA unter bestimmten pH- und Niedrigsalzbedingungen an *QIAGEN Anion-Austausch Harz* anschließendem Waschen und Eluieren unter Hochsalzbedingungen. Die Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Relativ Endotoxin-freie Plasmid-DNA wurde auch nach einer modifizierten alkalischen Lyse (B. Seed, unveröffentlicht) über CsCl-Dichtegradientenzentrifugation wie folgt gereinigt werden:

250 ml einer Übernachtskultur wurde durch 25 min Zentrifugation bei 4°C und 2500x *g* pelletiert. Das Bakteriensediment wurde in 10 ml Lösung I resuspendiert, durch Zugabe von 20 ml Lösung II lysiert und anschließend nach Zugabe von 10 ml Lösung III neutralisiert. Die unter alkalischen Bedingungen denaturierten Proteine, Zellwandbestandteilen und chromosomale DNA wurden durch 10 min Zentrifugation bei 4°C und 2700x *g* entfernt, und der Plasmid-DNA-haltige Überstand wurde durch Mull filtriert. Durch Zugabe von 0,6 Volumen Isopropanol und anschließender 10 min Zentrifugation bei 15000x *g* wurde die Plasmid-DNA präzipitiert, zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 20 mM Tris-HCl/10 mM Na₂EDTA (pH 7,4) gelöst, 4,5 g CsCl zugegeben und mit 750 µl EtBr-

Lösung (10 mg/ml) versetzt. Nach 6 h Zentrifugation bei 20°C und 304000x g in VTi 65.2 Rotor wurde die Plasmid-DNA Bande unter UV-Licht mit einer Kanüle abgezogen und das EtBr mit n-Butanol, das zuvor zweimal mit 1/4 Volumen 1M NaCl ausgeschüttelt worden ist, extrahiert. Durch Zugabe von 1 Volumen 1M Ammoniumacetat-Lösung und 2 Volumen absolutem Ethanol wurde die DNA o/n bei -20°C oder 20 min bei -70°C gefällt, nach zweimaligem Waschen mit 70% Ethanol getrocknet und schließlich in TE-Puffer (pH7,4) gelöst.

3.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration von Nucleinsäuren erfolgte mit einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine OD₂₆₀ mit einer 1 cm Küvette entspricht etwa einer Konzentration von 50 µg/ml von DNA, 40 µg/ml bei RNA und 30 µg/ml bei Oligonucleotiden. Zur Abschätzung der Verunreinigung durch Proteine wurde die Absorption bei 280 nm bestimmt. Der Quotient der OD₂₆₀ und OD₂₈₀ sollte bei DNA ca. 1,8 und bei RNA zwischen 1,8-2,2 liegen. Die Konzentration verschiedener Nucleinsäuren konnte vom Photometer automatisch angegeben werden, wobei OD₃₂₀ auch gemessen wurde. Um ein möglichst exaktes Meßergebnis zu erhalten, wurden die Nucleinsäuren so verdünnt, daß der Wert der Absorption zwischen 0,1 und 1 lag.

3.1.4 Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonucleasen

Viele Prokaryoten exprimieren Restriktionsendonucleasen, um fremde DNA zu spalten, wobei ihre eigene DNA durch Methylierung geschützt ist. Die in der Rekombinationstechnik verwendeten Typ II Restriktionsenzyme schneiden DNA in beiden Strängen innerhalb 4-8 palindromartig angeordneter Basenpaare.

Die Enzyme wurden laut Herstellungsangaben verwendet. Bei unreiner DNA, mehreren Schnittstellen oder bei nicht optimalen Pufferbedingungen wurde mehr Enzym eingesetzt. Bei durch CTAB-Minilyse gewonnenen RNA-haltigen DNA-Proben wurde eine RNase-Behandlung durchgeführt, um kleine DNA-Fragmente nachweisen zu können.

3.1.5 DNA-Fällung

Eine Fällung von DNA ist notwendig, wenn die Konzentration zu niedrig oder die Reinheit nicht hoch genug ist. Zum Konzentrieren wurde 1/10 Volumen von 3 M Natriumacetat zugegeben und nach dem Mischen mit 2,5 Volumen absolutem Ethanol versetzt und anschließend bei -20°C oder -70°C stehengelassen. Um die kontaminierenden Proteine aus DNA-Proben zu beseitigen, wurde eine Phenolextraktion vor der Fällung durchgeführt. War das Volumen geringer als 250 μl wurde die DNA-Lösung zuerst mit TE-Puffer aufgefüllt. 250 μl gepufferter Phenol wurde zur DNA gegeben und durch Vortexen gut gemischt. Nach 5 min Zentrifugation bei 4°C wurde der DNA-haltige Überstand vorsichtig abgenommen, einmal mit Phenol/Chloroform/Isoamylethanol (24:23:1) und abschließend noch einmal mit Chloroform/Isoamylethanol (23:1) extrahiert, um die Kontamination von Phenol zu minimieren.

Zur Reinigung von PCR-DNA-Proben wurde häufig der *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Pharmacia Biotech) benutzt.

3.1.6 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung linearisierter DNA wurden in Abhängigkeit von der Fragmentgröße 0,8-2% Agarosegele verwendet (siehe Tabelle). Die Agarose wurde durch Aufkochen in TAE-Puffer gelöst und nach dem Abkühlen auf ca. 60°C EtBr in einer Endkonzentration von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben. Die DNA-Proben wurden vor dem Gellauf mit 1/10 Volumen Ficoll-DNA-Probenpuffer versetzt, die Auftrennung erfolgte in TAE-Puffer bei ca. 5V/cm Elektrodenabstand. Bei Verwendung von LMP-Agarose konnten DNA-Fragmente aus dem Gel geschnitten, anschließend mit der *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit* aufgereinigt oder direkt ligiert werden. Die Auftrennung von RNA-Proben zwecks Northern Blot benötigt denaturierende Bedingungen unter Anwendung von Formaldehyd/Formamid und MOPs-Puffer.

Die im UV-Licht leuchtenden Banden wurden mittels eines mitlaufenden Molekulargewichtsstandards der entsprechenden Größe zugeordnet.

% Agarose	Fragmentgröße der optimalen Auftrennung
0,8	800 bp-12 kb
1,0	500 bp-10 kb
1,2	400 bp-7 kb
1,5	200 bp-3 kb
2,0	50 bp-2 kb

3.1.7 Insertion von DNA-Fragmenten in Vektor-DNA

a) Dephosphorylierung von 5' Phosphatgruppen linearisierter Vektor-DNA

Die 5'-Phosphatgruppen der linearisierten Plasmid-DNA wurden enzymatisch durch Alkalische Phosphatase hydrolysiert, wenn die resultierenden Enden kompatibel waren, damit die Religation des Vektors verhindert wurde. Die Dephosphorylierung von 200 ng Vektor-DNA erfolgte durch Zugabe von 1 U Enzym und Inkubation für 45 min bei 37°C, gefolgt von einer weiteren für 10 min bei 65°C unter Zusatz von 20 mM Na₂EDTA zur Inaktivierung der Phosphatase.

b) Auffüllen und Abbauen inkompatibler DNA-Enden

Nach Behandlung der DNA mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I können manche inkompatible Enden miteinander ligiert werden. Zum Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden wurde die 5' → 3' Polymeraseaktivität in Gegenwart von Desoxynucleotiden ausgenutzt. Für die Auffüllreaktion für 30 min bei 37°C in Klenow-Puffer oder ähnlich eingestelltem Puffer wurden dNTP in einer Endkonzentration von 1,2 mM zugesetzt. Durch selektive Zugabe verschiedener Nucleotide können manche überhängende Enden partiell aufgefüllt werden. Die Inaktivierung der Klenow-Polymerase erfolgte für 10-20 min bei 85°C. In Abwesenheit von dNTP überwiegt die 3' → 5' Endonucleaseaktivität der Klenow-Polymerase, so daß die 3'-DNA-Überhänge abgebaut werden. Die Abbaureaktion erfolgte für 15 min bei 37°C nach Zugabe von 60 mM NaCl. Die Ansätze wurden anschließend mit zusätzlichen 1 mM dNTP für weitere 10 min inkubiert.

c) Ligation

Zur Klonierung von Insert-DNA in Plasmid-DNA mit kompatiblen Enden wurde die T₄-DNA-Ligase verwendet. Da es zur Ligation von DNA-Fragmenten eine freie OH-Gruppe am 3'-Ende und eine Phosphatgruppe am 5'-Ende benötigt, müssen die

Insert-DNA entweder frisch durch Restriktionsendonuclease(n) hydrolysiert, oder nach der Amplifizierung von PCR-Produkten und dem Synthetisieren von Oligonucleotiden die 5'OH-Gruppe mit T₄-Kinase phosphoryliert werden.

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden in einem LMP-Agarosegel bei maximal 5 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Ausschneiden der entsprechenden Banden auf einem langwelligen Transiluminator (366 nm) wurde die Agarose bei 65°C geschmolzen, mit H₂O_{bidest} verdünnt oder die DNA anschließend aufgereinigt (falls notwendig). In 20-30 µl Gesamtvolumen von den für die T₄-Ligase optimierten Pufferbedingungen, wobei ATP als Energiespender dient, wurde etwa 10 ng Vektor-DNA allein als Klonierungskontrolle eingesetzt. Bei Ligation von kohäsiven Enden wurden Insert-DNA in einem molaren Verhältnis von Vektor zu Insert 1:3 zugegeben, mit 0,3 U Enzym bei RT für 4h inkubiert, während bei glatten Enden das molare Verhältnis von Vektor zu Insert 1:5 betrug und die Inkubation o/n bei 16°C mit 1,5 U Ligase erfolgte.

3.1.8 Herstellung und Transformation chemisch-kompetenter *E. coli*

Chemisch-kompetente *E. coli* wurden durch Calciumchloridbehandlung hergestellt (Hanahan, 1985). Eine frischangewachsene Einzelkolonie der *E. coli* MC1061 wurde in *TYM Broth* überimpft und o/n bei 37°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde diese Vorkultur 1:100 in 500 ml *Tym Broth* verdünnt. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 wurden die Zellen auf Eis abgekühlt und 10 min bei 2500x g zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 40 ml TfbI vorsichtig resuspendiert, kurz auf Eis inkubiert, nach Pelletieren in 20 ml TfbII resuspendiert und zu 500 µl Portionen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C. Aufgrund der Tetracyclin-Resistenz der XL1-Blue wurde diese in LB-Medium mit 50 µg/ml Tetracyclin kultiviert. Herstellung kompetenter M15[pREP4] wurde nach Angaben von der Firma QIAGEN mit LB-Medium/25 mg/l Kanamycin und modifizierten Tfb-Puffern durchgeführt.

Zur Transformation verschiedener *E. coli* wurden 5-6 µl eines Ligationsansatzes (3.1.6) oder 100 pg-10 ng einer Plasmid-DNA zunächst mit 100 µl kompetenter Zellen für 20-30 min auf Eis inkubiert, die dann durch einen Hitzeschock durchlässig wurden (siehe Tabelle). Nach 30-45 min Inkubation der Zellen in 1 ml Vollmedium bei

37°C wurden diese auf LB-Platten mit dem für das Plasmid entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen.

<i>E. coli</i> Stamm	MC1061	XL1 Blue	M15[pREP4]
Kompetenz	Sehr hochkompetent	Hochkompetent	Hochkompetent
Hitzeschock	5 min bei 37°C	45 s bei 42°C oder 2 min bei 37°C	90 s bei 42°C
Eigenschaft und Anwendung	Für Standard-klonierung und Vermehrung von Vektoren; methylierungs- und <i>recA</i> -positiv	Langsamer Wachstum, isolierte DNA von sehr guter Qualität besonders gut für Sequenzierung, für die Vermehrung von manchen Vektoren stark empfohlen	Zur Expression der rekombinanten Proteine

E. coli BL21/(DE3) dienen häufiger der Expression von rekombinanten Proteinen, da ihm die *ompT*-Protease fehlt, die rekombinante Proteine degradieren könnte. Die kompetenten Zellen wurden immer mit TSS-Puffer frisch hergestellt. Es erfolgte ein Hitzeschock für 2 min bei 42°C und anschließend eine Regeneration in LBG-Medium nach dem Protokoll von Amersham Pharmacia Biotech. Da BL21/(DE3) sich nicht effizient transformieren lassen, wurde normalerweise 1µl CTAB-DNA und 200 µl kompetent Zellen pro Ansatz eingesetzt.

3.1.9 Stabile Transfektion von IIA1.6-Zellen mittels Elektroporation (modifiziert nach Bonnerot et al., 1992)

Zur Transfektion verwendete Plasmid-DNA wurde hoch gereinigt und, wenn möglich, linearisiert und nach der Phenolextraktion gegen TE-Puffer (pH 7,4) dialysiert. IIA1.6-Zellen und Transfektanten sollten sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden. Nach zweimaligem Waschen mit kaltem Click's Medium ohne FCS wurden die Zellen in ca. 2×10^7 /ml aufgenommen. Pro Transfektion wurden 500 µl der Zellsuspension mit je nach Größe 25-50 µg DNA in eine vorgekühlte Küvette mit 0,4 cm Elektrodenabstand gegeben und für 10 min auf Eis gelagert. Nach Pulsen bei 260 V und 960 µF wurde das Gemisch sofort mit vorgewärmtem Click's Medium mit 50 µg/ml (w/v) Gentamycin verdünnt. Bei Verwendung des pSV2-gpt-Vektors wurde nach 72 h die Selektion stabil transfizierter Zellen durch Zugabe von 0,1-1 µg/ml MPA (Mycophenolsäure), 1x HAT (100 µM Hypoxanthin, 400 nM Aminopterin, 16 µM

Thymidin) und 1,4 mM Xanthin begonnen. Bei Verwendung des pcDNA3-Plasmids startete die Selektion mit G418 ab dem zweiten Tag, bis zu einer Endkonzentration nach 72 h von 0,4-0,65 µg/ml je nach Zelllinien. Alle weiteren Untersuchungen wurden an den durch Verdünnung etablierten Einzelklonen (3.2.1) durchgeführt.

3.1.10 Präparation von RNA aus Eukaryontenzellen

Für Mini-Präparationen zur Isolierung hoch-reiner Gesamt-RNA aus Eukaryontenzellen wurde *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN) und *High Pure RNA Isolation Mini Kit* (Roche) verwendet. Beide Verfahren sind im Prinzip eine Kombination der selektiven Bindungseigenschaften von Glasfaser/Silica-Gel-Membranen und der Mikrospin-Technologie. Ein spezifisches Hochsalzpuffer-System erlaubt die Bindung von bis zu 100 µg RNA aus bis 10^7 Zellen an die Membran. Die Proben werden zunächst in hochdenaturierendem Guanidinium Isothiocyanat (GITC) Puffer lysiert und homogenisiert unter gleichzeitiger Inaktivierung von RNasen. Zugabe von Ethanol liefert dann den optimalen Bindungszustand für RNA. Durch eine zusätzliche DNase I Verdauungsreaktion direkt auf dem Glasvlies (*High Pure RNA Isolation Mini Kit*) werden Reste von kontaminierender DNA abgebaut. Nach einfachen Waschschritten kann die intakte, undegradierete RNA frei von Salzen und zellulären Verunreinigungen in Wasser eluiert werden. Die von der Membran eluierte RNA Moleküle sind länger als 200 Basen, vergleichbar mit den von der CsCl-Gradienten-Aufreinigung, und gebrauchsfertig für Reverse Transkriptionen, Northern Blot, usw..

Zur Überprüfung einer Reihe von Transfektanten wurde auch cytosolische RNA als Template der RT-PCR durch eine schnelle NP40-Lyse isoliert. Ca. 1×10^6 Zellen wurden mit PBS gewaschen und auf Eis gekühlt. Nach Resuspendieren in 80 µl eiskaltem RNA-Lysepuffer wurde diese für eine weitere 1 min inkubiert anschließend bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. Der Überstand wurde zu 10 µl 10% SDS (w/w)/ gegeben, kurz gevortext und für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde noch mal zu 40 µl Phenol (gepuffert) gegeben und ebenfalls extrahiert. Die Präzipitation von RNA erfolgte durch Zugabe von 8 µl 3M KOAC (pH 5,5) und 200 µl Ethanol einschließlich einer Inkubation o/n bei -20°C oder 30 min bei -70°C. Nach Pelletieren der RNA wurde diese mit 70% Ethanol (v/v) gewaschen, getrocknet und schließlich in 15-25 µl H₂O gelöst. Die Präparation von RNA sollte

möglichst unter Anwendung steriler einmaliger Plastikartikel und der durch DEPC-Behandlung RNase-freien H₂O/Puffer schnell durchgeführt werden.

3.1.11 Reverse Transkription

Die *in vitro* angewandte Reverse Transkription dient die Synthese einzelsträngiger cDNA nach einer mRNA-Matrize mit Hilfe der Reversen Transkriptasen, die ursprünglich aus Retroviren isoliert wurden. 1-5 µg Gesamt-RNA wurden mit 1 µl OdT (12-18 Desoxythymidylate) versetzt, 10 min bei 70°C denaturiert und anschließend in ein Eiswasserbad überführt. Die Synthese erfolgte nach Zugabe von 10 U MML-V Reverser Transkriptase und 1 mM dNTP-Mix bei 20 µl Gesamtvolumen und einer Inkubation bei 37°C unter optimierten Pufferbedingungen. Die RT-Ansätze wurden sofort für die PCR weiter verwendet oder bei -20°C gelagert. Die Superscript™ II RNase H⁻ Reverse Transkriptase wurde benutzt, wenn längere RT-PCR Produkte erwünscht waren.

3.1.12 PCR

Die von K. B. Mullis und F. Faloona entwickelte Methode (Mullis et al., 1987) erlaubt eine schnelle und einfache bis 10⁹-fache *in vitro* Vervielfältigung von DNA-Abschnitten mit einer thermostabilen DNA-Polymerase. Im PCR Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 bis 100 µl wurde bis zu 1 ng Plasmid-DNA, genomische DNA oder RT-Ansatz entsprechend 1 µg RNA als Template eingesetzt. Prinzipiell läuft die PCR in 3 Schritten: am Anfang 1-5 min Denaturierung bei 94°C, danach 25-40 Zyklen bestehend aus Denaturierung (94°C), Anhybridisierung (Temperatur je nach Primerpaar), Polymerisation (72°C oder 68°C) und schließlich eine verlängerte Polymerisation für 7 min. Je nach Ziel des Versuchs nimmt man *Taq* DNA Polymerase oder eine Polymerase mit "proof-reading Aktivität" wie *UITma*, oder ein Gemisch beider Typen. Um zu einer erfolgreichen Amplifikation zu kommen müssen unter anderem folgende Punkte berücksichtigt werden: z. B. Wahl des richtigen Primerpaars, Variation der Hybridisierungstemperatur (normalerweise $T_m + 3^\circ\text{C}$, T_m eines Primers: $69,3^\circ\text{C} + 0,41 \times (\text{GC}\%) - 650/\text{Primerlänge}$), Variation der Magnesiumchlorid-Endkonzentration von 1-2 mM, Anwendung der "Hot-Start Technik" (das Enzym und Template erst in das Reaktionsgemisch gelangen lässt wenn eine Temperatur von 94°C erreicht ist) und Optimierung des Templates z.B.

durch Zusatz von DMSO, Formamid oder Glycerin bis zu 10% (v/v), wodurch die Ausbildung von Sekundärstrukturen im Template vermindert und die Spezifität der Amplifikation der GC-reicheren Fragmente vergrößert wird. Amplifizierung der kompletten cDNA (3,7 kb) von SHIP per RT-PCR gelang nur durch Zusatz von 10% (v/v) DMSO. Bei Verwendung der *UITma* Polymerase, die unter optimalen RT-PCR Bedingungen bis zu 2 kb amplifiziert, konnten die PCR-Fehler dadurch jedoch nicht ausgeschlossen werden.

3.1.13 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden basierend auf der Didesoxy-Methode von Sanger (Sanger et al., 1977) unter Verwendung 5'-Cy5-markierter Primer in der PCR durchgeführt. Andere verwendete Substanzen wurden dem *T7 Sequencing Kit* oder *Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit* (Amersham Pharmacia Biotech) entnommen. Die DNA-Fragmente wurden nach Auftrennen in einem PAA-Gel direkt in der DNA-Sequenzierungseinrichtung mit Hilfe eines Computerprogrammes analysiert.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen und Techniken

Alle Zellen wurden in Plastikschaalen oder -flaschen in einem begasbaren Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Die von IIA1.6-Zellen abgeleiteten Transfektanten und die Wt Zellen wurden in Click's Medium/10% FCS (v/v) mit oder ohne Zugabe der entsprechenden Selektionsantibiotika bis zu 3 Wochen lang kultiviert. Die humanen B-Zelllinien Daudi und Ramos wurden in RPMI-Medium/10% FCS (v/v) kultiviert. Die Zelldichte betrug $2 \cdot 10^5$. Die Zellen wurden täglich oder alle zwei Tagen geteilt.

a) Zählen von Zellen

Zur Bestimmung der Zelldichte wurde die Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer unter das Deckgläschen pipettiert. Mehrere Großquadrate wurden im Phasenkontrastmikroskop ausgezählt. Die Zahl der Zellen pro ml ergibt sich durch Multiplikation des Mittelwertes der Großquadrante mit 10^4 .

b) Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden möglichst frische und in gutem Zustand kultivierte Zellen genommen. Diese wurden mit einer 10x höheren Dichte in kaltem, 10% DMSO (v/v) enthaltendem Kulturmedium resuspendiert und o/n bei -70°C eingefroren, bevor sie zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff gestellt werden. Das Auftauen der entsprechenden Einfrierenprobe erfolgte schnell bei 37°C . Sofort wurden die Zellen in 10x Volumen kaltes Kulturmedium überführt, pelletiert und anschließend in vorgewärmtem Medium/10%FCS aufgenommen. Transfektanten wurden erst am zweiten Tag in Selektionsmedium gewechselt.

c) DAPI-Färbung

Zur Kontrolle versteckter Mycoplasmenkontamination wurde die DNA-Anfärbung mittels des Fluoreszenzfarbstoffs DAPI routinemäßig untersucht. Der Test wurde durchgeführt nach der Arbeitsanleitung des Herstellers. Eine nicht-kontaminierte Zellkultur zeigt nur nucleäre Fluoreszenz; Mycoplasmen-infizierte Kulturen zeigen dagegen zusätzlich einzelne fluoreszierende Punkte im Cytoplasma und manchmal auch im interzellulären Raum.

d) Einzelzellklonierung (Subklonierung)

Nach einer Stabiltransfektion wurden die überlebenden Zellen in Selektionsmedium subkloniert. Die Zellen wurden gezählt und in zwei Ansätze mit dem Wachstumsmedium soweit verdünnt, daß 50 bzw. 200 Zellen in 20 ml vorliegen und anschließend jeweils auf einer 96-Well Mikrotiterplatte geteilt. Jede Woche wurde einmal Medium gewechselt, bis mit dem Phasenkontrast sichtbare Zellklone auf eine 24-Well Platte umgesetzt werden können.

3.2.2 Quantitative Bestimmung der Oberflächenfluoreszenz mittels Durchflußcytometrie

Die Durchflußcytometrie (FACS-Analyse) erlaubt eine simultane Messung von drei verschiedenen Fluoreszenzsignalen an einzelnen Zellen neben ihrer relativen Größe und Granularität, die als FSC und SSC bestimmt werden. Fluoreszenz, die durch einen Argonionenlaser bei 488 nm angeregt wird, kann vom FL-1 (FITC/525 nm), FL-2 (PE/580 nm) oder FL-3 (PerCP/625 nm) Detektor aufgenommen werden. Mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern ist es möglich, die Expression der

Zelloberflächenantigene quantitativ zu bestimmen, da die Fluoreszenzintensität mit der Anzahl der gebundenen Antikörper steigt.

Zur Vorbereitung der Proben wurden 3×10^5 Zellen nach Waschen mit Kulturmedium/5% FCS für 30-60 min auf Eis in einer 50 μ l Antikörperlösung (50-200 ng Primärantikörper) mit anschließenden konjugierten Sekundärantikörpern im Dunkeln inkubiert, oder mit direkt fluorochromierten Antikörpern in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung. Nach Entfernen von ungebundenen Antikörpern wurden die Zellen in Medium resuspendiert und direkt im Durchflußcytometer gemessen. Bei Auswertungen mit "Lysis II" Software (Bekton Dickinson) oder "CellQuest" (Macintosh) wird ein Intensitäts-Häufigkeitshistogramm jedes gemessenen Parameters dargestellt, der durchschnittliche Kanalwert einer Zellpopulation wurde als "Mean Value" bezeichnet. Die spezifische Oberflächenfluoreszenz von transfizierten Zellen wurde als " Δ Mean" angegeben, der Kontrollwert ergab sich aus Inkubierung der transfizierten Zellen mit unspezifischen Primärantikörpern oder untransfizierter Zellen mit den gleichen Antikörpern. Die positiven Zellen können beim Sortiermodus sortiert und weiter kultiviert werden.

3.2.3 Analyse des intrazellulären Calciumflusses in IIA1.6-Zellen am Durchflußcytometer (Budde et al., 1994a)

Mit Hilfe des FITC-Derivat tragenden Calciumchelators Fluo-3 kann die relative cytoplasmatische Calciumkonzentration bestimmt werden. Um eine exakte Calciumfluß-Messung zu erhalten, die unabhängig von der Größe und Granularität der gemessenen Zellen ist, wurden die Zellen gleichzeitig mit dem fluorochromen pH-Indikator SNARF-1 beladen (Rijkers et al., 1990). Die Fluo-3 Fluoreszenz wird im Durchflußcytometer im Kanal FL1 (525 nm) und das SNARF-1 Signal im Kanal FL3 (625 nm) aufgenommen. Mit der "Chronys" Software (Becton Dickinson) wurde das Verhältnis beider Signale nach der Formel $50 \times \text{FL1}/\text{FL3}$ gebildet.

IIA1.6-Zellen wurden wie folgt beladen: 1×10^6 Zellen wurden in 1 ml warmes Click's Medium/5% FCS aufgenommen, dazu aus einer DMSO-haltigen Stammlösung 1 μ M Fluo-3-AM, 0,2 μ M SNARF-1 zugegeben, zusammen mit dem Detergenz Pluronic F-127 (Endkonzentration von 0,02% (w/v)). Nach 30 min Inkubation bei 30°C im Dunkeln wurden die Zellen mit 0,5 ml vorgewärmtem Click's/5% FCS verdünnt und

weitere 10 min bei 37°C inkubiert. Abschließend wurden die Zellen mit Krebs-Ringer-Lösung gewaschen, mit einer Dichte von 1×10^7 aufgenommen und bis zur Messung im Dunkeln aufbewahrt.

Bei der Messung wurden die Zellen soweit verdünnt, daß die Flußrate um 200 Zellen/sec lag. Zur Aktivierung der IIA1.6-Zellen wurden endogene BCR (IgG2a) und die transfizierten IgM-Chimärrezeptoren mittels 20 µg/ml F(ab')₂ Kaninchen-Anti-Maus-IgG bzw. -IgM quervernetzt. Die FcγRIIb-Coquervernetzung wurde dadurch bewirkt, daß 30 µg/ml jeweilige komplette Antikörper benutzt wurden. Um den Calciumeinstrom durch Plasmamembran calciumkanäle auszuschließen wurden die Zellen kurz vor der Messung in calciumfreier Krebs-Ringer-Lösung mit 500 µM EGTA aufgenommen. Die gemessene Erhöhung der Calciumspiegel kann nur aus dem ER stammen.

3.2.4 Induktion der Tyrosinphosphorylierung in B-Zellen

a) Stimulation durch Vernetzung von Oberflächenrezeptoren

$1-3 \times 10^7$ IIA1.6-Zellen wurden serumfrei gewaschen und auf 37°C erwärmt. Zum Stimulieren der Zellen wurden endogene BCR (IgG2a) und die transfizierten IgM-Chimärrezeptoren mittels 50 µg/ml F(ab')₂ RαM-IgG bzw. -IgM quervernetzt oder 75 µg/ml jeweiligen kompletten Antikörpern zur FcγRIIb-Coquervernetzung eingesetzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde durch Zugabe von 9 ml eiskaltem PBS/1 mM Na₃VO₄ die Aktivierung gestoppt und zur Immunpräzipitation wurden die Zellen in entsprechendem Lysepuffer lysiert (3.3.5).

b) Pervanadat/H₂O₂ Inkubation (Wienands et al., 1996)

Die Protein-Tyrosinphosphorylierung kann durch die Behandlung der Zellen mit PTPasen-Inhibitor Pervanadat/H₂O₂ verstärkt nachgewiesen werden (Hecht et al., 1992; O'Shea et al., 1992; Schieven et al., 1995). 1 ml 20 mM Na₃VO₄ wurde mit 330 µl 30%-igen H₂O₂ frisch angesetzt und 5 min bei RT inkubiert. Dieses führte zu einer 6 mM Pervanadat/H₂O₂ Lösung. Auf 1 ml Zellsuspension wurden 20 µl einer 1:5 verdünnten Lösung gegeben (entsprechend 100 µM) und die Zellen wurden bei 37°C für 2-5 min inkubiert, bevor sie weiter stimuliert oder lysiert wurden.

3.3 Proteinchemische und immunochemische Methoden

3.3.1 Quantitative Proteinbestimmung

a) Methode nach Lowry (Lowry et al., 1951)

Die Bindung von Kupferionen (LowA) an Proteine in basischem Milieu und die Reaktion von Folin-Ciocalteu Reagenz (LowB) mit aromatischen Aminosäuren entstehen eine Farbreaktion. Bis zu 40 µl Proteinproben mit einem Gehalt von 0,1-1 mg/ml wurden mit 0,1 N NaOH auf 200 µl aufgefüllt und mit 1 ml frisch angesetztem LowA gemischt. Die Ansätze wurden für 10 min im Dunkeln stehengelassen, anschließend mit 100 µl LowB versetzt und nach Mischen für weitere 30 min inkubiert. Gegen eine identisch behandelte proteinfreie Kontrolle wird die OD bei 750 nm gemessen und anhand einer Eichkurve von BSA-Standardlösungen in gleichem Puffer der Proteingehalt der unbekanntenen Proben bestimmt.

b) Methode nach Bradford (Bradford, 1976)

Die Bindung von Coomassie *Brilliant Blue* an Proteine bewirkt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums dieses Farbstoffes von 465 nm zu 595 nm. Zu testende Proben mit 1-20 µg Proteinen in einem Volumen von 100 µl wurden mit 1ml Bradford-Reagenz gemischt und für 2 min inkubiert, wobei die Farbe bis zur einer Stunde stabil bleibt. Als Leerwert wurden 100 µl des verwendeten Proteinpuffers ebenfalls behandelt. Die Absorption wurde bei 595 nm gegen den Leerwert gemessen und die Konzentration der Proteinlösung mit Hilfe einer BSA-Eichgerade berechnet.

Beide Methoden stellen ein sensibles chemisch-photometrisches Verfahren zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen dar. Die Lowry-Methode im Vergleich zur Bradford-Methode ist langsamer, jedoch genauer. Daneben wurde eine schnelle photometrische Methode häufig verwendet. Wegen Tyrosin- und Tryptophanreste haben Proteine ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Die Konzentration wurde gegen die Messung leerer Probe mit Hilfe eines Programms des Photometers automatisch angegeben, wobei OD₂₆₀ und OD₃₂₀ auch benötigt wurden.

3.3.2 SDS-PAGE

Zur analytischen Trennung von Proteinen nach dem Molekulargewicht wurden SDS-Polyacrylamidgele (PAA-Gele) mit diskontinuierlichem Puffersystem verwendet

(Laemmli, 1970). Die Eigenladung der Proteine wird durch Zugabe des anionischen Tensids SDS maskiert. Die Lösung für das Trenngel enthielt 370 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,1% (w/v) SDS und je nach Größe der zutrennenden Proteine 7,5-12,5% (w/v) Acrylamid/0,2-0,33% (w/v) Bisacrylamid. Nach Zugabe von 0,05% (v/v) TEMED und 0,08% (w/v) AMPS polymerisierte das Trenngel und wurde mit Isopropanol zur Verhinderung der Ausbildung eines Meniskus überschichtet. Das Sammelgel setzte sich zusammen aus 3 bzw. 5% (w/v) Acrylamid/0,08 bzw. 0,13% (w/v) Bisacrylamid und 125 mM Tris-HCl (pH 6,8) sowie 0,1% SDS (w/v). Die Polymerisation des Sammelgels wurde durch Zugabe von 0,1% (v/v) TEMED und 0,12% (w/v) AMPS gestartet. Die Proteinproben einschließlich Molekulargewichtsstandard wurden vor dem Gellauf in 2x Laemmli-Puffer zur Denaturierung für 5 min auf 95°C erhitzt. Die vertikale Elektrophorese erfolgte unter Verwendung von SDS-PAGE-Elektrophoresepuffer bei 10-15 mA im Sammelgel und 20-25 mA im Trenngel.

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine wurden die SDS-PAA-Gele zum Western Blot (3.3.3) oder zur direkten Anfärbung (3.3.4) verwendet und anschließend zur Dokumentation photographiert. Zur Lagerung können sie mit dem *DryEase Mini-Gel System* zwischen Celluphanfolien getrocknet werden.

3.3.3 Western Blot

a) Proteintransfer (modifiziert nach Burnette, 1981)

Für den Proteintransfer wurde eine *Semi-dry*-Blotapparatur verwendet. Das SDS-PAA-Gel, das aufgetrennte Proteinproben enthielt, wurde für 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Während des Transfers dienten auf jeder Elektrodenseite 3 Lagen in Transferpuffer getränktes 3MM-Whatmanpapier in Gelgröße als Pufferreservoir. Bei Verwendung von Nitrozellulosemembranen war es ausreichend diese vor dem Transfer in Transferpuffer zu tauchen, während PVDF-Membranen vorher kurz mit Methanol benetzt werden mußten. Der vertikale Transfer erfolgte mit 3 mA/cm² Gel für maximal 1,5 h.

Die Effizienz des Transfers wurde durch reversible Anfärbung der Membran mit Ponceau S überprüft (3.3.4).

b) Antikörper Inkubation und Detektion

Der erste Schritt ist die Absättigung mit *Blocking*-Puffer für 1 h bei RT oder o/n bei 4°C, um leere Bindungsstellen der Membran zu blockieren. Die Inkubation mit antigenspezifischen Primärantikörpern erfolgte für 30 min bis 1,5 h bei RT oder o/n bei 4°C, anschließend 1 h bei RT mit unspezifischen Sekundärantikörpern. Für einen sogenannten "Far-Western Blot" wurde die Membran vor der Antikörperinkubation zuerst mit den Antigenen inkubiert werden.

Mit Hilfe von Peroxidase-markierten Sekundärantikörpern und dem ECL Detektionssystem nach Anweisungen des Herstellers können bis zu 1 pg Proteine nachgewiesen werden, dabei oxidiert das Enzym Luminol und die Energie wird in Form von Licht freigesetzt. Durch exzessive Waschschrte mit PBS/T wurde ungebundene Antikörper entfernt, um einen geringeren Hintergrund des ECL-Films zu erreichen. Diese Methode bietet die Möglichkeit, die Immunblots wieder zu *strippen* und mit weiteren Antikörpern zu inkubieren.

Zum Detektieren größerer Proteinmengen können andere Substrate der Peroxidase z. B. 4-Chlor-Naphtol verwendet werden. 9 mg des Substrates wurden zuerst in 3 ml Methanol gelöst, mit PBS auf 50 ml aufgefüllt, und mit 15 µl H₂O₂ versetzt. Die Membran wurde nach der Inkubation mit sekundären Antikörpern dreimal mit PBS/T gewaschen, und anschließend mit frisch angesetztem Entfärber solange inkubiert bis die Banden auftauchten. Durch Zugabe von H₂O konnte die Farbentwicklung gestoppt werden. Außerdem können Zielproteine mittels Alkalischer Phosphatase-konjugierten Sekundärantikörpern nachgewiesen werden. Nach 3 Waschschrten für jeweils 5 min wurde die Membran mit AP-Puffer äquilibriert und mit 200 µl Stammlösung der Substrate NBT/BCIP in 10 ml einer Farbentwicklung inkubiert. Die Reaktion wurde durch Waschen mit Wasser gestoppt.

c) Stripping von Immunblots

Zur Entfernung auf einem Western Blot gebundener Antikörper wurde dieser für 30 min mit *Stripping*-Puffer bei 50°C unter leichtem Schütteln behandelt. Nach intensivem Waschen für mindestens 1 h mit PBS/T konnte der Blot mit den nächsten Antikörpern inkubiert werden.

3.3.4 Proteinfärbung

a) Silberfärbung von Proteingelen (Damerval et al., 1987)

Proteine in geringen Mengen (bis zu 5 ng/Bande) können mit Silberfärbung im SDS-PAA-Gel sichtbar gemacht werden. Zunächst wurden die Proteine 15 min mit Entfärber-Lösung fixiert und oxidierende Agenzien mit Hilfe von Thiosulfat aus dem Gel entfernt. Das Gel wurde nach der 2 min *Farmers Reducer* Behandlung durch mehrere Waschschriffe mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ vollständig entfärbt, für 15-30 min in 0,1% (w/v) Silbernitratlösung inkubiert, kurz mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen und schließlich in 2,5% (w/v) Na_2CO_3 -Lösung gewechselt. Die an die Proteine gebundenen Silberionen wurden durch Zugabe von 0,1% (v/v) Formaldehyd in basischem Milieu zu Silber sichtbar reduziert. Die Farbentwicklung wurde mit 10% (v/v) Essigsäure abgestoppt.

b) Coomassiefärbung von Proteingelen und auf PVDF transferierten Proteinen

Mit der Coomassiefärbung erreicht man zwar nicht eine hohe Empfindlichkeit wie mit der Silberfärbung, jedoch lässt sich die Bande quantitativ erfassen. Deswegen wurde normalerweise diese Färbung für rekombinante Proteine verwendet. SDS-PAA-Gele wurden zuerst 30 min in Coomassie-Entfärber unter Schütteln fixiert, 10 min in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen und anschließend 45 min in Coomassielösung inkubiert. Die Gele wurden solange mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen bis der Hintergrund verschwand. Für auf PVDF-Membran transferierte Proteine wurde zunächst eine Inkubation für 15-30 min in Coomassielösung durchgeführt, es erfolgten dann einige Waschschriffe mit Coomassie-Entfärber bis die Banden deutlich sichtbar waren.

c) Ponceaufärbung von Proteinen auf Membranen

Die auf Membranen transferierten Proteine wurden durch kurze Inkubation in Ponceau-Lösung und nachfolgendes Waschen mit Wasser detektiert. Bei dieser Gelegenheit konnte der Protein-Marker abgeschnitten und getrocknet werden. Vor der weiteren Behandlung wurde die Nitrozellulosemembran mit PBS zur Entfernung des Farbstoffs gewaschen, während PVDF-Membranen besser mit 0,1 M NaOH entfärbt wurden.

3.3.5 Immunpräzipitation und Affinitätsbindung

a) Immunpräzipitation von chimärem IgM-Rezeptor

3×10^7 Zellen wurden nach Induktion der Tyrosinphosphorylierung (3.1.4) in 1 ml RIPA-Puffer für 30 min bei 4°C im Schüttler lysiert und anschließend unlösliches Material abzentrifugiert. 20 µl Anti-mIgM-Agarose, äquilibriert in RIPA-Puffer, wurde zu dem Lysat gegeben. Um Phosphotyrosine nachzuweisen, wurde die Lysat-Agarose-Mischung o/n in einem Drehinkubator inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit RIPA-Puffer, zweimaligem mit RIPA-Puffer/600mM NaCl und schließlich einmaligem Waschen mit RIPA-Puffer wurden gebundene Proteine durch Kochen in β -Mecaptoethanol-haltigem Laemmli-Puffer eluiert.

Zur Copräzipitation der IgM/Ig α oder IgM/Ig β chimären Rezeptoren und assoziierter Protein-Tyrosinkinase bei der Coquervernetzung von den Chimärrezeptoren und Fc γ RIIb wurden 5×10^7 Zellen nach der Stimulation in 1 ml RIPA-Puffer nur mit 1% (w/v) Triton X-100 für 30 min auf Eis lysiert. Nach Zentrifugation bei 14000x g und 4°C wurde der Überstand o/n mit 20 µl Anti-mIgM-Agarose inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit dem Lysepuffer und zweimaligem Waschen mit dem Kinase-Assay-Puffer wurden die Proben in einem *In vitro* Kinase-Test analysiert (3.3.6).

b) Repräzipitation von IgM-Chimärrezeptor-assoziierten Protein-Tyrosinkinase (Ghazizaadeh et al., 1994; Bewarder et al., 1996)

Nach dem Kochen in 1% (w/v) SDS beim *In vitro* Kinase-Test (3.3.6) wurden eluierte Proteine in 900 µl RIPA/1% (w/v) Triton X-100 aufgenommen. 20 µl *GammaBind* G-Sepharose wurde zu der Probe gegeben, um den endogenen BCR vor der Präzipitation der IgM-Chimärrezeptoren aus den Zellysat zu entfernen. Nach 1 h Inkubation bei 4°C auf einem Drehinkubator und kurzer Zentrifugation erfolgte die Repräzipitation der Kinasen durch Zugabe von 5 µl Lyn- oder Fyn-spezifischem Antiserum, 20 µl *GammaBind* G-Sepharose und eine zweistündige Absorption. Die an Sepharose gebundenen Proteine wurden kurz mit dem Lysepuffer gewaschen und anschließend mit 15 µl 2x Laemmli-Puffer (reduzierend) eluiert.

c) Immunpräzipitation von Fc γ RIIb

Zur Immunpräzipitation des Fc γ RIIb wurde der monoklonale Antikörper KB61 eingesetzt. Nach Lysieren der stimulierten Zellen in RIPA-Puffer wurde 1 μ l Ascitesflüssigkeit pro Ansatz zugegeben und für mindestens 10 min inkubiert, bevor 20 μ l *GammaBind* G-Sepharose eingesetzt wurden. Zum Nachweis tyrosinphosphorylierter Proteine erfolgten die Immunpräzipitation und die Waschschriffe wie oben geschrieben.

d) GST-SH2 bzw. -SH3 Domäne Affinitätsreinigung (modifiziert nach Baumann et al., 1994)

Etwa 1×10^7 Zellen wurden in 1 ml NP40-Lysepuffer für 20 min auf Eis lysiert. Lösliches Zellysate wurde zuerst mit 10 μ g GST und 25 μ l Glutathion-Sepharose für 2 h bei 4°C auf einem Drehinkubator vorinkubiert. Nach dem Abzentrifugieren wurde der Überstand mit 5-10 μ g an Glutathion-Sepharose (Volumen ca. 25 μ l) gebundenen GST-Fusionsproteinen o/n weiter inkubiert. Die Glutathion-Sepharose wurde dann dreimal mit 1 ml eiskaltem Lysepuffer gewaschen und anschließend in 20 μ l reduzierendem 2x Laemmli-Puffer aufgekocht.

e) Immunpräzipitation von SHIP

Mit den von mir hergestellten polyklonalen Antikörpern gegen katalytische Domäne und gegen SH2-Domäne von SHIP können nur rekombinante Proteine präzipitiert werden, nicht aber endogene SHIP (oder nicht effizient genug). Mit Hilfe des polyklonalen Anti-NPXY-Antikörpers "SHIP#5", der uns von Dr. M. Jücker (Hamburg) freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde, konnte die Immunpräzipitation des endogenen SHIP erfolgreich durchgeführt werden. IIA1.6-Zellen wurden in 1% NP40-Lysepuffer lysiert und die Konzentration des Lysates nach der Methode von Lowry quantitativ bestimmt. 1 μ g "SHIP#5"-Antiserum wurde benutzt, um aus 1×10^7 Zellen (ca. 1,5 mg Proteine) SHIP quantitativ zu präzipitieren.

3.3.6 In vitro Kinase-Test (Bewarder et al., 1996)

In Kinase-Assay-Puffer äquilibrierte Matrix-gebundene Immunkomplexe wurden in 15 μ l Kinase-Assay-Puffer/1 μ M ATP/10 μ Ci γ -³²P-ATP (spezifische Aktivität: 5000 Ci/mmol; Hartmann Analytik, Braunschweig) für 15 min bei 30°C inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit dem Lysepuffer RIPA/1% (w/v) Triton X-100 wurden gebundene Proteine mit 100 μ l 1% (w/v) SDS aufgekocht. Mittels des Kinase-

spezifischen Antiserums repräzipitierte Proteine (3.3.5) wurden im SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und schließlich auf eine PVDF-Membran transferiert. Zur Hydrolyse von Phosphoserin und Phosphothreonin wurde die Membran mit 1 M KOH für 1 h bei 55°C inkubiert, anschließend getrocknet und in Celluphan eingewickelt. Die Detektion der radioaktiv-markierten Proteine erfolgte mittels Autoradiographie unter Verwendung eines Bio-Imagers (Fujix BAS 1000).

3.3.7 Expression und Affinitätsreinigung rekombinanter Proteine

a) Induktion der Fremdproteinexpression in *E. coli*

Mehre Klone wurden für die Testexpression verwendet. Aus einer Vorkultur wurden Bakterien bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 37°C und 250 rpm kultiviert (OD₆₀₀ 0,7-0,9). Nach dem Standardprotokoll der Firma Amersham Pharmacia Biotech und QIAGEN wurde IPTG in einer Endkonzentration von 1-2 mM zu der Kultur gegeben und diese weiter kultiviert. Von 0 bis 5 h wurde je eine Probe abgenommen, abzentrifugiert und bis zur nativen Aufarbeitung bei -70°C aufbewahrt. Um eine optimale Expression löslicher rekombinanter Proteine zu erhalten, können die IPTG-Konzentration bis auf 0,005 mM und die Wachstumstemperatur bis auf RT reduziert werden. Alternativ kann 2-YT Medium statt LB verwendet werden.

b) Native Aufarbeitung der Fusionsproteine aus der Testexpression

Nach Abbau der Zellwand durch Inkubation der Bakterien mit 1 mg/ml Lysozym für 30 min auf Eis wurden die Zellen anschließend durch Zugabe von 1-2% (w/v) Triton X-100 lysiert. DNA und RNA wurden durch Zugabe von 5 µg/ml DNase I und 10 µg/ml RNase A verdaut oder durch eine Kanüle (20 G) geschert. Aus dem Proteingemisch wurden GST-Fusionsproteine an Glutathion-Sepharose aufgereinigt und mit reduzierendem Glutathion eluiert. Zur Aufarbeitung His₆-Fusionsproteine wurde Ni²⁺-NTA-Agarose verwendet. Die Elution der Proteine erfolgte durch Zugabe von Imidazol.

c) Bestimmung der Lokalisation von in *E. coli* exprimierten Proteinen

Kann das Fremdprotein nicht erfolgreich unter nativen Bedingungen aufgearbeitet werden, liegt es wahrscheinlich in sogenannten "*inclusion bodies*" in aggregierter

Form vor. In seltenem Fall kommt das Protein membranassoziiert vor und kann nach dem Protokoll der Firma QIAGEN durch zusätzliches EGTA extrahiert werden.

d) Denaturierende Aufarbeitung von His₆-Fusionsproteinen an Ni²⁺-NTA-Agarose (nach dem Protokoll der Firma QIAGEN)

Zur Denaturierung unlöslicher Fusionsproteine wurde normalerweise 8M Harnstoff (Puffer B) verwendet, bei sehr schwer löslichen Proteinen sogar 6M Guanidiniumhydrochlorid. In saurem Milieu (Puffer C) wurde die Bindungsstärke gesenkt, wodurch unspezifisch gebundene Proteine entfernt wurden. Die Elution des Proteins erfolgte mit EDTA. Die *inclusion bodies* können vom Rest des Zellinhalts isoliert und getrennt denaturierend aufgearbeitet werden, um den Anteil an komplettem im Verhältnis zu degradiertem Fusionsprotein zu steigern. Die unter nativen Bedingungen gewonnenen Proteine können direkt zur Immunisierung verwendet werden (3.3.10).

e) Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen an Glutathion-Agarose/Sepharose unter nativen Bedingungen im großen Maßstab

Ein Bakterienpellet von 250 ml wurde in 1,5 ml Puffer 1 resuspendiert und 30 min auf Eis stehen gelassen. Das Volumen wurde mit Puffer 2 auf 15 ml vergrößert. Es wurde resuspendiert und die DNA geschert. Nach 15 min Abzentrifugieren bei 25000x g wurde der Überstand auf mit Puffer 2 äquilibrierte Glutathion-Sepharose oder Glutathion-Agarose gegeben. Es erfolgte eine 45 min Inkubation auf einem Drehinkubator oder auf gepackte Säule mit einer Flußrate von maximal 1 ml/min bei 4°C. Glutathion-Agarose/Sepharose wurden in der Säule mit 10 fach Volumen 50 mM Tris-HCl/1% (w/v) Triton X-100 (pH 8,0) und anschließend 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) solange gewaschen, bis kein Protein mehr spektroskopisch zu detektieren war ($OD_{280} \leq 0,01$). Die Elution des GST-Fusionsproteins erfolgte mit 50 mM Tris-HCl/10 mM Glutathion (pH 8,0) und einer Flußrate von ca. 0,5 ml/min. Die Fraktionen wurden im Photometer und SDS-PAGE getestet.

Eluierte SHIP SH2-Domäne wurde durch Centricon in PBS gewechselt und zur Herstellung polyklonaler Antikörper (3.3.10) verwendet. Alternativ wurden die Matrix-gebundenen rekombinanten Proteine, in dieser Arbeit alle GST-SH2 bzw. -SH3 Domänen, zur Immunpräzipitation der SHIP-Proteine (3.3.5) direkt verwendet.

f) Aufreinigung und Renaturierung von enzymatisch aktiven GST-Fusionsproteinen an Glutathion-Sepharose mittels Sarcosyl (Frangioni et al., 1993)

Sarcosyl (N-Lauroyl-Sarcosin) kann die meisten unlöslichen GST-Fusionsproteine solubilisieren, eine nachfolgende Behandlung mit nicht ionischen Detergenzien, z. B. Triton X-100, erlaubt die Bindung des Proteins an Glutathion-Sepharose mit hoher Affinität. Die Bakterien wurden in STE-Puffer suspendiert und nach der Lysozym Behandlung mit 5 mM DTT und 1,5% Sarcosyl versetzt. Die Lyse erfolgte durch Ultraschallbehandlung oder Scheren mittels einer Kanüle (20 G). 2-4% Triton X-100 wurde zum Lysat gegeben und gut gemischt, bevor dieses mit Glutathion-Sepharose inkubiert wurde.

Zur Aufarbeitung der enzymatisch aktiven katalytischen Domäne von SHIP wurden die Bedingungen nach dem Renaturierungsprinzip (Wingfield et al., 1995) die Bedingungen getestet und etabliert. Um die intermolekularen Wechselwirkungen zu vermeiden, wurde die Rückfaltung an Glutathion-Sepharose durchgeführt. Sarcosyl wurde bei Verdünnung oder mit Hilfe eines Gradienten von 1% bis zu sehr niedriger Konzentration (< 0,1%) entfernt. Dieser Prozeß sollte mindestens 1,5 h dauern, bis die Proteine in HEPES-Puffer mit 150 mM NaCl (pH 8,0) gewechselt wurden, um die Rückfaltung zu erleichtern.

g) Thrombinspaltung von aufgereinigten GST-Fusionsproteinen (nach Guan et al., 1991; Amersham Pharmacia Biotech, 1994)

Der GST-Teil der Fusionsproteine kann durch Thrombin abgespalten werden. Die Spaltung wurde 2h bis o/n im von Roche empfohlenen Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 227 mM NaCl) oder einem HEPES-Puffersystem mit einem pH-Wert gleich oder größer als 8,0 durchgeführt. 0,16 mU-BM entsprechend 1,3 mU-NIH wurden für die Spaltung von 1 µg an Glutathion-Sepharose gebundenen Fusionsproteinen verwendet.

3.3.8 Protein-Sequenzierung

Die Protein-Sequenzierung wurde durch die Arbeitsgruppe BC I (Prof. Dr. H. Tschesche) mittels HPLC durchgeführt. Die Proteine sollen möglichst rein vorliegen, und die N-terminale Aminogruppe darf nicht blockiert sein.

Ca. 100 pmol zusequenzierendes Protein (bei relativer Molmasse von 10 kDa entspricht das 1 µg) wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Borat-Puffer auf eine PVDF-Membran transferiert (3.3.3). Die Membran wurde zusätzlich mit 1 mM DTT in der Coomassie-Lösung gefärbt (3.3.4) und dann der Hintergrund bis zu einer schwachen Blaufärbung entfärbt. Die Membran sollte getrocknet, sofort in Folie eingeschweißt und bei 4°C bis zur Sequenzierung aufbewahrt werden.

3.3.9 Substrattest für SHIP

Die rekombinante in *E. coli* exprimierte katalytische Domäne von SHIP wurde in Sarcosyl-haltigem Puffer solubilisiert und an Glutathion-Sepharose aufgereinigt (3.3.6). Nach Abspaltung des GST-Teils wurde das Protein durch Centricon einengt und in 20 mM HEPES-Puffer/150 mM NaCl (pH 7,0) aufgenommen und schließlich mit 40% (v/v) Glycerin versetzt. Der nicht-radioaktive Test mit I-1,3,4,5-P₄ wurde extern bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. W. Mayr (Hamburg) durchgeführt und in der HPLC vermessen (Guse et al., 1995).

3.3.10 Herstellung von polyklonalen Antikörpern

Die polyklonalen Antikörpern gegen SH2-Domäne bzw. katalytische Domäne von SHIP wurden extern bei der Firma Eurogentec hergestellt. Nach einem Standardprotokoll wurde bis zu 100 µg Antigenen pro Injektion und pro Kaninchen verwendet. Am Tag 0 das Präimmunserum (PIS) wurde abgenommen, gefolgt von der ersten Injektion. Man erhält nach der zweite Injektion (am Tag 14) und der dritte (am Tag 28) 2 ml der ersten Serumabnahme (STB). Die zweite Serumabnahme (LTB) von 2+20ml wurde nach der vierten Injektion (am Tag 56) abgenommen. Falls keine weitere Immunisierung gefordert, wurde die vollständige Serumabnahme (FB) von 50-60 ml zwei Wochen später durchgeführt.

Die Aufreinigung von Gesamt-IgG erfolgte durch Affinitätsbindung an Protein-A-Sepharose.

4 ERGEBNISSE

4.1 Negative Regulation von $Ig\alpha/Ig\beta$ in der Signaltransduktion

Die Frage, wie die Tyrosinphosphorylierung von BCR bzw. $Fc\gamma$ -Rezeptoren gesteuert wird, als wesentlicher Schritt, der zur B-Zell-Immunantwort führt, wurde bis jetzt nicht aufgeklärt. Das von unserem Labor etablierte Modellsystem bietet die Möglichkeit, den Einfluß von einzelnen $Fc\gamma$ RIIb-Isoformen auf die B-Zell-Aktivierung zu untersuchen (Budde et al., 1994b). Um zu untersuchen, ob die ITAM von $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ ähnliche Fähigkeiten bei der Initiation der negativen Signalübermittlung durch den $Fc\gamma$ RIIb1 besitzen, wurden zwei chimäre Rezeptoren $IgM/Ig\alpha$ oder $IgM/Ig\beta$ (Abb. 4) in die B-Zelllinie IIA1.6 cotransfiziert, die bereits entweder $Fc\gamma$ RIIb1 oder $Fc\gamma$ RIIb2 stabil exprimiert.

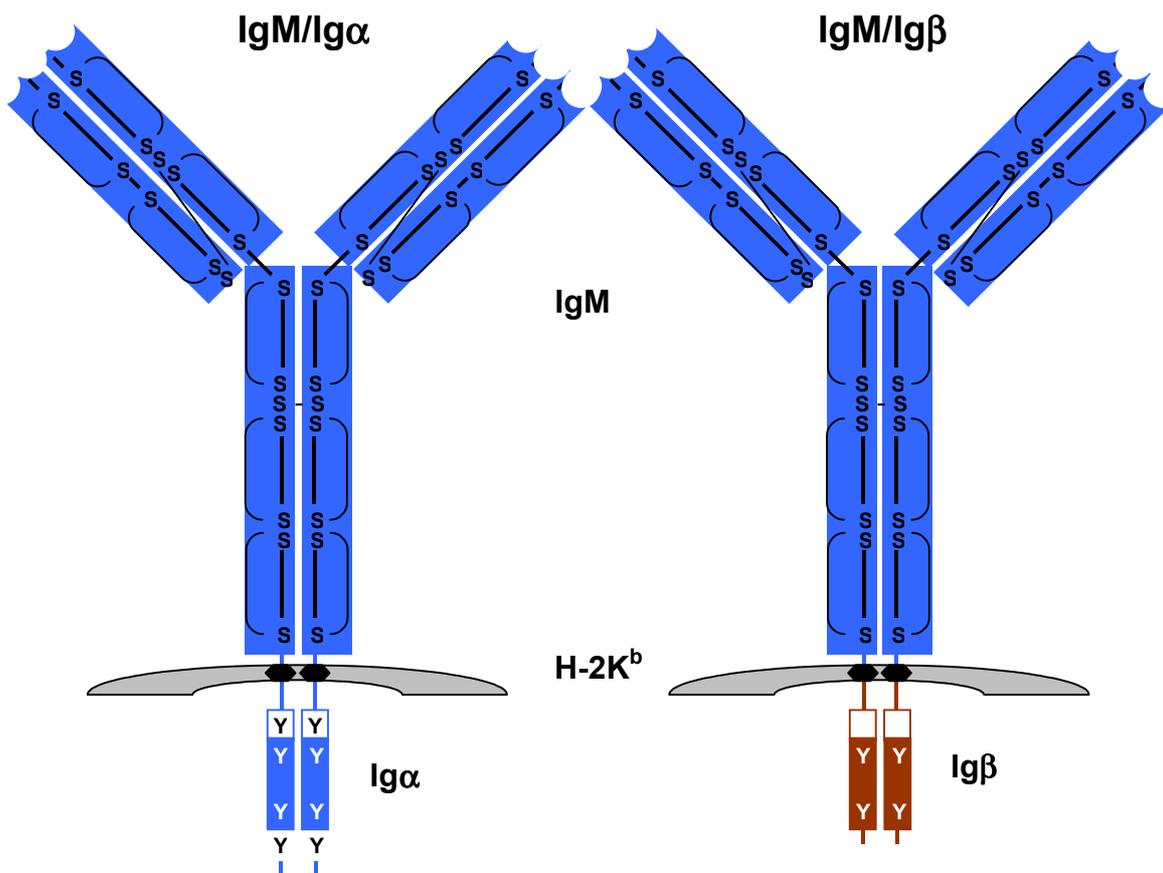


Abb. 4 Schematischer Aufbau der chimären Rezeptoren $IgM/Ig\alpha$ und $IgM/Ig\beta$. Die chimären Antigenrezeptoren bestehen extrazellulär aus einem IgM-Molekül, das mit der Transmembrandomäne eines MHC-I-Moleküls fusioniert wurde. Der cytoplasmatische Teil entspricht der signalvermittelnden Domäne von $Ig\alpha$ bzw. $Ig\beta$.

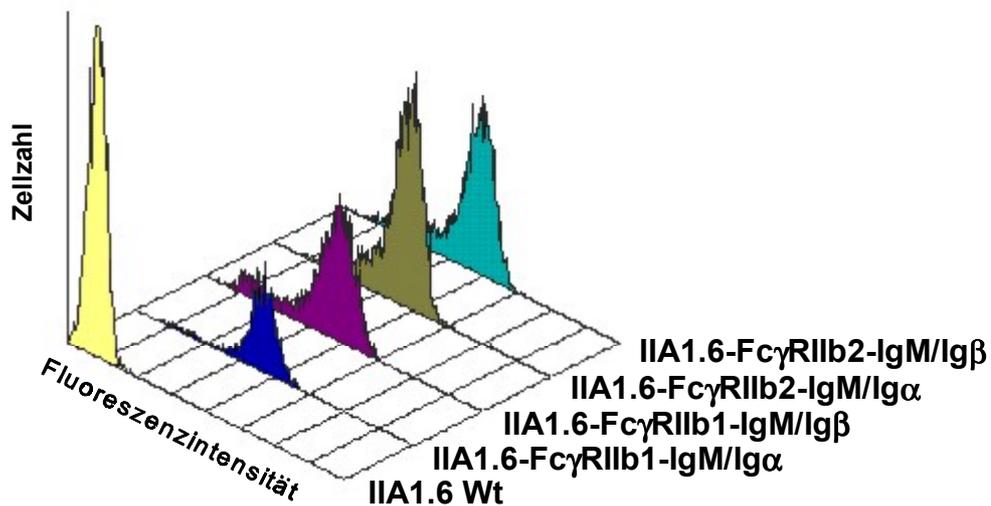
Beide ursprünglich für Antigen-Präsentationsstudien konstruierte Rezeptoren enthalten eine extrazelluläre Region von IgM/ λ , die spezifisch für das Hapten 5-iodo-4-hydroxy-3-nitrophenacetyl (NIP) ist, fusioniert mit der Transmembrandomäne eines MHC-I-Moleküls (Patel et al., 1993; Aluvihare et al., 1997). Die cytoplasmatische Teile dieser Konstrukte, deren Sequenzen durch DNA-Sequenzierung überprüft wurden, entsprechen denen von Wt Ig α und Ig β und erhalten die ITAM.

Das verwendete Modellsystem bietet den Vorteil, daß der endogene BCR (IgG2a) und der chimäre IgM-Rezeptor durch die Wahl unterschiedlicher Antikörper im gleichen Zellklon unabhängig stimuliert werden können. Dadurch können die beiden Rezeptorvernetzung-induzierten Signale trotz klonspezifischer Unterschiede, die die Interpretation vieler Ergebnisse erschweren, verglichen werden. Die Untersuchung von IgM/Ig β wurde bereits von V. Weinrich durchgeführt (Weinrich, 1997). Die Ergebnisse zeigen keine Unterschiede in der negativen Signaltransduktion nach Fc γ RIIb-Coquervernetzung mit dem sIgG und mit dem IgM/Ig β . Der Effekt von IgM/Ig α wird in dieser Arbeit nachfolgend untersucht.

4.1.1 Expression des IgM/Ig α -Chimärrezeptors in Fc γ RIIb1- und Fc γ RIIb2-exprimierenden IIA1.6-Zellen

Im ersten Schritt der Arbeit wurden Fc γ RIIb1- und Fc γ RIIb2-exprimierende IIA1.6-Zellen mit dem IgM/Ig α -Konstrukt transfiziert, und nach Selektion mit MPA, HAT sowie Xanthin als stabile Einzelzellklone etabliert. Mittels FACS-Analyse wurden nur die Fc γ RIIb-positiven transfizierten Klone ausgewählt und dann die Expression der schweren Kette des IgM/Ig α -Chimärrezeptors dieser Klone mit Hilfe von Anti-Maus-IgM-Antikörpern (μ -spezifisch) bestimmt. Die doppelpositiven Zellklone, die in den weiteren Experimenten verwendet wurden, zeigten eine eindeutige Oberflächenexpression von IgM/Ig α , jedoch in niedrigerem Ausmaß im Vergleich zu den besten IgM/Ig β Klone, während die Fc γ R-Oberflächenexpression der Klone vergleichbar war (Abb. 5). Die NIP-spezifische Maus λ 1 leichte Kette (oder L-Kette), die auch in den IgM/Ig α - und IgM/Ig β -Konstrukte enthält aber dessen Expression unter Kontrolle eines CMV-Promoters ist, konnte in den verwendeten Zellklonen nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

A. anti Fc γ RII:



B. anti mIgM:

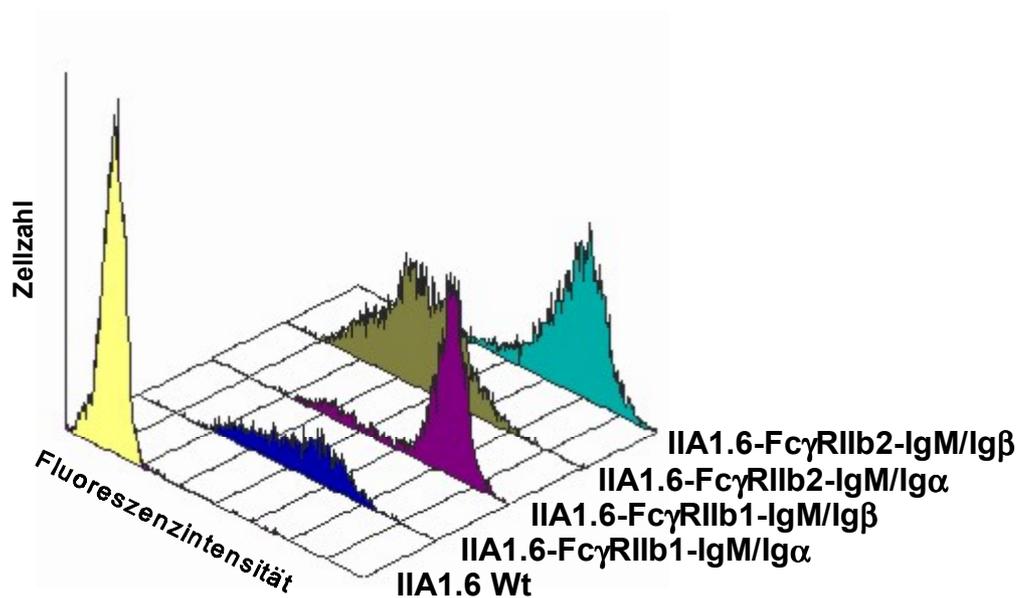


Abb. 5 IgM/Ig α - und IgM/Ig β -Oberflächenexpression der transfizierten IIA1.6-Fc γ RIIb1- oder -Fc γ RIIb2 Zellen. Die relative Anzahl der auf der Oberfläche exprimierten Rezeptoren wurde durchflußcytometrisch bestimmt. Eingesetzt wurden FITC-konjugierte Fc γ RII-spezifische mAk AT10 (A) und PE-markierte Anti-mIgM-Antikörper (B). Auf einer linearen Achse wurde die Zellzahl gegen die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (*mean values*) aufgetragen. Die Kontrollwerte ergaben sich alles der Messung untransfizierter IIA1.6-Zellen.

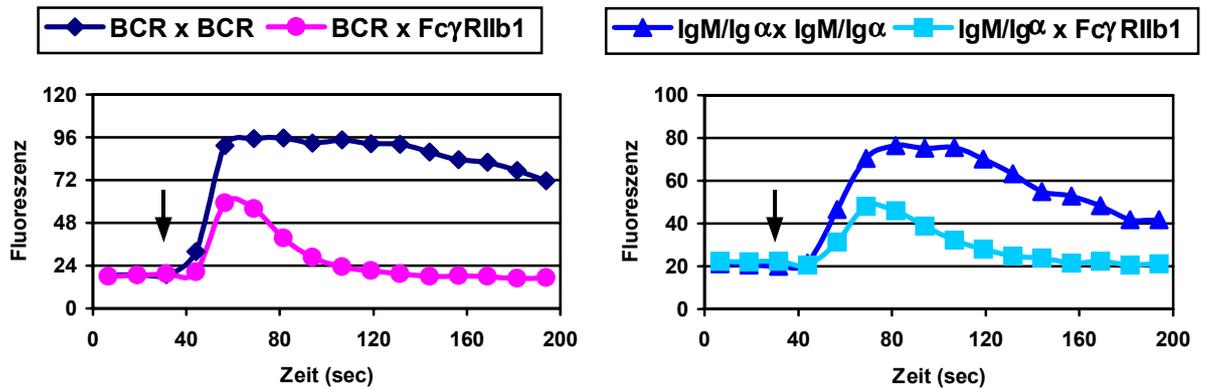
Eine ähnliche ebenfalls höhere Expression desselben IgM/Ig β -Konstruktes im Vergleich zur IgM/Ig α -Expression wurde bereits früher beobachtet (Aluvihare et al., 1997; Teh et al., 1997). Wichtig ist vor allem, daß die Zellen mit Anti-IgM-Antikörpern über IgM/Ig α gut stimuliert und die dadurch induzierten Signale bzw. die Inhibition dieser Signale durch Fc γ RIIb-Isoformen genau analysiert werden können.

4.1.2 Inhibierung des IgM/Ig α -induzierten Calciumionenanstiegs nach der Fc γ RIIb-Coquervernetzung

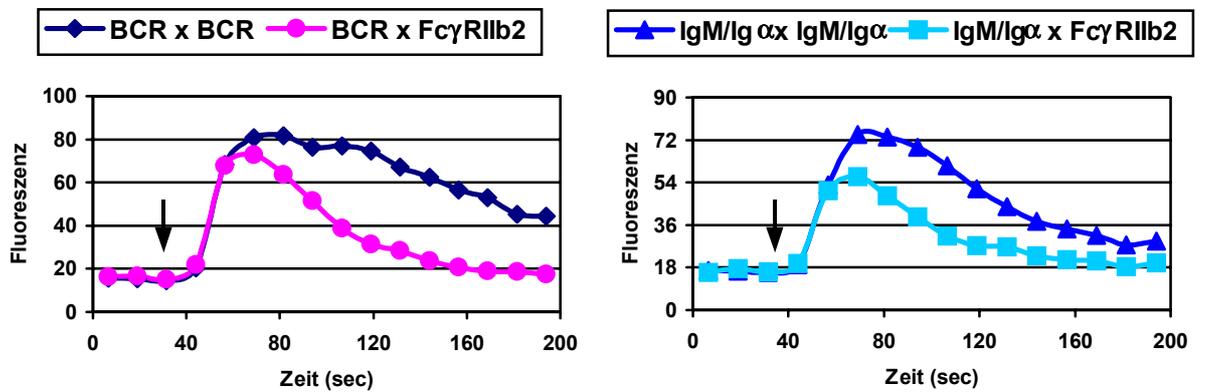
Zuerst wurde die relative freie Calciumkonzentration in dem Cytosol analysiert, denn der erhöhte cytosolische Calciumspiegel führt zur Aktivierung vieler calciumabhängiger Enzyme und ist für die Proliferation und Differenzierung der B-Zelle notwendig. Wird hingegen der Antigenrezeptor durch Antigen:Antikörper-Komplex mit dem Fc-Rezeptor coquervernetzt, so führt dies u. a. zu einem erniedrigten Calciumspiegel. Untersuchungen haben schließlich gezeigt, daß dieser verringerte Calciumspiegel durch die Verhinderung des Öffnens von Calciumkanälen in der Plasmamembran der B-Zellen verursacht wird (Choquet et al., 1993; Budde et al., 1994b).

Stimulationen mit F(ab')₂-Fragmenten der polyklonalen Kaninchen-Anti-Maus-IgM- (μ -spezifisch) oder -Anti-Maus-IgG-Antikörper (H+L) konnten zeigen, daß ein nahezu identischer Calciumionenanstieg im Cytosol in allen gemessenen Zellklonen durch sowohl sIgG-Vernetzung als auch IgM/Ig α -Vernetzung ausgelöst wird. Werden entsprechende komplette Antikörper zugegeben, so kommt es zur Coquervernetzung einer Fc γ RIIb-Isoform. Im Vergleich zur Rezeptorvernetzung verhinderten sowohl Fc γ RIIb1 als auch Fc γ RIIb2 deutlich den sonst lang anhaltenden erhöhten Calciumspiegel bei der Coquervernetzung (Abb. 6A1/2). Es konnte so gezeigt werden, daß die Inhibition des IgM/Ig α -vermittelten Calciumeinstroms durch Fc γ RIIb und die Inhibitionen nach Fc γ RIIb-Coquervernetzung mit sowohl dem sIgG als auch dem IgM/Ig β (Weinrich, 1997) vergleichbar sind.

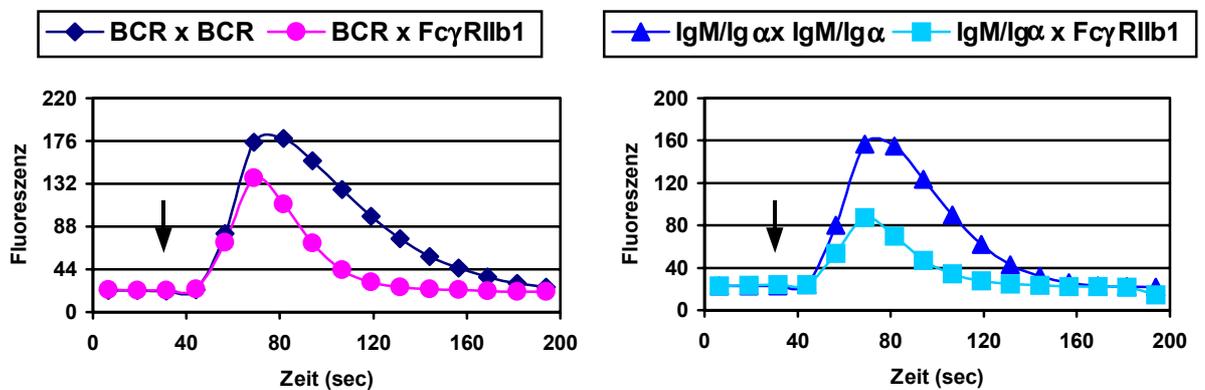
A1. Calciumflux-Analyse: IIA1.6-FcγRIIb1-IgM/Igα



A2. Calciumflux-Analyse: IIA1.6-FcγRIIb2-IgM/Igα



B1. Calciumflux-Analyse/ohne Ca²⁺: IIA1.6-FcγRIIb1-IgM/Igα



B2. Calciumflux-Analyse/ohne Ca²⁺: IIA1.6-FcγRIIb2-IgM/Igα

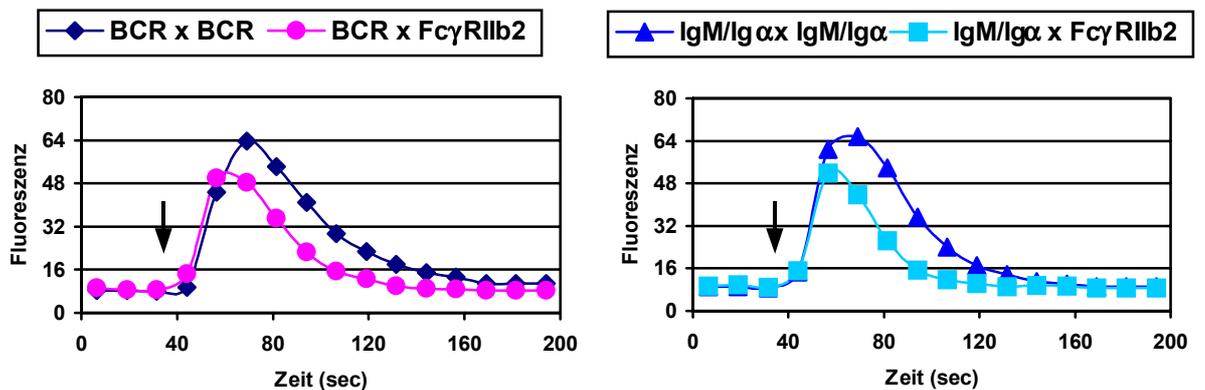


Abb. 6 Inhibition des Calciumionenanstiegs nach Coquervernetzung von sIgG bzw. IgM/Ig α und Fc γ RIIb. Die relative freie Calciumkonzentration in der Zelle wurde mit Hilfe des Farbstoffs Fluo-3 im Durchflußcytometer bis zu 200 sec lang in calciumhaltiger Krebs-Ringer-Lösung (A1 und A2) oder in calciumfreier Krebs-Ringer-Lösung/0,5 mM EGTA (B1 und B2) gemessen. Die Stimulierung der IIA1.6-Zellen, die Fc γ RIIb1 und IgM/Ig α exprimieren oder Fc γ RIIb2 und IgM/Ig α exprimieren, ist durch einen Pfeil markiert: zur Quervernetzung von sIgG bzw. IgM/Ig α wurde 20 μ g/ml F(ab')₂ der R α M-IgG (H+L) bzw. -IgM eingesetzt; mit 30 μ g/ml intakten Antikörpern wurde Fc γ RIIb mit dem entsprechenden Antigenrezeptor coquervernetzt.

Um für das biphasische Calciumsignal den Ausstrom von Calcium aus dem ER und nachfolgenden Einstrom von Calcium über die Plasmamembran zu trennen, wurden die Zellen in calciumfreiem und EGTA-haltigem Puffer stimuliert. Hierbei ergab sich eine frühzeitige Beendigung der Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern durch die Fc γ RIIb-Coquervernetzung abgesehen von der Hemmung des Calciumeinstroms über die Plasmamembran (Abb. 6B1/2). Interessanterweise wurde die initialen Calciumfreisetzung nur bei Coquervernetzung von IgM/Ig α und Fc γ RIIb1 stark beeinträchtigt, während die Inhibition des Calciumflusses nach Fc γ RIIb2-Coquervernetzung mit dem IgM/Ig α unter dieser Bedingung vergleichbar mit der nach Coquervernetzung von sIgG und Fc γ RIIb2 war.

4.1.3 Bedeutung von Ig α und Ig β für die Tyrosinphosphorylierung von Fc γ RIIb1 nach der Coquervernetzung

Die Tyrosinphosphorylierung des ITIM bei Coquervernetzung von Antigenrezeptoren und Fc γ RIIb1 stellt einen der ersten Schritte der Fc γ RIIb1-induzierten negativen Signaltransduktionskaskaden in B-Zellen dar. Daher sollte analysiert werden, ob die chimären Rezeptoren IgM/Ig α und IgM/Ig β einen unterschiedlichen Einfluß auf diese Tyrosinphosphorylierung haben. Mit monoklonalen Fc γ RII-spezifischen Antikörpern KB61, die uns freundlicherweise von Dr. K. Pulford (Oxford, England) zur Verfügung gestellt wurden (Pulford et al., 1986), konnten die Fc γ RIIb-Isoformen präzipitiert und ihre Tyrosinphosphorylierung mit monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörpern 4G10 im Western Blot nachgewiesen werden.

Abb. 7 Detektion der Tyrosinphosphorylierung der Fc γ RIIb-Isoformen nach Coquervernetzung mit dem IgM/Ig α . 3×10^7 IgM/Ig α -exprimierende IIA1.6-Fc γ RIIb1 oder -Fc γ RIIb2 Zellen wurden mit 50 μ g/ml F(ab')₂ R α M-IgM zur IgM/Ig α -Vernetzung oder 75 μ g/ml intakten Antikörpern zur Coquervernetzung von IgM/Ig α und Fc γ RIIb für die angegebenen Zeiträume stimuliert. Zur Immunpräzipitation wurde Fc γ RII-spezifische mAk KB61 verwendet. Anschließend analytische Auftrennung in 10%-igem SDS-PAA-Gel und Übertragung auf Nitrozellulose. (A1 und A2) Detektion phosphotyrosinhaltiger Proteine mit den mAk 4G10. Offener Pfeil zeigt das erwartete Molekulargewicht von Fc γ RIIb2. (B1 und B2) Reinkubation mit Fc γ RII-spezifischen mAk II1A5 nach Entfernen der gebundenen Antikörper. Mit Hilfe Peroxidase-markierten Sekundärantikörpern und des ECL Systems wurden die erkannten Proteine nachgewiesen.

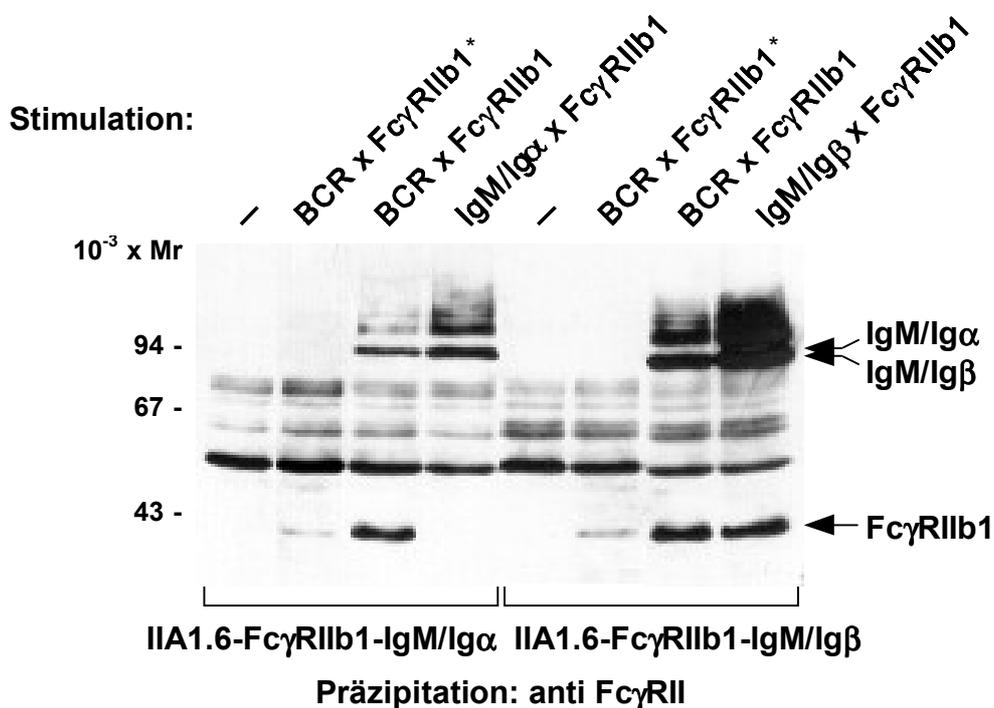
Die Tyrosinphosphorylierung von Fc γ RIIb2, dem im Vergleich zu Fc γ RIIb1 19 AS vor dem ITIM fehlen, konnte trotz ähnlicher Inhibition des Calciumflusses bei der Coquervernetzung in IgM/Ig α -exprimierenden Zellen nicht detektiert werden (Abb. 7A1/2), was der Beobachtung nach Fc γ RIIb2-Coquervernetzung mit dem sIgG bzw. dem IgM/Ig β entspricht (Budde et al., 1994b; Weinrich, 1997).

Erstaunlicherweise konnte man bei gleichzeitiger Quervernetzung von IgM/Ig α und Fc γ RIIb1 keine Tyrosinphosphorylierung von Fc γ RIIb1 beobachten. Wie in Abb. 8A gezeigt, wurde Fc γ RIIb1 jedoch unter denselben Bedingungen bei der Coquervernetzung mit dem IgM/Ig β eindeutig phosphoryliert. Als Stimulierungskontrolle beider IgM/Ig α - bzw. IgM/Ig β -exprimierenden IIA1.6-Fc γ RIIb1-Zellen wurde die Coquervernetzung von sIgG und Fc γ RIIb1 mit kompletten Kaninchen-Anti-Maus-IgG-Antikörpern (H+L) durchgeführt und bewirkte eine vergleichbar starke Tyrosinphosphorylierung von Fc γ RIIb1, wobei auch die Chimärrezeptoren IgM/Ig α bzw. IgM/Ig β über die endogenen κ -L-Ketten mitstimuliert wurden. Wurden die Stimulationen mit kompletten Kaninchen-Anti-Maus-IgG-Antikörpern (γ -spezifisch) durchgeführt, führte es zu einer schwächeren Tyrosinphosphorylierung des Fc γ RIIb1, die bei beiden Zelllinien vergleichbar war. Diese γ -spezifische Antikörper, der in Calciumfluß-Analysen ebenfalls nicht gut funktionierte (Daten nicht gezeigt), wurde in weiteren Untersuchungen nicht mehr verwendet. Erneute Inkubation der Membran mit zweiten Fc γ RII-spezifischen mAk (II1A5) konnte zeigen, daß eine vergleichbare Menge von Fc γ RIIb1 in jedem Experiment präzipitiert worden war (Abb. 7B1/2; Abb. 8B).

Die Tyrosinphosphorylierung des Fc γ RIIb1 bei der Coquervernetzung mit dem IgM/Ig β war übrigens sehr schnell und erreichte schon nach 15 sec das Maximum (Weinrich, 1997). Diese Kinetik war ähnlich wie bei Coquervernetzung von sIgG und

Fc γ RIIb1 (Budde et al., 1994b), und bedeutet möglicherweise, daß die Homodimere von Ig β genauso effizient wie die endogenen Ig α /Ig β -Heterodimere sind, um die vollständige Termination der B-Zell-Aktivierung durch Fc γ RIIb1 zu induzieren. Fc γ RIIb1 ist zwar nach Coquervernetzung mit dem IgM/Ig α in der Lage, den Calciumsignalweg effizienter zu inhibieren, allerdings scheint er bei diesem Fall keinen Einfluß auf die pTIM-abhängigen späteren Signale zu haben.

A. Immunblot: anti Phosphotyrosin



B. Immunblot: anti Fc γ RII



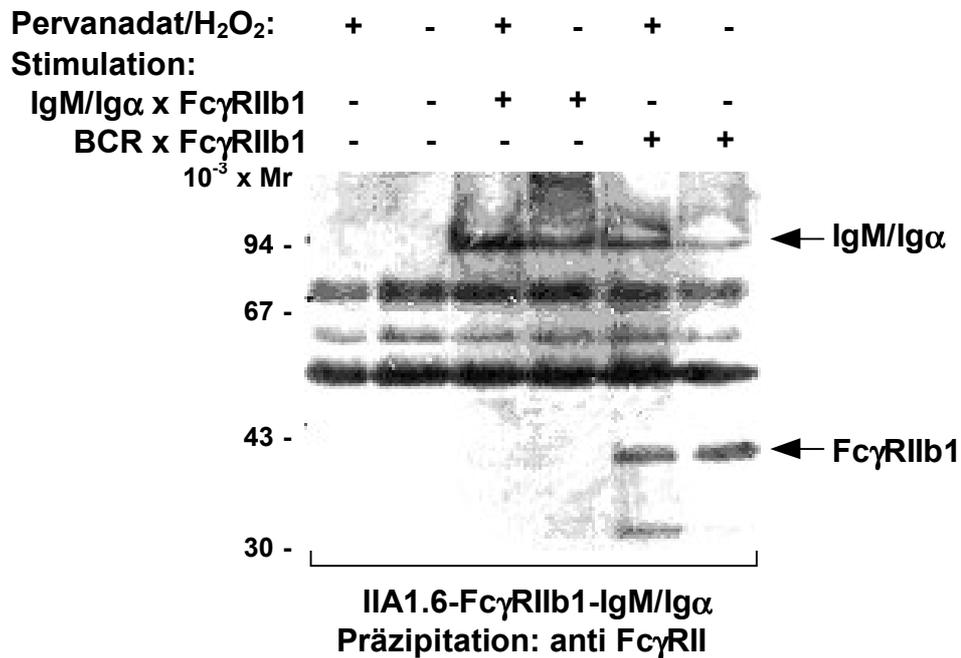
Abb. 8 Unterschiedliche Tyrosinphosphorylierung des Fc γ RIIb1 nach der Coquervernetzung mit dem sIgG, IgM/Ig α und IgM/Ig β . Mit 75 μ g/ml intaktem R α M-IgM (μ -spezifisch) bzw. IgG (γ -spezifisch)* oder IgG (H+L) wurden 3×10^7 IgM/Ig α - oder IgM/Ig β -exprimierende IIA1.6-Fc γ RIIb1-Zellen zur Coquervernetzung von Antigenrezeptoren und Fc γ RIIb1 für 1 min stimuliert. Fc γ RIIb1 wurde mit den mAk KB61 immunpräzipitiert, in einem 10%-igen SDS-PAA-Gel getrennt und auf Nitrozellulose übertragen. (A) Phosphotyrosin Detektion mit den mAk 4G10. (B) Fc γ RIIb1 Detektion mit den spezifischen mAk IIA5 nach Entfernen der gebundenen Antikörper. Mittels Peroxidase-markierter Sekundäntikörper und des ECL Systems wurden die spezifisch erkannten Proteine sichtbar gemacht.

4.1.4 Untersuchung der Tyrosinphosphorylierung von Fc γ RIIb bei Pervanadat/H $_2$ O $_2$ Inkubation

Pervanadat/H $_2$ O $_2$ ist ein effektiver Protein-Phosphataseinhibitor und wurde bereits erfolgreich in Untersuchungen der BCR-Signalübermittlung verwendet (Schieven et al., 1995; Wienands et al., 1996; Wienands et al., 1998; Zhang et al., 1998). Obwohl die ITIM-Sequenzen von Fc γ RIIb1 und Fc γ RIIb2 identisch sind, ist Fc γ RIIb1 offensichtlich ein besseres Substrat der Tyrosinkinase, weil die Tyrosinphosphorylierung coquervernetztes Fc γ RIIb2 unter denselben Bedingungen nicht eindeutig wie die von Fc γ RIIb1 detektiert werden konnte, selbst wenn die Zellen vor der Stimulation mit Pervanadat/H $_2$ O $_2$ behandelt wurden (N. Bewarder, unveröffentlichte Daten).

Es wurde daher untersucht, ob eine erhöhte Phosphataseaktivität bei Coquervernetzung von IgM/Ig α und Fc γ RIIb1 eine Rolle spielt. Nach mehreren Experimenten mit Pervanadat/H $_2$ O $_2$ behandelten Zellen konnte keine tyrosinphosphorylierte Bande, die Fc γ RIIb1 entsprach, nachgewiesen werden. Auch die Tyrosinphosphorylierung von Fc γ RIIb1 wurde bei Coquervernetzung mit dem sIgG nicht durch die Pervanadat/H $_2$ O $_2$ Behandlung beeinflusst. Somit konnte ausgeschlossen werden, daß eine schnelle Dephosphorylierung des Fc-Rezeptors durch bestimmte Phosphatase(n) in Anwesenheit von Ig α stattfindet. Das Ausbleiben einer Fc γ RIIb1-Tyrosinphosphorylierung wird also nicht durch eine unterschiedliche Rekrutierung oder Aktivierung der für die Fc γ RIIb1-Dephosphorylierung verantwortliche Phosphatase(n) bei Coquervernetzung von IgM/Ig α und Fc γ RIIb1 verursacht. Die Behandlung mit Pervanadat/H $_2$ O $_2$ führte ebenfalls nicht zur detektierbaren Phosphorylierung von Fc γ RIIb2 bei Coquervernetzung mit dem IgM/Ig α . Andere Phosphoproteine wie IgM/Ig α wurden jedoch unter denselben Bedingungen eindeutig stärker phosphoryliert (Abb. 9A1/2). Eines dieser Proteine, das nur bei der Fc γ RIIb-Coquervernetzung mit dem sIgG detektiert wurde, könnte dem Molekulargewicht nach Ig α (33 kDa) sein. Erneute Inkubation der Membran mit zweiten Fc γ RII-spezifischen mAk (II1A5) konnte zeigen, daß eine vergleichbare Menge von Fc γ RIIb1 in jedem Experiment präzipitiert worden war (Abb. 9B1/2).

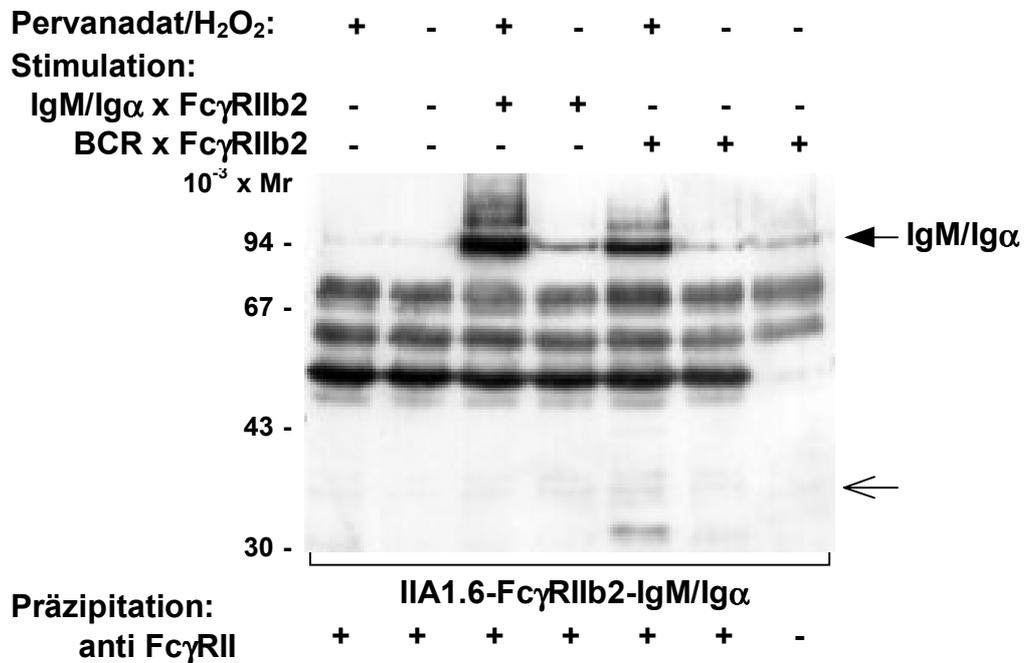
A1. Immunblot: anti Phosphotyrosin



B1. Immunblot: anti FcγRII



A2. Immunblot: anti Phosphotyrosin



B2. Immunblot: anti FcγRII



Abb. 9 Detektion der Fc γ RIIb-Tyrosinphosphorylierung nach Pervanadat/H $_2$ O $_2$ Behandlung. IgM/Ig α -exprimierende IIA1.6-Fc γ RIIb1 und -Fc γ RIIb2-Zellen wurden vor der Stimulation mit oder ohne 100 μ M Pervanadat/H $_2$ O $_2$ für 2 min behandelt. 75 μ g/ml intakte R α M-IgM oder -IgG wurden dann zur Fc γ RIIb-Coquervernetzung mit dem sIgG bzw. IgM/Ig α zu 3×10^7 Zellen zugegeben und für 1 min inkubiert. Fc γ RIIb wurde mit dem spezifischen mAk KB61 immunpräzipitiert. Als Kontrolle wurde mIgG1 verwendet. Anschließend analytische Auftrennung in einem 10%-igen SDS-PAA-Gel und Übertragung auf Nitrozellulose. (A1 und A2) Detektion phosphotyrosinhaltiger Proteine mit den mAk 4G10. Offener Pfeil zeigt das erwartete Molekulargewicht von Fc γ RIIb2. (B1 und B2) Reinkubation mit Fc γ RII-spezifischen mAk II1A5 nach Entfernen der gebundenen Antikörper. Detektion der Proteine mit Peroxidase-markierten Sekundärantikörpern und dem ECL System.

Dadurch untersucht man auch, ob Tyrosinkinasen bereits vor der Stimulation assoziiert sind. Da bei Fc γ RIIb keine erhöhte Phosphorylierung sichtbar war, ist wahrscheinlich keine Tyrosinkinase direkt mit Fc γ RIIb assoziiert. Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Tyrosinkinase, die Fc γ RIIb1 nach Coquervernetzung mit dem BCR phosphoryliert/phosphorylierten, nicht über Ig α -Homodimere rekrutiert oder aktiviert wird. Die Frage, welche Kinase(n) dafür verantwortlich ist und wie diese Kinase(n) durch Ig α und Ig β unterschiedlich reguliert wird, muß in weiteren Untersuchungen aufgeklärt werden.

4.1.5 Regulation der Tyrosinphosphorylierung von IgM/Ig α nach der Fc γ RIIb-Coquervernetzung

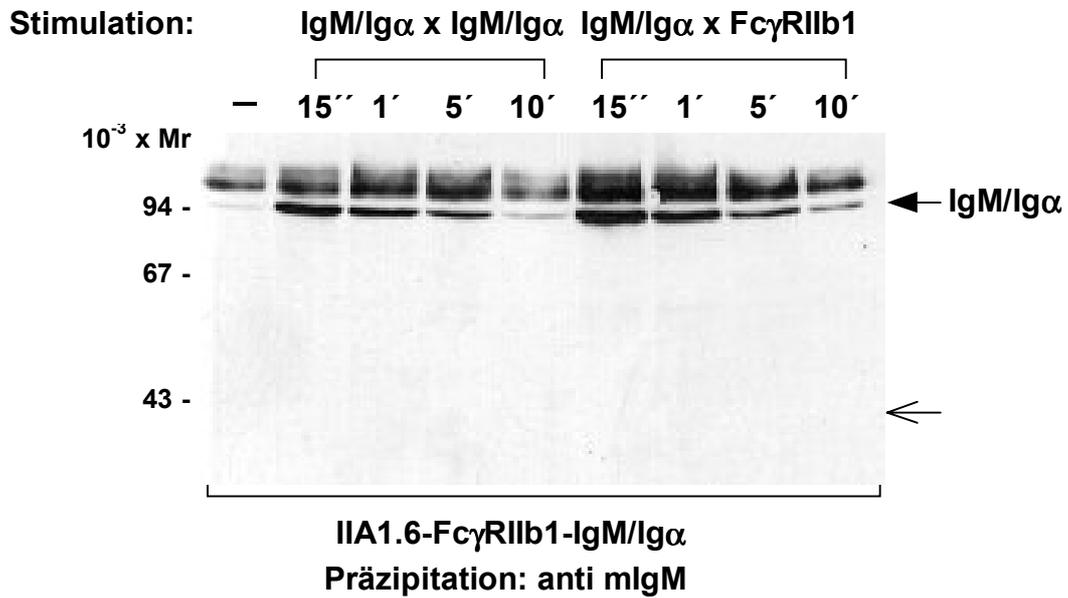
Frühere Arbeiten verschiedener Arbeitsgruppen (Cambier et al., 1994a; Reth, 1995; Cambier, 1995) haben gezeigt, daß Wechselwirkungen der tyrosinphosphorylierten ITAM der cytoplasmatischen Regionen von Ig α und Ig β mit wichtigen Signalelementen für die B-Zell-Aktivierung erforderlich sind. Eine frühzeitige Dephosphorylierung des ITAMs durch Coquervernetzung von BCR und Fc γ RIIb1 könnte in der negativen Signalübermittlung von Bedeutung sein. Diese könnte durch von pTIM rekrutierten Protein-Tyrosinphosphatasen wie z. B. SHP-1 ermöglicht werden (D'Ambrosio et al., 1995). Da die Tyrosinphosphorylierung von Fc γ RIIb1 selektiv nach der Coquervernetzung mit dem IgM/Ig β , aber nicht IgM/Ig α , induziert wird, wurde die Modulation der Tyrosinphosphorylierung von Ig α und Ig β nach der Fc γ RIIb1-Coquervernetzung untersucht. Die Phosphorylierung von Ig β wurde bei Coquervernetzung von IgM/Ig β und Fc γ RIIb1 tatsächlich schnell herunterreguliert (Weinrich 1997), während die Tyrosinphosphorylierung von Ig α dieselbe Kinetik sowohl bei Anwesenheit als auch Abwesenheit von Fc γ RIIb1 zeigte (Abb. 10A1/2). Aufgrund ihrer Ligandenbindungsfähigkeit an die Fc-Teile der zugesetzten Ziegeantikörper wurden die Fc-Rezeptoren bei jedem Experiment mitisoliert, jedoch

nicht in den Anti-Phosphotyrosin-Blots angefärbt. Für jedes Experiment wurde die Menge der präzipitierten Chimärrezeptoren mit IgM-spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Eine Reinkubation mit neuen Antikörpern ist manchmal an der ehemaligen Antikörperbindungsstelle schwächer, gewöhnlich wurde allerdings kein signifikanter Unterschied gefunden (Abb. 10B1/2).

Das Experiment wurde in Fc γ RIIb2-exprimierenden Zellen wiederholt und Coquervernetzung von chimären Rezeptoren und Fc γ RIIb2, die nicht zu detektierbarer Tyrosinphosphorylierung des Fc-Rezeptors führte, konnte weder bei IgM/Ig α noch bei IgM/Ig β (Weinrich, 1997) die Tyrosinphosphorylierung des ITAMs modulieren. Die selektive Dephosphorylierung des IgM/Ig β bei der Fc γ RIIb1-Coquervernetzung, jedoch nicht der Fc γ RIIb2-Coquervernetzung, deutet darauf hin, daß ein phosphoryliertes ITIM für die Modulation der Tyrosinphosphorylierung des chimären Rezeptors erforderlich ist.

Die Tyrosinphosphorylierung von Ig α war unter den selben Bedingungen im allgemeinen stärker als die von Ig β , und eine bereits basal vorhandene Phosphorylierung von Ig α in unstimulierten Zellen war auch leicht zu erkennen.

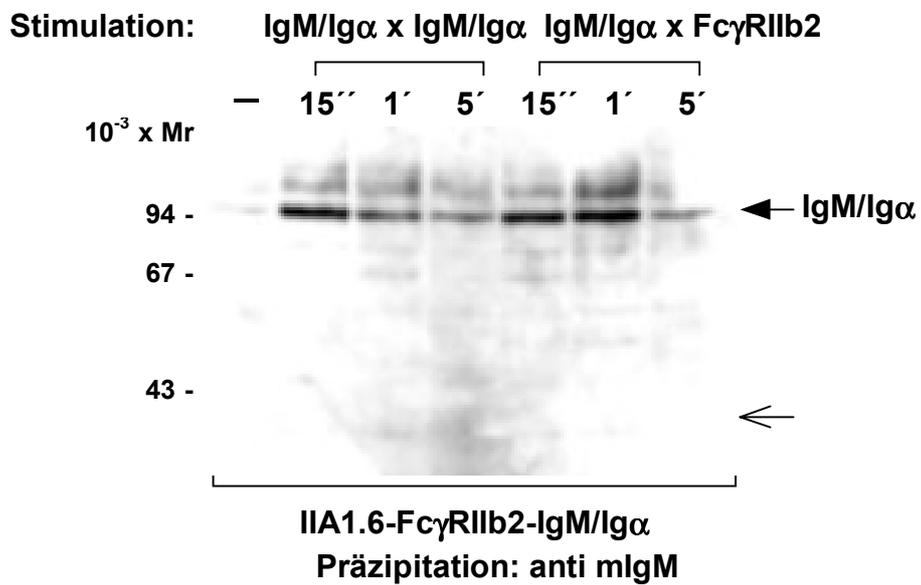
A1. Immunblot: anti Phosphotyrosin



B1. Immunblot: anti mIgM



A2. Immunblot: anti Phosphotyrosin



B2. Immunblot: anti mIgM



Abb. 10 Kinetik der IgM/Ig α -Tyrosinphosphorylierung nach Quervernetzung und Fc γ RIIb-Coquervernetzung. 3×10^7 IgM/Ig α -exprimierende IIA1.6-Fc γ RIIb1- und -Fc γ RIIb2-Zellen wurden mit 50 μ g/ml F(ab')₂ R α M-IgM zur IgM/Ig α -Vernetzung oder 75 μ g/ml intakten Antikörpern zur Fc γ RIIb-Coquervernetzung mit dem IgM/Ig α für die angezeigten Zeiträume stimuliert. IgM/Ig α wurde mit Anti-IgM-Agarose immunpräzipitiert, in 10%-igem SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulose überführt. (A1 und A2) Phosphotyrosin Detektion mit den mAk 4G10. Nachweis der präzipitierten Proteine erfolgte mit Peroxidase-markierten RaM-IgG durch ECL. Offener Pfeil zeigt das erwartete Molekulargewicht von Fc γ RIIb1 bzw. Fc γ RIIb2. (B1 und B2) Reinkubation mit dem Peroxidase-markierten RaM-IgG/IgM und anschließende ECL Detektion.

4.1.6 Analyse der Tyrosinphosphorylierung von endogenen Ig α - und Ig β -Ketten

Die Tyrosinphosphorylierung des an sIgG assoziierten Ig α und Ig β wurde *in vivo* nach der Fc γ RIIb-Coquervernetzung untersucht. Mittels der an GST fusionierten Tandem-SH2-Domänen von Syk und anschließender Aufreinigung über Glutathion-Sepharose können die tyrosinphosphorylierten endogenen Ig α - und Ig β -Ketten nach Stimulierung der Zellen spezifisch isoliert werden (Baumann et al., 1994; Wienands et al., 1995). Unter diesen Bedingungen ist die Präzipitationseffizienz der SH2-Domänen von Syk, die abhängig von der Bindungsaffinität ihrer Liganden ist, für Ig β etwas höher als für Ig α . Im Western Blot konnten so unterschiedliche Größen von Ig β , die auf unterschiedlicher Glykosylierung (Chen et al., 1990) oder einer Fragmentierung des C-Terminus (Friedrich et al., 1993) des Proteins könnten, gefunden werden.

Die Tyrosinphosphorylierung von Ig α und Ig β bei BCR-Vernetzung wurde in Fc γ RIIb1- und Fc γ RIIb2-exprimierenden IIA1.6-Zellen mehrmals untersucht. Nicht jeder getesteten Zellklon zeigte dieselbe Kinetik, aber immerhin konnten bis zu 5 min nach der Stimulation noch tyrosinphosphoryliertes Ig α und Ig β detektiert werden (Abb. 11). Wurden IIA1.6-Fc γ RIIb1-Zellen mit kompletten Kaninchen-Anti-Maus-IgG-Antikörpern (H+L) stimuliert, wurde die Tyrosinphosphorylierung beider Ketten dagegen signifikant herunterreguliert. Hierbei induzierte die Coquervernetzung von BCR und Fc γ RIIb1 nicht nur eine beschleunigte Dephosphorylierung von Ig β , sondern auch von Ig α .

Dagegen wurde nach Coquervernetzung von BCR und Fc γ RIIb2 die Tyrosinphosphorylierung von Ig α und Ig β nicht erniedrigt. Außerdem wurde die Menge beider phosphorylierten Ketten kurz nach der Stimulation (30 sec) transient erhöht.

Immunblot: anti Phosphotyrosin

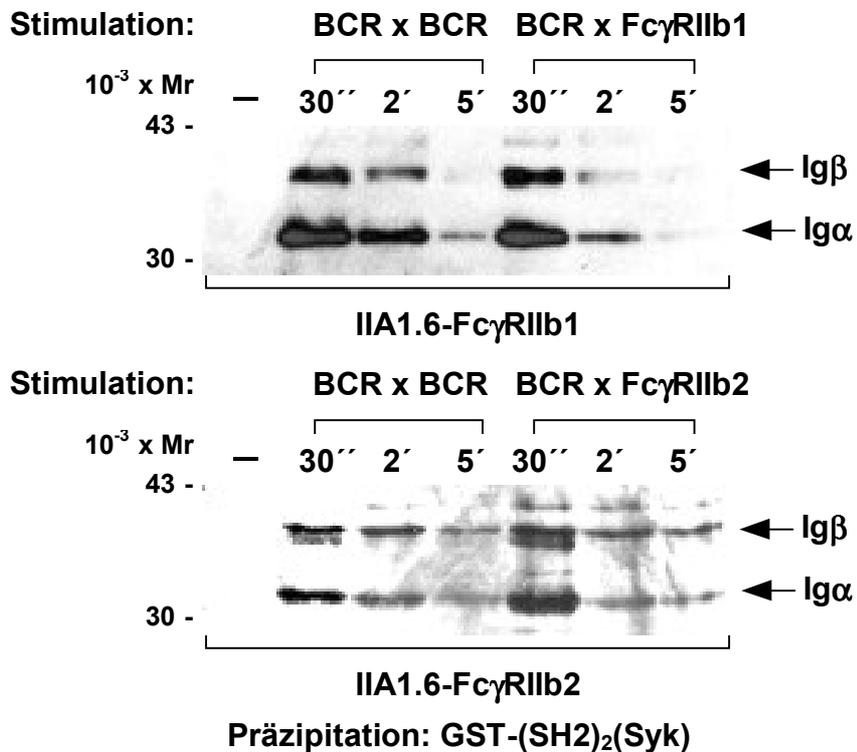


Abb. 11 Unterschiedliche Modulation der Tyrosinphosphorylierung von endogenem Ig α und Ig β nach Coquervernetzung von BCR und Fc γ R11b1 bzw. Fc γ R11b2. 1×10^7 Fc γ R11b1- (oben) oder Fc γ R11b2- (unten) exprimierende IIA1.6-Zellen wurden mit 50 μ g/ml F(ab')₂ R α M-IgG zur BCR-Vernetzung oder 75 μ g/ml intakten Antikörpern zur Fc γ R11b-Coquervernetzung mit dem BCR für die angezeigten Zeiträume stimuliert. Die tyrosinphosphorylierten Ig α - und Ig β -Ketten wurden mit Hilfe GST-(SH2)₂(Syk) und Glutathion-Sepharose immunpräzipitiert und nach analytischer Trennung in einem 10%-igen SDS-PAA-Gel auf Nitrozellulose überführt. Detektion phosphotyrosinhaltiger Proteine mit den mAk 4G10, Peroxidase markierten G α M-IgG und anschließender ECL.

4.1.7 Assoziation von der Tyrosinkinase Lyn und Fyn an die chimären IgM-Rezeptoren

Der deutliche Unterschied der Tyrosinphosphorylierung von Fc γ RIIb1 bei Coquervernetzung mit IgM/Ig α und IgM/Ig β weist darauf hin, daß möglicherweise die Kinase(n), die Fc γ RIIb1 phosphoryliert/phosphorylieren, in aktivierten B-Zellen nur an Ig β assoziiert sind. Ein *in vitro* Kinase-Test in unserem Labor zeigt, daß unter den in IIA1.6 Zellen exprimierten Kinasen der Src-Familie (Lyn, Blk, Fyn) und Syk nur Lyn selektiv den cytoplasmatischen Teil von Fc γ RIIb1 aber nicht den von Fc γ RIIb2 phosphoryliert (Bewarder et al., 1996). Hierfür wurde die mögliche Assoziation der Tyrosinkinase Lyn und Fyn an IgM/Ig α bzw. IgM/Ig β durch einen *In vitro* Kinase-Test untersucht (Abb. 12).

Zur Identifizierung IgM-Chimärrezeptor-assoziiierter Tyrosinkinase nach der Fc γ RIIb-Coquervernetzung wurden die Zellen nach der Stimulation unter schonenden Lysebedingungen (RIPA-Puffer mit nur 1% Triton X-100) lysiert und die Chimärrezeptor-Präzipitate einem *In vitro* Kinase-Test unterworfen. Vor SDS-PAGE und Autoradiographie wurde eine zweite Präzipitation mit Kinase-spezifischen Antiseren durchgeführt. Während auf diese Weise die Repräzipitation von Fyn aus den Fc γ RIIb1-exprimierenden Zellen eine stärkere Phosphorylierung des 59 kDa Proteins als die aus IIA1.6-Fc γ RIIb2 Zellen zeigte, wurde nach Repräzipitation von Lyn die 53 kDa Form in allen vier Zelllinien mit einer relativ schwachen aber vergleichbaren Phosphorylierung nachgewiesen. Die tyrosinphosphorylierten chimären IgM-Rezeptoren waren bei allen Repräzipitationen nach Autoradiographie zu erkennen. Interessanterweise konnten zusätzliche Proteinbanden nur in den Lyn-Repräzipitaten nach Coquervernetzung von IgM-Chimärrezeptoren und Fc γ RIIb1 aber nicht der Fc γ RIIb2-Coquervernetzung detektiert werden. Ein sehr stark phosphoryliertes Protein, das in der SDS-PAGE um 60 kDa läuft, assoziiert nur mit IgM/Ig β , während zwei andere Phosphoproteine (ca. 75 und 45 kDa) reproduzierbar mit IgM/Ig α verbunden waren.

Immunkomplex-Kinase-Assay

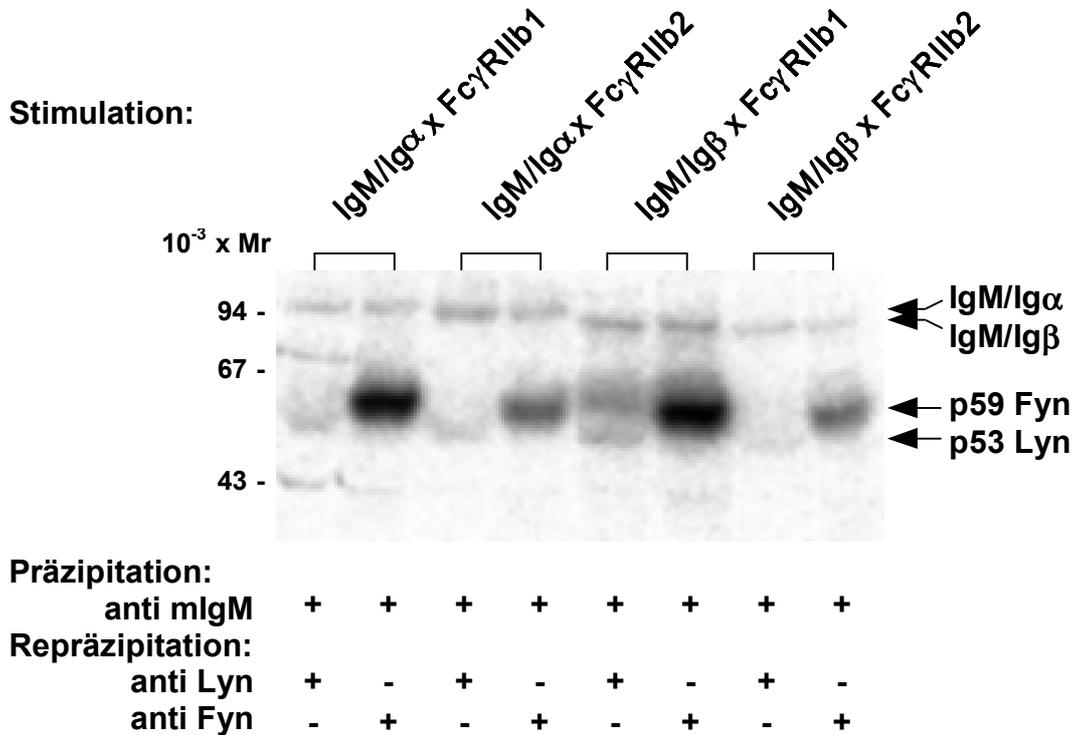


Abb. 12 Assoziation der Tyrosinkinasen Lyn und Fyn an die chimären IgM-Rezeptoren. 5×10^7 IIA1.6 Zellen, die eine Fc γ RIIb-Isoform und IgM/Ig α oder IgM/Ig β exprimieren, wurden zur Coquervernetzung von Chimärrezeptoren und Fc γ RIIb mittels 75 $\mu\text{g/ml}$ intakten G α M-IgM (μ -spezifisch) für 1 min stimuliert und anschließend mit RIPA/1% Triton X-100. Die chimären Rezeptoren wurden mit Anti-mIgM-Agarose präzipitiert. Nach dem *In vitro* Kinase-Test wurden Matrix-gebundene Proteine durch Kochen in SDS-Lösung solubilisiert und anschließend einer zweiten Präzipitation mit Kaninchenantiseren gegen Lyn und Fyn sowie Protein A Sepharose unterzogen. Die repräzipitierten Proteine wurden in einem 10% SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Nach einer KOH-Behandlung erfolgte die Detektion markierter Proteine mittels Autoradiographie.

4.2 Untersuchungen des SHIP-Proteins

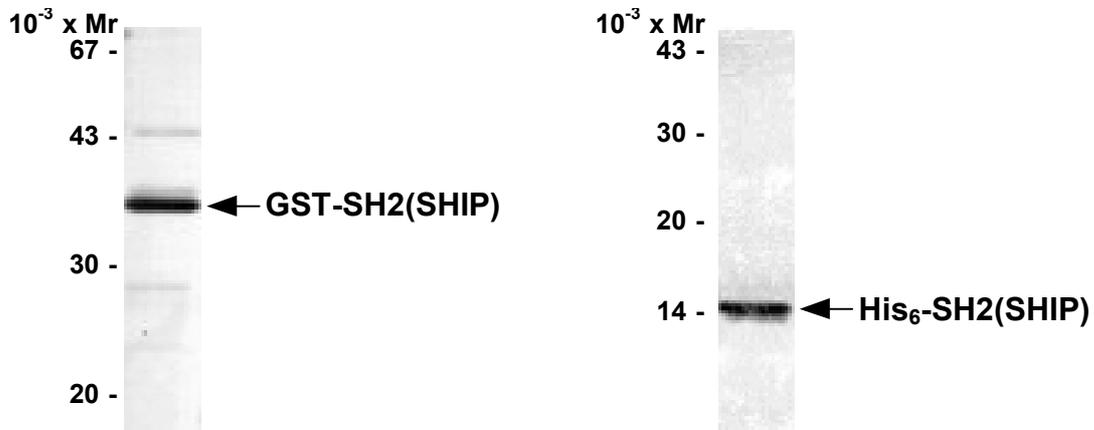
SHIP-Proteine in B-Lymphocyten wurden von vielen neuen Untersuchungen als wesentliche Signalelemente bei der Fc γ RIIb1-Coquervernetzung mit dem Antigenrezeptor gezeigt. Wie bereits in der Fragestellung geschrieben, besitzen die Fc γ RIIb-Isoformen ein unterschiedliches Potential, die B-Zell-Aktivierung zu inhibieren. Der Effekt, das Öffnen der plasmamembranständigen Calciumkanäle zu verhindern, verläuft unabhängig von der Tyrosinphosphorylierung des ITIMs der Fc-Rezeptoren. Mit Hilfe von *Antisense*-Expression und Überexpression von SHIP soll untersucht werden, welchen Einfluß SHIP auf das Calciumsignal hat. Um sowohl das endogene als auch transfizierte SHIP-Protein in IIA1.6-Zellen durch Immunpräzipitation und Western Blot nachweisen zu können, wurden daher im Rahmen dieser Arbeit zunächst verschiedene Domänen von SHIP per RT-PCR kloniert, in *E. coli* exprimiert und nach erfolgter Aufreinigung zur Gewinnung polyklonaler Antikörper verwendet.

In der Genbank gibt es zur Zeit drei cDNA Klone (MMU 39203, MMU 51742 und MMU 52044) für SHIP, die auf Aminosäureebene 99% identisch sind. Alle hier genannten SHIP Konstrukte entsprechen den Klon MMU 39203.

4.2.1 Expression der rekombinanten SH2-Domäne von SHIP in *E. coli* und Herstellung von polyklonaler Antikörper

Die Sequenz der SH2-Domäne von Maus SHIP (151-445bp, AS 8-105) ist im Vergleich zu den SHIP-Sequenzen von Ratte und Mensch hoch konserviert. Mit zwei von N. Bewarder ausgesuchten Primer (Bewarder, 1997) wurde die SH2-Domäne von SHIP per RT-PCR aus IIA1.6-Zellen amplifiziert, in pBluescript KS(+) ligiert und anschließend sequenziert. Die überprüfte Domäne wurde dann in pGEX-2T ligiert und im *E. coli* Stamm M15[pREP4] als GST-Fusionsprotein in großen Mengen exprimiert. Abschließend wurde das Protein unter nativen Bedingungen aufgereinigt und schließlich bei der Firma Eurogentec zur Immunisierung zweier Kaninchen eingesetzt, um polyklonale Antikörper gegen SHIP zu gewinnen.

A. Silberfärbung: rekombinante SH2-Domänen von SHIP



B. Immunblot: anti SH2(SHIP)

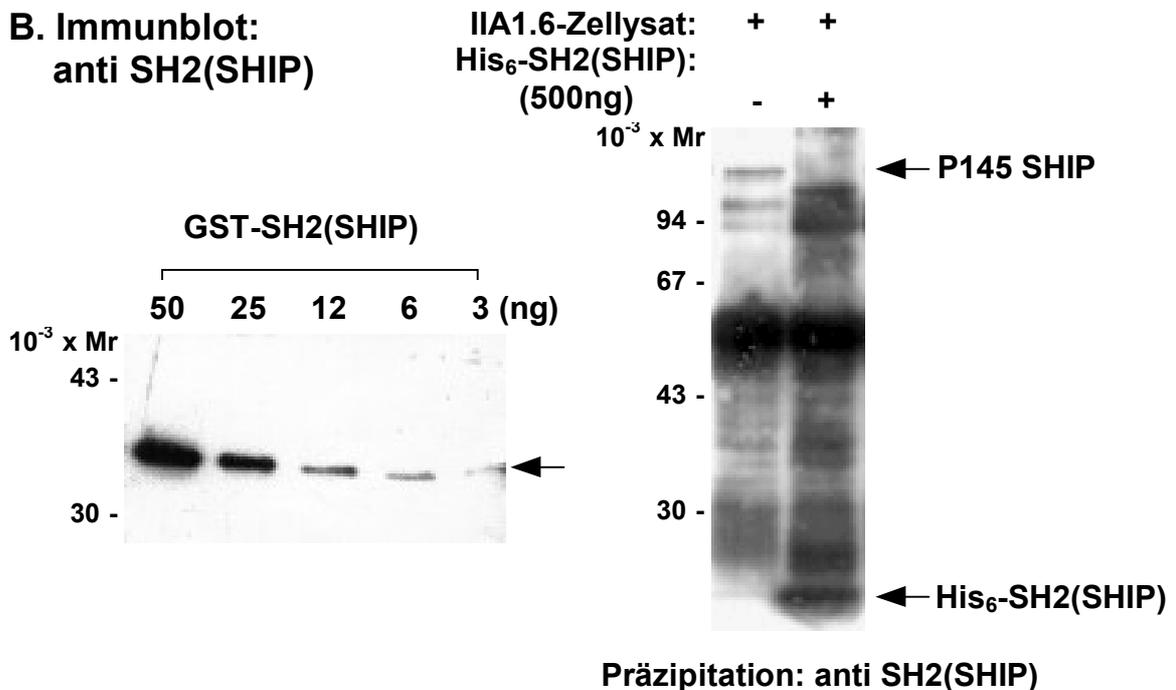


Abb. 13 Aufreinigung der SHIP-SH2-Domäne und Test des damit hergestellten polyklonalen Antikörpers. (A) Die SH2 Domäne von p145 SHIP (AS 11-109) wurde als GST- (links) und His₆-Fusionsprotein (rechts) in *E. coli* exprimiert und unter nativen bzw. denaturierenden Bedingungen aufgereinigt. Je 500 ng Protein der vereinigten Elutionsfraktionen nach Aufarbeitung von 500 ml *E. coli*-Kultur ist auf einem 12,5%-igen (links) bzw. 15%-igen (rechts) SDS-PAA-Gel aufgetragen. Nach SDS-PAGE erfolgte die Detektion durch Silberfärbung. (B) Test des polyklonalen R α SH2(SHIP) Antiserums im Western Blot. Auf dem linken Blot wurde 3 bis 50 ng GST-SH2(SHIP) Domäne aufgetragen. Die Immunpräzipitation von endogenem SHIP aus 1×10^7 I1A1.6-Zellen wurde mittels Konkurrenz von 500 ng His₆-SH2(SHIP) bestätigt (rechts). Die Proteinproben wurden im 10%-igen SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und der Nachweis erfolgte mit R α SH2(SHIP), Peroxidase-markierten Sekundärantikörpern G α R-IgG und ECL.

Das aufgereinigte Fusionsprotein ist in der Abb. 13A gezeigt. Die Ausbeute des GST-SH2(SHIP)-Konstruktes lag bei 5 mg/l *E. coli*-Kultur, wobei bei 1 ml Glutathion-Sepharose offensichtlich die Sättigung erreicht wurde (Frangioni et al., 1993). Zusätzlich wurde die SHIP-SH2-Domäne auch in pQE-9 ligiert und als His₆-Fusionsprotein exprimiert. Das unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigte Protein wurde zum Testen des Antikörpers verwendet.

Der Ergebnis des Western Blots zeigt, daß der polyklonale Kaninchen-Anti-SH2(SHIP)-Antikörper (R α SH2(SHIP)) sich sehr gut zur Detektion eignet (Abb. 13B). Sogar eine 1:16000 Verdünnung des Serums konnte 3 ng der GST-SH2 Domäne eindeutig erkennen. In einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. M. Jücker (Hamburg) wurden mit diesen Antikörpern p145 und p135 SHIP aus mononucleären Zellen des peripheren Blutes und des Knochenmarks erfolgreich nachgewiesen (Horn et al., 2001).

Weiterhin wurde die Fähigkeit des R α SH2(SHIP) zur Immunpräzipitation von des endogenen SHIP getestet. Da kein anderer SHIP-spezifischer Antikörper zur Verfügung stand, wurden die gleichen R α SH2(SHIP) zum Nachweis der Immunpräzipitation wieder verwendet. Der zur Immunpräzipitation eingesetzte Antikörper präzipitierte neben SHIP auch eine Reihe anderer zellulärer Proteine. Aus diesem Grund wurde ein sehr starker Hintergrund erhalten. Um die mögliche Fällung von SHIP festzustellen, wurde eine Kontrollfällung mit zusätzlich 500 ng His₆-SH2 Domäne im Zellysat als Konkurrent eingesetzt. In der Abb. 13 ist gezeigt, daß endogenes SHIP aus IIA1.6-Zellen auf dieser Weise spezifisch, allerdings nur in geringen Mengen, nachgewiesen werden konnte. Daher wurden wie nachfolgend beschrieben weitere polyklonale Antikörper gegen SHIP erzeugt.

4.2.2 Expression der enzymatisch aktiven katalytischen Domäne von SHIP in *E. coli* und Herstellung von polyklonaler Antikörper

Nach Vergleich der Sequenz von SHIP mit anderen Proteinen, die 5-Phosphatase Aktivität besitzen, wird angenommen, daß die zentrale Region von Maus SHIP (AS 430-806) für die enzymatische Aktivität verantwortlich ist (Lioubin et al., 1996). Es liegen außerdem noch über 300 AS zwischen der SH2-Domäne und der katalytischen Region, für die bisher keine Funktion vorhergesagt werden konnte, aber dennoch für die katalytische Aktivität von SHIP von Bedeutung sein könnten. Ein Bereich direkt vor der katalytischen Region, der besonders viele positiv geladene Reste enthält, könnte zur Substratspezifität beitragen, in der sich SHIP von anderen Typ II 5-Phosphatasen unterscheidet (Woscholski et al, 1997). Um diese Hypothese zu verifizieren und eine minimale katalytische Domäne zu charakterisieren, wurden fünf verschiedene cDNA-Stücke (KRT, n1, n2, n3, 5n3n) von AS 288 bis 806 per RT-PCR amplifiziert, in Klonierungsvektoren ligiert und die Richtigkeit der DNA-Sequenz durch Sequenzierung überprüft. Ein strukturelles Schema dieser Konstrukte ist in der Abb. 14 dargestellt.

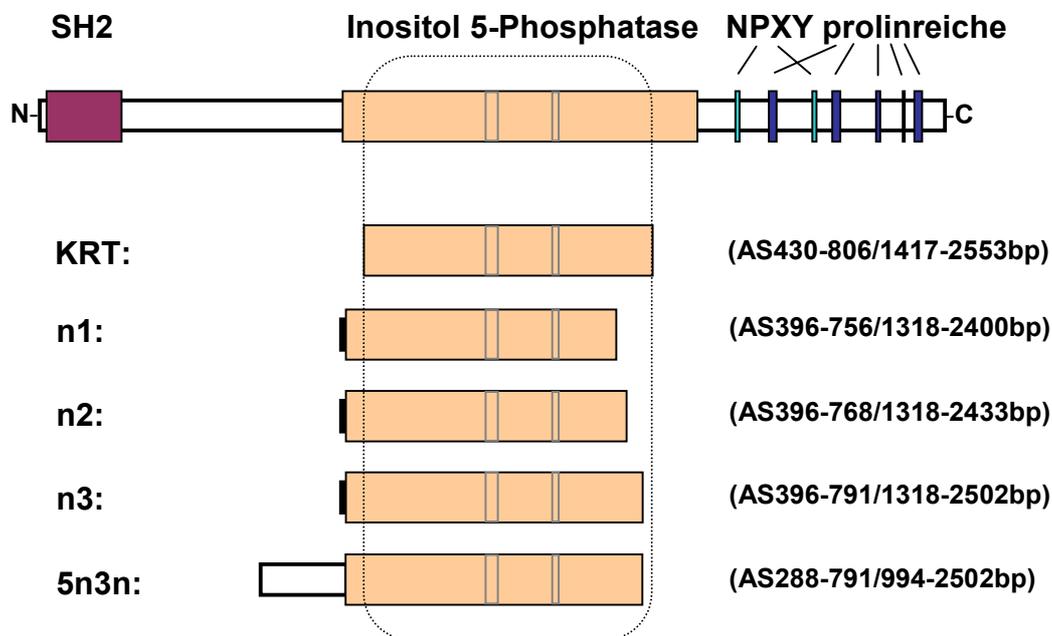
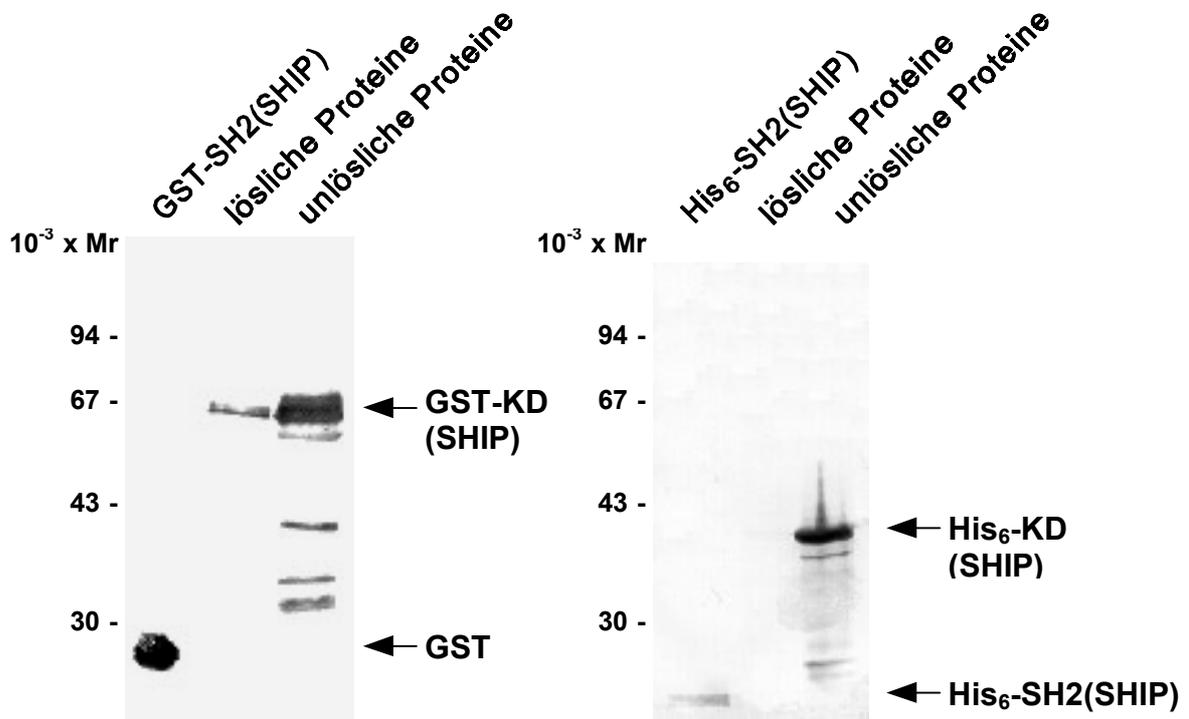


Abb. 14 Schematische Darstellungen verschiedener katalytischer Domänen von p145 SHIP. Die zentrale Inositol 5-Phosphatase-Domäne der p145 SHIP wurde nach Aman et al. (2000) von AS 400 bis 866 definiert. Bereiche, die signifikant homolog zu anderen 5-Phosphatasen sind, sind eingerahmt. Zwei hoch konservierte Motive innerhalb der katalytischen Domänen sind zusätzlich hervorgehoben.

A. Immunblot: anti GST (links) und anti Histidin (rechts)



B. Silberfärbung

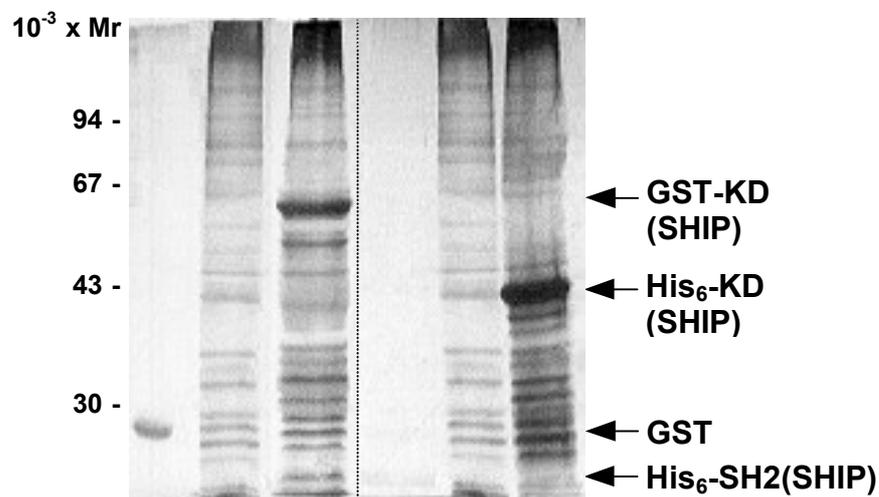
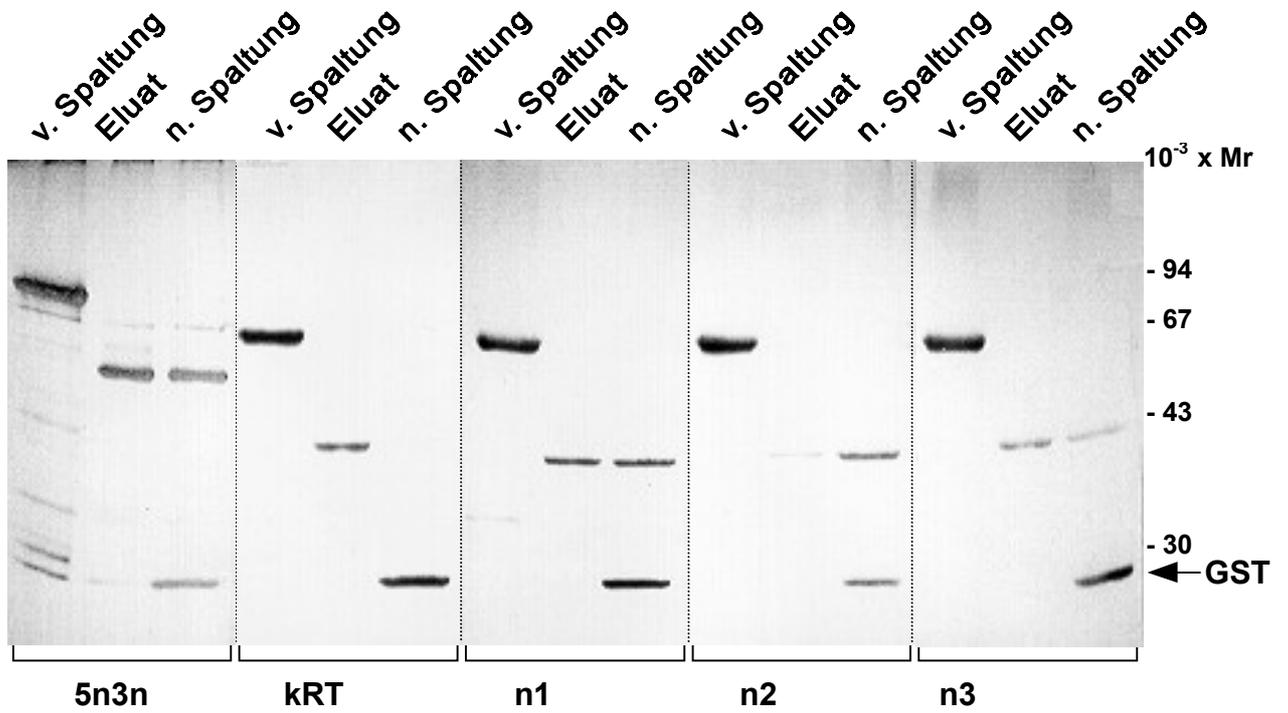


Abb. 15 Lokalisation der rekombinanten katalytischen Domänen von SHIP in *E. coli*. Zwei Testexpressionen der katalytischen Domäne von p145 SHIP (Konstrukt n3) im *E. coli* Stamm BL21, als GST-Fusionsprotein (links) und als N-terminale His₆-Fusion (rechts), wurden der Lokalisationsbestimmung unterzogen. Fraktionen der löslichen und unlöslichen Proteine sowie GST und His₆-SH2(SHIP) sind auf einem 10%-igen SDS-PAA-Gel aufgetragen. (A) Die Western Blots wurden mit polyklonalen Kaninchen-Anti-GST-Antikörpern bzw. monoklonalen Maus-Anti-His-Tag-Antikörpern und anschließend Peroxidase-markierten Sekundärantikörpern inkubiert. Der Nachweis erfolgte durch ECL (links) oder 4-Chloronaphtol (rechts). Unter den Western Blots ist die dazugehörige Silberfärbung abgebildet (B).

Alle Konstrukte wurden in folgende Vektoren pQE-30, pQE-60, pET-32a(+) und pET-12b ligiert und in *E. coli* exprimiert. Ziel war es, die katalytische Domäne von SHIP als lösliches Protein zu erhalten. Leider konnten alle exprimierten rekombinanten Proteine nicht unter nativen Bedingungen aufgearbeitet werden, egal ob als GST-Fusionsprotein in pGEX-2T, oder als N- und C-terminales His₆-Fusionsprotein, oder als N-terminales Trx-, His₆- und S-Tag-Fusionsprotein, oder als Protein ohne Affinitätstag. Variation der Temperatur, der IPTG-Konzentration und des *E. coli* Stamms (M15[pREP4], BL21/(DE3)) brachten keine Verbesserung (Daten nicht gezeigt). In der Abb. 15 werden zwei Beispiele der Expressionsversuchen angeführt. Alle exprimierten His₆-KD(SHIP) Fusionsproteine und die meisten der GST-Fusionsproteine waren eindeutig in den Fraktionen des unlöslichen Proteins. Es ist daher anzunehmen, daß die katalytische Domäne nicht richtig gefaltet ist.

Zur Gewinnung enzymatisch aktiver Produkte müssen die unter denaturierenden Bedingungen erhaltenen Proteine nachträglich renaturiert werden. Mittels N-Lauroyl-Sarcosin (Sarcosyl) können manche GST-Fusionsproteine solubilisiert werden, ohne ihre enzymatische Aktivität zu zerstören (Frangioni et al., 1993). Die Solubilisierung aller exprimierten GST-SHIP-katalytischen Domänen, die unter Verwendung von bis zu 8 M Harnstoff zu keinem erfolgreichen Ergebnis führte, funktionierte jedoch mit Sarcosyl problemlos. Die Aufreinigung der rekombinanten Proteine erfolgte daher mit Hilfe von Sarcosyl und Triton X-100 durch Affinitätsreinigung an Glutathion-Sepharose. Danach folgte die Abreicherung der eingesetzten Detergenzien durch Waschen wie unter 3.3.7 beschrieben und die Eluierung der katalytischen Domänen durch Thrombinabspaltung des GST-Teils (3.3.8). Bei allen rekombinanten Proteinen wurde der GST-Tag vollständig durch Thrombin abgespalten (Abb. 16A). Neben dem GST blieb auch ein Teil der katalytischen Domänen von SHIP an der Glutathion-Sepharose gebunden, die offenbar nicht richtig zurückgefaltet wurden. Schließlich wurden die erhaltenen Proteine N-terminal ansequenziert (Arbeitsgruppe BC I, Prof. Dr. H. Tschesche).

A. Silberfärbung: GST-KD(SHIP)



B. Immunblot: anti KD(SHIP)

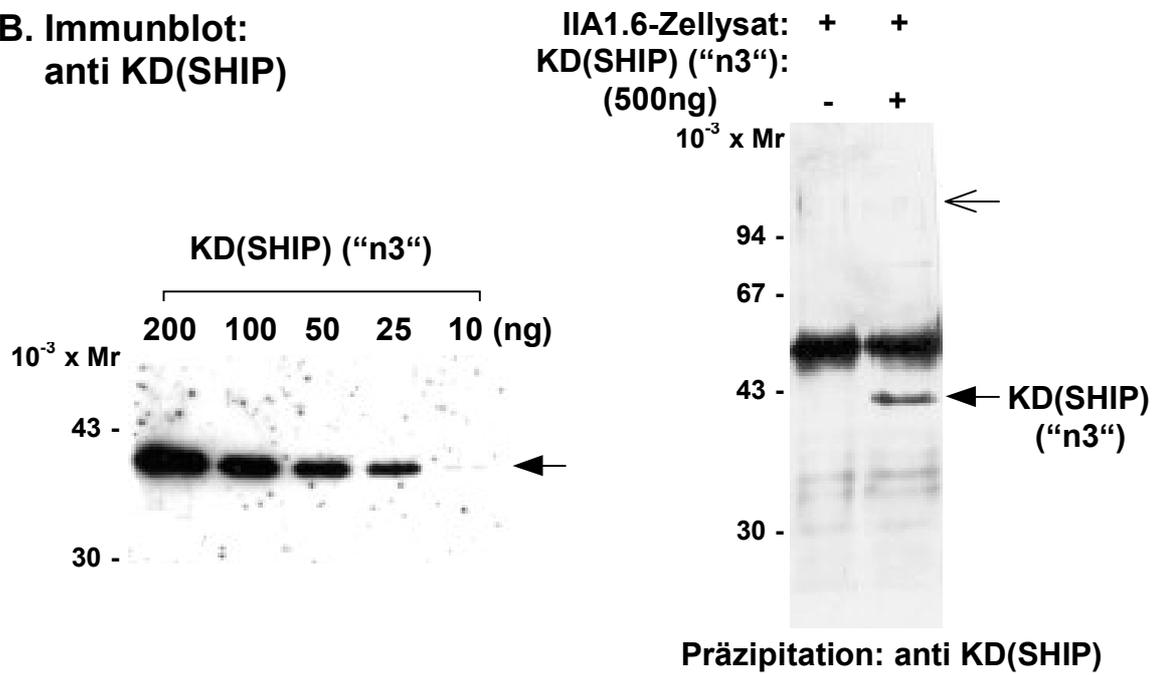


Abb. 16 Aufreinigung der enzymatisch aktiven katalytischen Domänen von SHIP und Test des damit hergestellten polyklonalen Antikörpers. (A) Verschiedene katalytische Domänen der p145 SHIP (AS 288-806) wurden in *E. coli* Stamm BL21 exprimiert. Die Affinitätsreinigung der unlöslichen GST-Fusionsproteine erfolgte mittels Sarcosyl nach einem modifizierten Protokoll von Frangioni et al. (1993). Zur Elution wurde der GST-Teil der Fusionsproteine durch Thrombin abgespalten. Neben dem Eluat (je 5 μ l) sind die vor und nach der Thrombinabspaltung (v. Spaltung, n. Spaltung) an Glutathion-Sepharose (je 5 μ l) gebundenen Proteine nach Aufkochen der Sepharose auf einem 10% SDS-PAA-Gel aufgetragen. Detektion durch Silberfärbung. (B) Test des polyklonalen R α KD(SHIP) Antiserums im Western Blot. Links sind 10 bis 200 ng der KD(SHIP) (Konstrukt n3) Domäne auf einem 10%-igen SDS-PAA-Gel aufgetragen. Im Immunpräzipitationstest (rechts) wurde Zellysat aus 1×10^7 IIA1.6-Zellen mit oder ohne 500 ng des rekombinanten Proteins eingesetzt. Anschließend SDS-PAGE(10%) von spezifisch erkannten Proteinen. Nachweis beider Western Blots mit Hilfe von Peroxidase markiertem G α R-IgG und ECL. Offener Pfeil zeigt das erwartete Molekulargewicht von p145 SHIP.

Der Erfolg der Rückfaltungsversuche wurde durch einen Substrattest mit hoher Sensitivität überprüft. Da Konstrukt n3, aber nicht n1 und n2, sehr geringe 5-Phosphatase-Aktivität gegenüber I-1,3,4,5-P₄ zeigte, stellt n3 wahrscheinlich die minimale katalytische Domäne von SHIP dar. Die Ausbeute korrekt rückgefalteter Proteine, die von Versuch zu Versuch variierte, lagen nicht immer innerhalb der Nachweisgrenze (Prof. Dr. G. W. Mayr, Hamburg, persönliche Mitteilung). Nach mehreren Versuchen wurde ausgeschlossen, daß hoch reines Protein in größeren Menge, die für eine Kristallisation und anschließende Röntgenstrukturaufklärung erforderlich sind, auf diese Weise gewonnen werden können.

In dieser Arbeit wurde ein zweiter polyklonaler Antikörper, nämlich R α KD(SHIP), durch Immunisierung eines Kaninchens mit der aufgereinigten Domäne n3 hergestellt. Wiederholte Antikörpertests zeigten ebenfalls, daß man diesen Antikörper nur zur Detektion, aber nicht zur Immunpräzipitation des endogenen SHIP verwenden kann (Abb. 16B).

4.2.3 Transfektion von Fc γ RIIb1- und Fc γ RIIb2-exprimierenden IIA1.6-Zellen mit SHIP katalytischen Domänen, Wt SHIP und einer Antisense-Sequenz

Um die Funktion von SHIP bei der Regulation des Calciumkanals in unserem Fc γ RIIb-exprimierenden IIA1.6-Zellsystem näher zu untersuchen, wurde versucht, die Expression von endogenem SHIP durch Transfektion zu modulieren. Vier der katalytischen Domänen von SHIP (kRT, n1, n2 und n3) wurden zunächst in den Vektor pcDNA3 bzw. pIRES2-EGFP ligiert. Da alle amplifizierte kompletten cDNA-Klone mehrere durch PCR erzeugte Mutationen besaßen, wurden zwei Wt SHIP cDNA-Klone des Menschen und der Maus uns freundlicherweise von Dr. M. Jücker (Hamburg) und Prof. L. Rohrschneider (Ohio, USA) zur Verfügung gestellt und beide

in den Vektor pcDNA3 umkloniert. Ein 27 Basen *Antisense*-Oligonucleotid, das komplementär zu der Sequenz direkt vor dem Startcodon der Maus SHIP mRNA ist, wurde ebenfalls in pcDNA3 ligiert.

Mit allem diesen Konstrukten wurden IIA1.6-Fc γ RIIb1- und -Fc γ RIIb2-Zellen mittels Elektroporation transfiziert. Durch Selektion mit G418 und Einzelzellklonierung etablierte stabile Zellklone wurden per RT-RPCR auf die Transkription der Konstrukte getestet und mittels FACS-Analyse die Expression des Fc-Rezeptors kontrolliert.

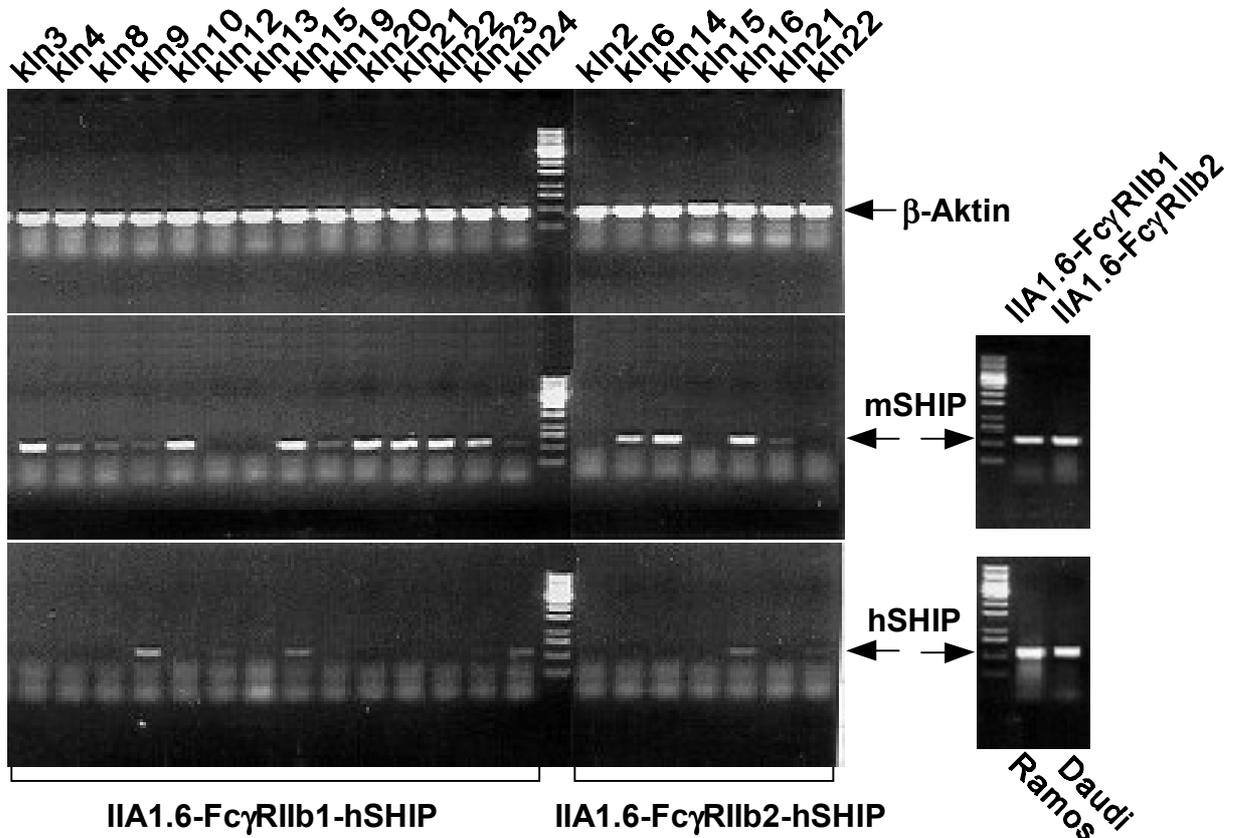
Calciumfluß-Messungen im Durchflußcytometer wurden an mehreren positiven Klonen verschiedener Transfektanten mehrmals wiederholt. Im Vergleich zu Messungen an untransfizierten Zellen konnte weder bei BCR-Vernetzung noch bei Coquervernetzung von BCR und Fc γ RIIb eine eindeutige Veränderung des Calciumeinstroms nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche modifizierte SHIP-Expression durch z. B. die heterogene Expression des humanen SHIP wurde wie folgt überprüft.

4.2.4 Nachweis von endogenem SHIP in IIA1.6-Zellen

a) RT-PCR

Um Maus und Human SHIP-Transkripte spezifische nachweisen zu können, wurden Oligonucleotide verwendet, die an nicht konservierte Sequenzen hybridisieren. Kein Klon zeigte eine dem endogenen Maus SHIP vergleichbar hohe Expression des transfizierten humanen SHIP (Abb. 17A). Die RNA wurde nach Konzentrationsbestimmung in gleichen Mengen eingesetzt. Zur Kontrolle wurde eine PCR spezifisch für β -Aktin aus derselben cDNA durchgeführt, die zu vergleichbaren Amplifikaten führte. Durch eine zweite Kontroll-PCR für β -Aktin aus der Ausgangs-RNA wurde eine leichte Kontamination bei manchen Ansätzen entdeckt, die allerdings vernachlässigt werden konnte (Abb. 17B).

A. RT-PCR: β -Aktin, mSHIP und hSHIP



B. Kontroll-RNA-PCR: β -Aktin

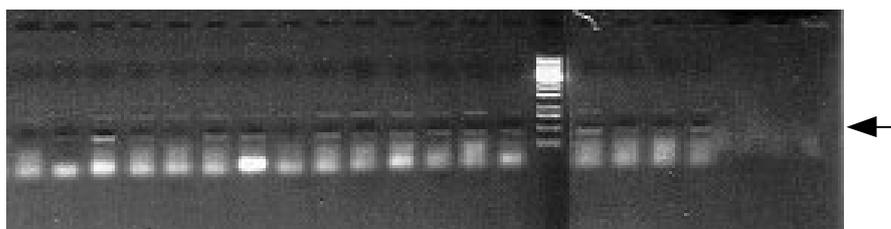


Abb. 17 Spezifische RT-PCR des endogenen Maus SHIP und transfizierten humanen SHIP. Gleiche Mengen RNA aus sechzehn IIA1.6-Fc γ RIIb1-hSHIP Klonen und sieben IIA1.6-Fc γ RIIb2-hSHIP Klonen wurden in cDNA umgeschrieben. (A) Kontroll-RT-PCR von β -Aktin, spezifische Amplifikation des endogenen Maus SHIP und Detektion des transfizierten humanen SHIP. cDNA aus untransfizierten IIA1.6-Fc γ RIIb1 und -Fc γ RIIb2 Zellen und cDNA aus humanen B-Zelllinien Ramos und Daudi wurden als Positivkontrolle eingesetzt. (B) Kontroll-PCR für β -Aktin aus den RNA-Ansätzen. Je 25 Zyklen bei der PCR und 1,0% Agarose-Gel.

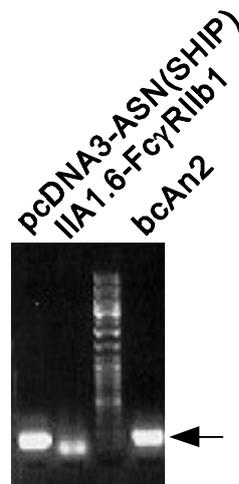
Die Menge der endogenen Maus SHIP-Transkripte schwankte von Klon zu Klon sehr stark. Mehrere Klone, die zuerst relativ langsam wuchsen und kein SHIP exprimierten, wurden zur Untersuchung weiter kultiviert. Wiederholte RT-PCR von Maus SHIP zeigte jedoch, daß die Expression von SHIP in diesen Klonen mindestens zum Teil restauriert wurde. Es wird erklärt, warum die Calciumfluß-Analysen sowohl von verschiedenen Klonen als auch verschiedene Messungen eines Klons kaum zu reproduzieren waren.

b) Immunpräzipitation

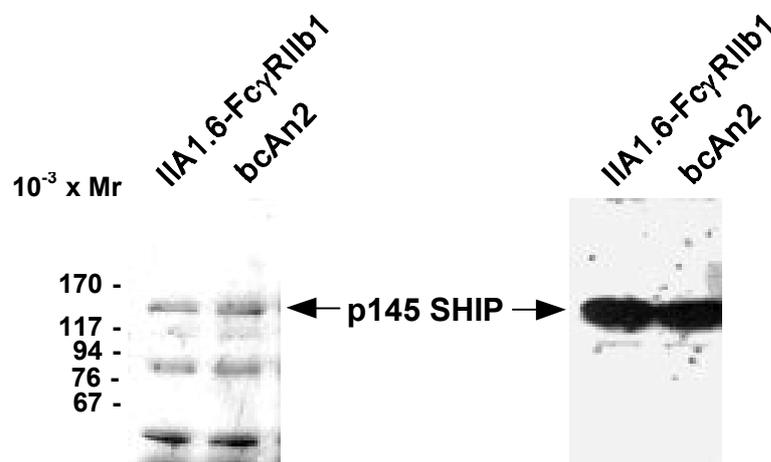
Eine Sequenz aus dem Vektor, die vor dem PolyA-Schwanz liegt und auch transkribiert werden soll, wurde als der 3'-Primer in der RT-PCR für *Antisense*-SHIP verwendet. Das 160 bp lange Amplifikat aus transfizierten Klonen konnte von dem Primer-Aggregat (ca. 40 bp) aus untransfizierten Zellen eindeutig unterschieden werden (Abb. 18A).

Mit Hilfe des von Dr. M. Jücker (Hamburg) zur Verfügung gestellten Kaninchen polyklonalen Antikörpers SHIP#5, dessen Antigen das erste NPXY-Motiv der humanen SHIP ist, konnte endogenes Maus SHIP quantitativ immunpräzipitiert werden. Die anschließende Detektion erfolgte mit denselben Antikörpern bzw. den $R\alpha$ KD(SHIP). Der $R\alpha$ NPXY(SHIP) ist besser als $R\alpha$ KD(SHIP) zur Immunpräzipitation geeignet, aber schlechter im Western Blot. Wie das Beispiel in der Abb. 18B zeigt kann eine Herunterregulierung der Proteinmenge von SHIP in RT-PCR-positiven *Antisense*-Klone nicht nachgewiesen werden. Die *Antisense*-Experimente führten daher zu keinem verwertbaren Ergebnis.

A. RT-PCR: ASN(SHIP)



B. Immunblot: anti NPXY(SHIP) (links) und anti KD(SHIP) (rechts)



Präzipitation: anti NPXY(SHIP)

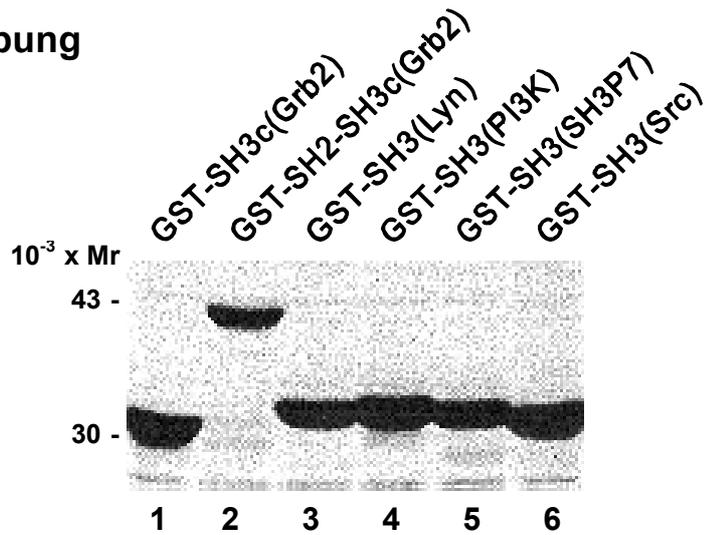
Abb. 18 Nachweis des SHIP-Proteins in einem RT-PCR positiven *Antisense*-Klon. (A) Detektion eines positiven Klons der IIA1.6-FcγRIIb1-ASN-Zellen (bcAn2) durch RT-PCR (25 Zyklen). Als Kontrolle wurde 1 ng pcDNA3-ASN(SHIP) Konstrukt bzw. vergleichbare Mengen cDNA von untransfizierten IIA1.6-FcγRIIb1-Zellen eingesetzt. 2,0% Agarose-Gel. (B) Immunpräzipitation von endogenem SHIP. NP40-Lysat aus 1×10^7 Zellen der IIA1.6-FcγRIIb1 oder der IIA1.6-FcγRIIb1-ASN (bcAn2) wurde mit polyklonalen Kaninchen-Anti-NPXY(SHIP)-Antikörpern (SHIP#5) inkubiert. Nachfolgende analytische Trennung im 7.5%-igen SDS-PAA-Gel und Übertragung auf Nitrozellulose, Inkubation der Membran mit R α NPXY(SHIP) bzw. Reinkubation mit R α KD(SHIP). Nachweis mit Peroxidase-markierten G α R-IgG und ECL.

c) Affinitätsbindung an verschiedene SH3-Domänen

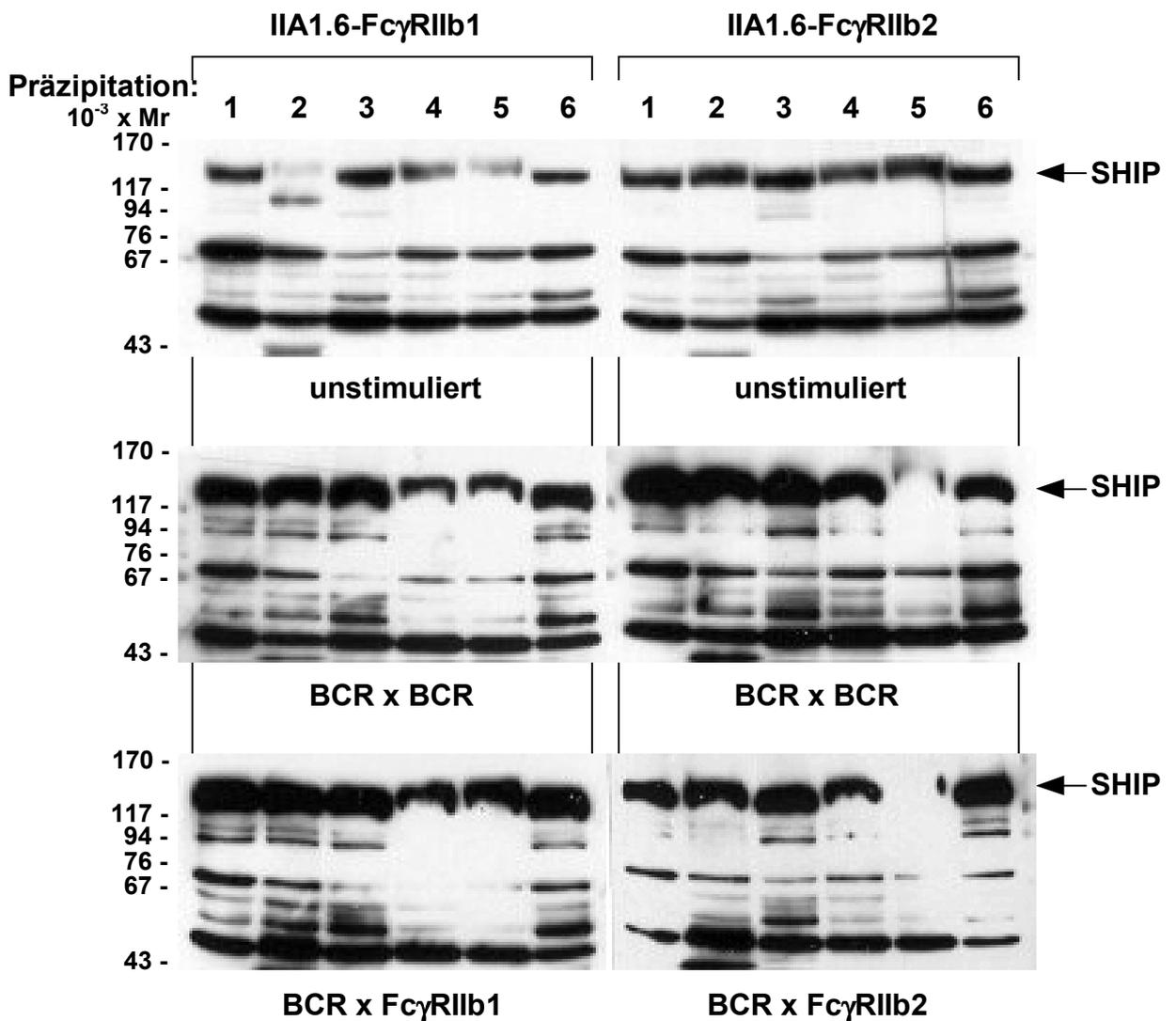
Coimmunpräzipitationsexperimente haben gezeigt, daß SHIP-Proteine *in vivo* mit vielen Molekülen der Signaltransduktion assoziieren. Daher spielen die prolinreichen Regionen (PxxP-Motiv) von SHIP, zusammen mit der SH2-Domäne und den NPXY-Domänen eine wichtige Rolle. Untersuchungen haben gezeigt, daß die C-terminale SH3-Domäne von Grb2 und Src-SH3-Domäne die spezifische Liganden der prolinreichen Bereiche von p145 SHIP (PxxP-Motiv) sind (Kavanaugh et al., 1996; Wisniewski et al., 1999). Mit Hilfe der Affinitätsbindung von GST-Fusionsproteinen zeigten außerdem Wisniewski et al. (1999), daß SHIP2, das nicht mit der SH3-Domäne von Grb2 assoziiert, selektiv an die SH3-Domäne von ABL in CML Vorläuferzellen binden konnte.

Um die SHIP:SH3-Interaktion in der negativen Fc γ RIIb1-Signalübermittlung der B-Zellen zu untersuchen, wurden SH3-Domänen von Lyn, PI3-Kinase, SH3P7, Src und die C-terminale SH3-Domäne (SH3_C) sowie SH2-SH3_C-Domänen von Grb2 verwendet, die uns freundlicherweise von Prof. Dr. J. Wienands als pGEX-2T bzw. pGEX-3 Konstrukte zur Verfügung gestellt wurden. Es konnte gezeigt werden, daß SHIP sowohl in unstimulierten als auch stimulierten IIA1.6-Zellen mittels mehrerer SH3 Domäne rekrutiert werden konnte (Abb. 19B1). Die Bindung von p145 SHIP an GST-SH3_C(Grb2), GST-SH2-SH3_C(Grb2) und GST-SH3(Src), die als positive Kontrolle dieser Versuche diente, nahmen nach der Stimulation und besonders Coquervernetzung von BCR und Fc γ RIIb1 wesentlich zu. Coquervernetzung von BCR und Fc γ RIIb2 führte ebenfalls zur Verstärkung der Bindung von SHIP an GST-SH3(Src) im Vergleich mit BCR-Vernetzung, während die SHIP-Grb2 Wechselwirkung dagegen verringert wurde. Die Bindung von SHIP an GST-SH3(Lyn) blieb sowohl bei BCR-Vernetzung als auch Coquervernetzung von BCR und Fc γ RIIb1 bzw. Fc γ RIIb2 kaum verändert. Die Wechselwirkungen von SHIP mit den SH3-Domänen der PI3-Kinase und dem neu klonierten Cytoskelett-Adapterprotein SH3P7 sind bis jetzt unbekannt. Interessanterweise lief SHIP unterschiedlich in den Western Blots. Das könnte an der unterschiedlichen Bindung der SHIP-Isoform p135 und SHIP-Homolog p155 SHIP2 an die SH3-Domänen liegen.

A. Ponceaufärbung



B1. Immunblot: anti KD(SHIP)



B2. Immunblot: anti BLNK

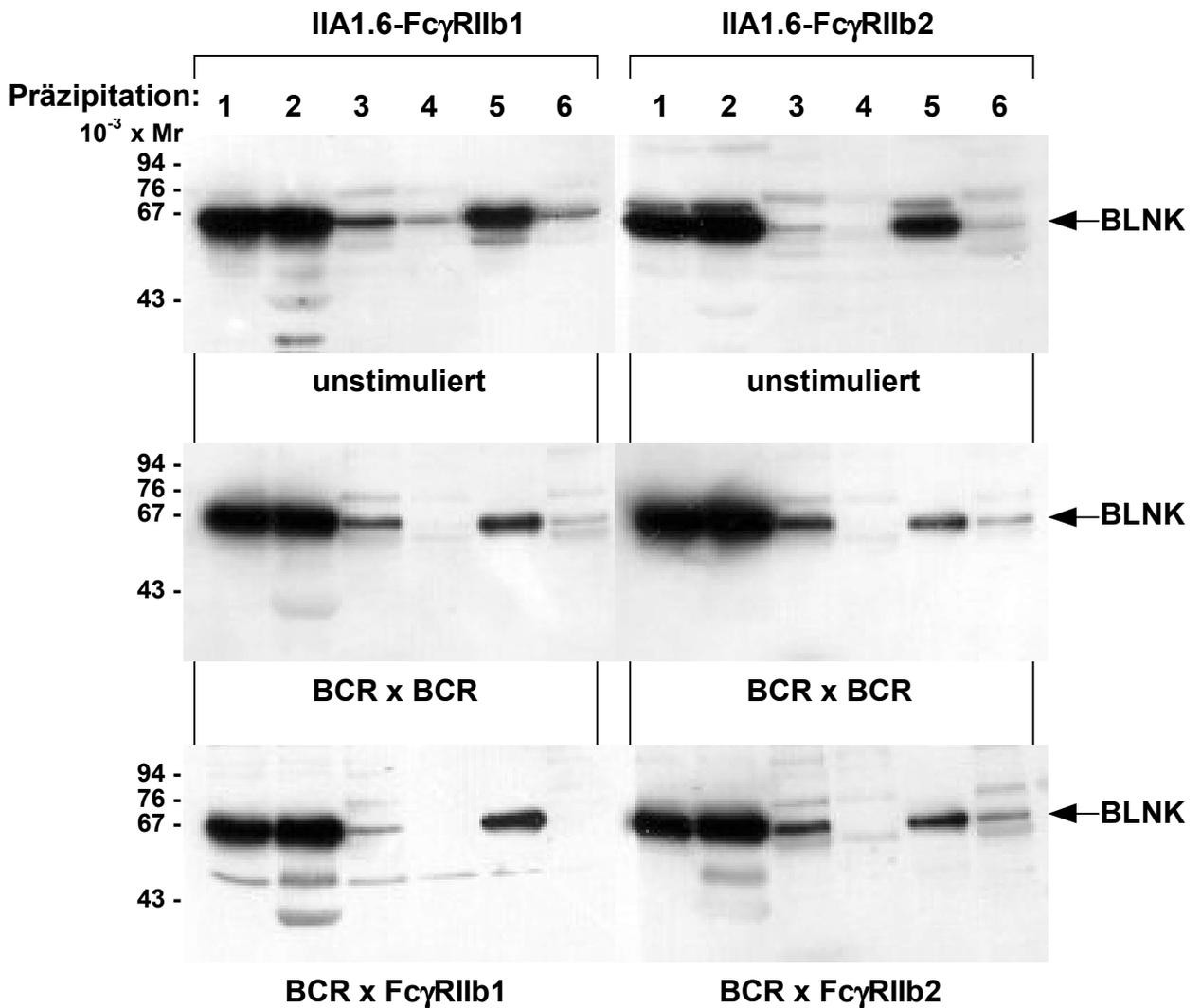


Abb. 19 Bindung von p145 SHIP an verschiedene GST-SH3-Domänen. (A). GST-SH3_C(Grb2) (=1), GST-SH2-SH3_C(Grb2) (=2), GST-SH3(Lyn) (=3), GST-SH3(PI3-K) (=4), GST-SH3(SH3P7) (=5) und GST-SH3(Src) (=6) wurden als GST-Fusionsproteine unter nativen Bedingungen aufgereinigt, und wurden nicht von der Glutathion-Sepharose eluiert. (B) 6×10^7 Zellen Fc γ RIIb1- und Fc γ RIIb2-exprimierenden Zellen wurden mit 50 μ g/ml F(ab')₂ R α M-IgG (H+L) zur BCR-Vernetzung oder 75 μ g/ml intakten Antikörpern zur Fc γ RIIb-Coquervernetzung mit dem BCR für 1 min stimuliert. Nach der Lyse in 6 ml NP40-Lysepuffer wurde der lösliche Teil des lysates in 6 Ansätze verteilt und mit einer der oben beschriebenen rekombinanten Domänen inkubiert. Die durch Affinitätsbindung präzipitierten Proteine wurden durch SDS-PAGE (10%) aufgetrennt, mit R α KD(SHIP) inkubiert (B1) bzw. mit R α BLNK reinkubiert (B2). Anschließende Detektion durch Peroxidase-markierten G α R-IgG und ECL.

Eine vergleichbare Menge eingesetzter rekombinanter Domänen konnte durch Ponceau S Färbung der Membran nachgewiesen werden (Abb. 19A).

Um die Spezifität der Bindung von SHIP an die rekombinanten SH3-Domänen zu überprüfen, wurde die Membran mit einem BLNK-spezifischen Kaninchen-Antiserum reinkubiert. Das kürzlich identifizierte Adapterprotein BLNK assoziiert nach der Phosphorylierung durch die Tyrosinkinase Syk mit vielen Enzymen stromabwärts einschließlich PLC- γ 2, Btk, p^{95Vav}, sowie Grb2 und Nck Adapterproteinen und spielt eine essentielle Rolle für die B-Zell-Aktivierung (Fu et al., 1998; Goitsuka et al., 1998). Übereinstimmend mit publizierten Copräzipitationsergebnisse (Fu, et al., 1998) zeigte es hingegen bei allen Fusionsproteinen eine eindeutig bevorzugte Bindung von BLNK an GST-SH3_C(Grb2) und GST-SH2-SH3_C(Grb2) (Abb. 19B2). Diese BLNK:Grb2-Wechselwirkungen waren interessanterweise in beiden Fc γ RIIb-exprimierenden Zelllinien sowohl vor als auch nach der Stimulation unverändert, während die Bindung von BLNK an GST-SH3(SH3P7) nach Fc γ RIIb-Coquervernetzung mit dem BCR herunterreguliert wurde. Die Bindungen von SHIP an die SH3-Domäne von Lyn und bis zu noch geringerem Grad von Src wurden ebenfalls nach der Fc γ RIIb1-Coquervernetzung reduziert, jedoch nicht nach Coquervernetzung von BCR und Fc γ RIIb2. Was diese unterschiedliche Modulationen allerdings bedeutet, kann zur Zeit nicht beantwortet werden.

5. DISKUSSION

Die Bindung von Antigenen an das membranständige Ig löst über die assoziierten $Ig\alpha/Ig\beta$ -Heterodimere komplexe Signalübermittlungen in B-Zellen aus. Wie die B-Zelle letztlich reagiert ist von der Reifestufe dieser Zelle, ihrer Lokalisation im Körper, den physiologischen Eigenschaften des Antigens und einer möglichen Komplexierung des Antigens mit Antikörpern oder Komponenten des Komplementsystems abhängig. Die Aktivierung der B-Zelle, die zur weiteren Proliferation und anschließenden Differenzierung zur Plasmazelle führen kann, wird von der $Fc\gamma RIIb1$ -vermittelten Rückkopplung kontrolliert, während die zweite Isoform von humanen $Fc\gamma RIIb$ nur in ruhenden humanen B-Zellen exprimiert wird und nach der B-Zell-Aktivierung nicht mehr nachweisbar ist (Gergely et al., 1994). Coquervernetzung von BCR und heterologen exprimierten humanen $Fc\gamma RIIb$ führt zur spezifischen Tyrosinphosphorylierung des ITIMs von $Fc\gamma RIIb1$ (Budde et al., 1994b). Im Gegensatz zu $Fc\gamma RIIb2$ wird $Fc\gamma RIIb1$ nicht durch Clathrin umhüllte Vesikel internalisiert (Miettinen et al., 1989; Hönig et al., 1991; Amigorena et al., 1992). Außerdem verhindert bei Coquervernetzung von BCR und $Fc\gamma RIIb1$ die konservierte 19 AS lange Insertion von $Fc\gamma RIIb1$ die Endocytose und blockiert die Verarbeitung und Präsentation des BCR-gebundenen Antigens (Minskoff et al., 1998). Das konservierte Motiv AENTITYSLL (ITIM), das man in beiden humanen $Fc\gamma RIIb$ -Isoformen findet, ist für die negative Regulation des frühen Signals, nämlich der Inhibition des Calciumeinstroms, die entscheidende Voraussetzung (Muta et al., 1994). Die ITIM-umgebenden Sequenzen in $Fc\gamma RIIb1$ und besonders die 16 C-terminalen Reste (Fong et al., 2000) nehmen auch wichtigen Einfluß auf die negative Signaltransduktion, die zur veränderten Genexpression führen.

5.1 Unterschiedliche Funktionen von $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ in der negativen $Fc\gamma RIIb1$ -Signalübermittlung

Durch Expression chimärer Rezeptoren aus dem extrazellulären Teil von IgM und dem cytoplasmatischen Teil von $Ig\alpha$ oder $Ig\beta$ konnten die wesentliche Rolle der ITAM-Sequenzen beider Ketten für die BCR-Signalübermittlung nachgewiesen werden. In einigen Studien wurde kein signifikanter Unterschied zwischen von $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ ausgelösten Signalkaskaden gefunden (Law et al., 1993; Williams et al.,

1994; Taddie et al., 1994). Den Übergang vom Pro-B- zum Prä-B-Zellstadium und die Vermittlung des Allelausschlusses (*allelic exclusion*) (Papavasiliou et al., 1995a; Papavasiliou et al., 1995b) einschließlich späterer Phasen der B-Zell-Entwicklung, nämlich Reifung und Aktivierung (Teh et al., 1997) können *in vivo* von beiden Ig α und Ig β cytoplasmatischen Domänen unabhängig induziert werden. Jedoch wurde gefunden, daß chimäre Rezeptoren bestehend aus einem Homodimer von Ig β cytoplasmatischer Region geringere Signale vermitteln (Sanchez et al., 1993; Kim et al., 1993; Choquet et al., 1994; Cassard et al., 1996). Clark et al. (1992) hat gefunden, daß es unterschiedliche Bindungsaffinitäten von Ig α und Ig β für verschiedene intrazelluläre Effektoren gibt. Außerdem spielen Ig α und Ig β eine unterschiedliche Rolle bei der Antigen-Präsentation (Bonnerot et al., 1995).

Die Tyrosinphosphorylierung des ITAMs, die nach BCR-Vernetzung spezifisch induziert wird, stellt die Verbindung zwischen dem aktivierten Rezeptor und der Signalkaskade her. Daher kann die Stärke und die Dauer dieser Phosphorylierung die übermittelte Signalstärke beeinflussen. Die Tyrosinphosphorylierung des ITIMs von heterolog exprimiertem humanen Fc γ RIIb1 kurz nach der Coquervernetzung mit dem BCR (Budde et al., 1994b) weist darauf hin, daß diese Phosphorylierung von den mit dem BCR-Komplex assoziierten Tyrosinkinasen herrührt. Diese wird durch frühere Arbeiten unseres Labors unterstützt, wonach keine Tyrosinkinase mit Fc γ RIIb1 direkt assoziiert (Bewarder et al., 1996). CD22, das in der cytoplasmatischen Region neben drei potentiellen ITIM noch ein typisches ITAM enthält, kann dagegen mit Lyn assoziieren und zeigt eine schwache Tyrosinphosphorylierung in unstimulierten B-Zellen (Tuscano et al., 1996). Außerdem ist die Tyrosinphosphorylierung von Fc γ RIIb1 nur transient. Dies, zusammen mit dem Befund, daß SHP-1 und Maus Fc γ RIIB in einer pITIM-abhängigen Weise miteinander assoziieren können (D'Ambrosio et al., 1995), weist auf die eine Rolle von tyrosinspezifischer Phosphatase in der negativ regulierenden Aktivität des Fc γ RIIb1 hin.

Die getrennte Funktion der Ig α - und Ig β -Ketten in Fc γ RIIb-vermittelten Signalkaskaden und die modulierende Tyrosinphosphorylierung sowohl des ITAMs als auch des ITIMs dieser Rezeptoren wurden in unserem Labor erstmalig detailliert

untersucht. Mit Hilfe von chimären IgM/Ig β -Konstrukten, die zusätzlich in Fc γ RIIb-Isoformen exprimierende Maus B-Zelllinie IIA1.6 transfiziert wurden, konnte bereits nachgewiesen werden, daß bei der Coquervernetzung von IgM/Ig β und beiden Fc γ RIIb-Isoformen das Öffnen der plasmamembranständigen Calciumkanäle mit ähnlicher Effizienz inhibiert wird (Weinrich 1997). IgM/Ig β zeigte wie der endogene BCR (IgG2a) in IIA1.6-Zellen die Fähigkeit, die Phosphorylierung des coquervernetzten Fc γ RIIb1 zu initiieren, wobei IgM/Ig β deutlich schneller als bei IgM/Ig β -Vernetzung dephosphoryliert wurde (Weinrich 1997). Somit scheint das Ig β -Homodimer in sowohl der negativen als auch der positiven Signalübermittlung der B-Zellen wie das endogene Ig α /Ig β -Heterodimer verhalten zu können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zur weiteren detaillierten Aufklärung der Fc γ RIIb-Signalübermittlung ein IgM/Ig α -Konstrukt in die gleiche Zelllinie transfiziert und das Calciumsignal sowie die Tyrosinphosphorylierungskinetik der Fc γ RIIb-Isoformen untersucht. Die anhaltende Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ konnte bei Coquervernetzung von IgM/Ig α und beiden Fc γ RIIb-Isoformen erwartungsgemäß inhibiert werden. Der Calciumeinstrom über Plasmamembrankanäle durch IgM/Ig α -Vernetzung wird offenbar genau wie die endogener BCR- und IgM/Ig β -induzierten Signale durch ITIM nach der Fc γ RIIb-Coquervernetzung gehemmt. Im übrigen wurde eine stärkere Inhibition der initialen Calciumfreisetzung aus dem ER nach Fc γ RIIb1 Coquervernetzung mit IgM/Ig α beobachtet, jedoch nicht nach Coquervernetzung von Fc γ RIIb2 und IgM/Ig α . Der Grund dafür ist nicht klar, aber es könnte an einer stärkeren Blockierung der IgM/Ig α -induzierten PLC- γ 2-Tyrosinphosphorylierung liegen (Sarkar et al., 1996).

Wesentliche Unterschiede wurden bei der Rezeptor-Tyrosinphosphorylierung gefunden. Nicht nur Fc γ RIIb2 sondern auch Fc γ RIIb1 wurden nach ihren Coquervernetzungen mit dem IgM/Ig α nicht phosphoryliert, außerdem wurde die Phosphorylierung von IgM/Ig α nach der Fc γ RIIb-Coquervernetzung im Vergleich zu der IgM/Ig α -Vernetzung nicht beeinflusst. Gleiche Stimulierungen wurden an vorher mit dem Phosphataseinhibitor Pervanadat/H $_2$ O $_2$ behandelten Zellen wiederholt, und auch hier konnten keine tyrosinphosphorylierten Fc γ RIIb-Isoformen nachgewiesen werden. Somit ist auszuschließen, daß eine nachfolgende Dephosphorylierung des

Fc-Rezeptors durch Phosphatasen erfolgt. Im übrigen wurde eine Zunahme der Fc γ RIIb1-Phosphorylierung in Pervanadat/H₂O₂ behandelten Zellen nicht beobachtet, während die ITAM beider Chimärrezeptoren unter denselben Bedingungen viel stärker tyrosinphosphoryliert wurden.

Auch konnte ein tyrosinphosphorylierter Fc γ RIIb2 nach Coquervernetzung mit endogenem BCR nicht detektiert werden, wenn eine Pervanadat/H₂O₂-Inkubation vor Stimulierung der Zellen durchgeführt wurde. Das bedeutet, daß die isoformspezifische Tyrosinphosphorylierung der Fc γ RIIb nicht von einer spezifischen Dephosphorylierung des Fc γ RIIb2, sondern von unterschiedlicher Phosphorylierung beider Isoformen verursacht wird. Offensichtlich ist Fc γ RIIb1 wegen der oben erwähnten Insertion ein besseres Substrat der Tyrosinkinase(n), die für die Fc γ RIIb1-Phosphorylierung verantwortlich ist/sind.

In vitro-Kinase-Studien in unserem Labor haben gezeigt, daß Lyn wahrscheinlich der Kandidat für die Phosphorylierung von Fc γ RIIb1 ist (Bewarder et al., 1996). Diese konnte durch die stark reduzierte Phosphorylierung der Fc γ RIIB in B-Zellen der Lyn^{-/-} Mäusen unterstützt werden, die zudem eine Beeinträchtigung der negativen Signaltransduktion durch Fc γ RIIB aufweisen (Wang et al., 1996; Chan et al., 1997). Die Fähigkeit von Fc γ RIIB, nach Coquervernetzung mit dem Fc ϵ RI die Degranulation und den Calciumspiegel zu unterdrücken, bleibt jedoch in Mastzellen aus dem Knochenmark der Lyn^{-/-} Mäuse unverändert (Nishizumi et al., 1998). Während Syk und Fyn nicht in der Lage sind, die cytoplasmatischen Domäne des Fc-Rezeptors zu phosphorylieren, phosphoryliert Blk beide Fc γ RIIb-Isoformen mit einer deutlichen Präferenz für Fc γ RIIb1 (Bewarder et al., 1996). Ob diese Fc γ RIIb1-Aktivität durch Blk oder andere spezifisch in Mastzellen exprimierten Tyrosinkinasen erhalten bleibt, kann derzeit noch nicht beantwortet werden.

Da beide Ig α - und Ig β -Ketten ein ITAM enthalten, ist eine spezifische Ligandenbindung nur an Ig β zunächst unwahrscheinlich. Allerdings konnten zwei bis jetzt unbekannte 40 und 42 kDa Proteine nachgewiesen werden, für deren Interaktion ein spezifischer Sequenzabschnitt von 4 AS (QTAT) vor dem zweiten Tyrosinrest im ITAM von Ig β verantwortlich sein könnte (Clark et al., 1994). Da Lyn nach Coquervernetzung von chimären IgM-Rezeptoren und Fc γ RIIb in B-Zellen

sowohl mit IgM/Ig α als auch mit IgM/Ig β copräzipitiert werden konnte (Abb. 12), scheint dies nicht koinzident mit der obigen Annahme. Es muß demnach weiter untersucht werden, ob Blk eine unterschiedliche Assoziation mit IgM/Ig α und IgM/Ig β zeigt.

Für den *In vitro*-Kinase-Test wurde ein 1% (w/v) Triton X-100 enthaltende Lysepuffer verwendet und Phosphoproteine mit Hilfe von γ -³²P-ATP und einem Bio-Phosphoimager analysiert. Die Mitisolierung der assoziierten IgM-Chimärrezeptoren bei der Repräzipitation beider Tyrosinkinase sind erwartungsgemäß. Zusätzliche Proteinbanden, die spezifisch mit Lyn copräzipitiert wurden und bei Fc γ RIIb1-Coquervernetzung selektiv mit dem IgM/Ig α oder IgM/Ig β assoziierten, könnten für die unterschiedliche Tyrosinphosphorylierung von Fc γ RIIb1 von Bedeutung sein. In der Literatur zeigt Lyn normalerweise doppelte Banden mit den relativen Molmassen von 53 und 56, wobei die größere Form die aktivere ist (Zhang et al., 1998). Dies ist vermutlich mit dem sog. "mobility shift" Phänomen zu begründen, der aufgrund zusätzlicher Phosphatgruppen des aktivierten Enzyms in der Protein-Gelelektrophorese häufig auftritt. Sollte die 60 kDa Bande bei Coquervernetzung des IgM/Ig β mit Fc γ RIIb1 eine stärker phosphorylierte Form von Lyn sein, könnte eine Kettenreaktion der Tyrosinphosphorylierung aufgrund des strukturellen Unterschieds des Fc γ RIIb1 im Vergleich zu Fc γ RIIb2 ausgelöst werden, wobei Lyn vollständig aktiviert wird und anschließend Fc γ RIIb1 tyrosinphosphoryliert.

In dem cytoplasmatischen Teil von Ig α befinden sich zwei weitere Tyrosinreste außerhalb der ITAM-Konsensussequenz (Abb. 1). Die relativ stärkere Tyrosinphosphorylierung der IgM/Ig α -Chimärrezeptoren, die auch in unstimulierten Zellen detektierbar war, könnte von dem Tyrosinrest, der am N-Terminus des ITAMs liegt, verursacht werden. Die Phosphorylierung zusätzlicher Tyrosine wird zwar nicht in der BCR-Signalkaskaden spezifisch induziert, wie die der konservierten Tyrosinreste des ITAMs, könnte aber bei der Interaktion mit wichtigen Signalelementen wie z. B. Inhibitoren der Signalkaskaden über deren SH2-Domänen oder PTB-Domänen eine Rolle spielen. Hierbei könnten diese basalen Assoziationen für weitere Rekrutierungen nach der Antigenrezeptorvernetzung sowie die anschließende Auslösung der B-Zell-Aktivierung von Bedeutung sein (DeFranco,

1992). Eine mögliche Unterstützung dieser Hypothese sind die systematischen Analysen nach Expression verschiedener cytoplasmatischer Ig α -Mutanten sowohl als kompletter BCR als auch als CD8/Ig α -Chimärrezeptor (Flaswinkel et al., 1994). Während beide mutierten Tyrosine innerhalb der ITAM-Konsensussequenz (Y23 und Y34) von Ig α die quervernetzungsinduzierte Aktivierung der Tyrosinkinase, die Tyrosinphosphorylierung der Substrate und die Erhöhung der Calciumspiegel aufheben können, führt die Mutation des N-terminalen Tyrosinrestes (Y17) zu einem stärkeren Aktivierungssignal. Dies ist zudem gut kompatibel mit dem "Transducer Complex" Modell von Reth et al. (1997). In unstimulierten B-Zellen könnte der Transducer, der selber Tyrosinkinase oder kinaseregulierendes Element ist (Wienands et al., 1996), spezifisch an den cytoplasmatischen Teil der Ig α -Kette binden, so daß einerseits die Aktivität dieses Elementes unterdrückt und andererseits eine unkontrollierbare Phosphorylierung der ITAM der Ig α /Ig β -Heterodimere vermieden wird. Für eine Dissoziation und Aktivierung des Transducers ist Quervernetzung von BCR oder den Chimärrezeptoren (CD8/Ig α oder hier IgM/Ig α) erforderlich, wodurch anschließend die Initiation der BCR-Signaltransduktion ausgelöst wird. Die schnellere und um den Faktor 10 vergrößerte Tyrosinphosphorylierung des Ig α -Homodimers im Vergleich zu der starken Reduzierung der Ig β -Homodimer-Phosphorylierung nach der Coquervernetzung (Luisiri et al., 1996), könnte damit erklärt werden. Es wird seit längerer Zeit diskutiert, daß das Ig α -Protein, dessen Form spezifisch für den jeweiligen Immunglobulinisotyp ist, der beherrschende Bestandteil des BCRs wie die ζ Komponente im TCR ist (Kim et al., 1993; Sanchez et al., 1993). Ein weiterer Hinweis hierfür ist sicherlich, daß der cytoplasmatische Bereich von Ig α effizienter an Tyrosinkinase bindet als der von Ig β (Clark et al., 1992). Die nicht-homologen Aminosäuren sowohl innerhalb als auch außerhalb des ITAMs einschließlich der N-terminalen Tyrosinreste könnten für die unterschiedlichen Funktionen von Ig α und Ig β verantwortlich sein. Der direkte Nachweis zur Überprüfung dieser Hypothese könnten Experimente in Y17-mutierten IgM/Ig α exprimierenden Zellen liefern. Hierdurch könnte der unterschiedliche Einfluß von Ig α und Ig β auf die Fc γ RIIb1-Tyrosinphosphorylierung durch unterschiedliche Bindung an Effektorproteine erklärt werden.

Die phosphorylierten endogenen Ig α - und Ig β -Ketten wurden mit Hilfe der an GST fusionierten SH2-Domänen von Syk spezifisch gefällt (Baumann et al., 1994; Wienands et al., 1995). Die hier durchgeführten Experimente zeigen, daß die Tyrosinphosphorylierung sowohl von Ig α als auch von Ig β in den Fc γ RIIb1-vermittelten negativen Signalkaskaden ähnlich herunterreguliert wird. Somit scheint Ig β für die Initiation der Fc γ RIIb1-Signaltransduktion einschließlich der Dephosphorylierung von Ig α essentiell zu sein. Die nicht modulierte Tyrosinphosphorylierung der endogenen Ig α - und Ig β -Ketten nach Fc γ RIIb2-Coquervernetzung mit dem BCR, zusammen mit der unveränderten Kinetik der Tyrosinphosphorylierung von IgM/Ig α , paßt in das Modell, daß die tyrosinspezifische(n) Phosphatase(n), die für die Ig β - und Ig α -Dephosphorylierung verantwortlich ist/sind, spezifisch von phosphoryliertem ITIM des Fc γ RIIb1 nach Coquervernetzung rekrutiert wird/werden. Auch der phosphorylierte Fc γ RIIb1 selber könnte ein Substrat dieser Phosphatase sein. Die Tyrosinphosphorylierung des ITIMs und die dadurch vermittelte Inhibierung der BCR-Signaltransduktion kann folgendermaßen zusammengefaßt werden:

- 1) Aktivierung der assoziierten Tyrosinkinassen durch BCR-Vernetzung
- 2) Tyrosinphosphorylierung von Ig α , Ig β und Fc γ RIIb1 aufgrund der räumlichen Nähe
- 3) Rekrutierung tyrosinspezifischer Phosphatase(n) durch pITIM
- 4) Dephosphorylierung von Ig α und Ig β
- 5) Inhibierung der pTAM-abhängigen Rekrutierung von Effektorproteinen

Ein Kandidat solcher Phosphatasen, die *SH2-domain-containing Phosphatase-1* SHP-1 (PTP1C), wurde mit Fc γ RIIb1 nur nach Coquervernetzung mit dem BCR copräzipitiert (Weinrich, 1997). Es wird darauf hingewiesen, daß die Wechselwirkung von SHP-1 und Fc γ RIIb1 sowohl transient als auch sehr schwach zu sein scheint, da dieses Experiment nicht gut reproduzierbar ist. Abgesehen von der Beobachtung, daß SHP-1 in der Fc γ RIIb1-Signaltransduktionskaskade aktiviert wird (Sato et al., 1998), konnte bisher eine Assoziation dieser beiden Proteine mit nur sehr niedriger Bindungsaffinität *in vitro* nachgewiesen werden (D'Ambrosio et al., 1995; Pei et al., 1996). Eine andere SH2-Domäne erhaltende tyrosinspezifische Phosphatase SHP-2 (PTP1D), die *in vitro* auch mit phosphoryliertem ITIM von Fc γ RIIb1 assoziiert, könnte

dabei eine komplementäre Rolle spielen. Während nur die C-terminale SH2-Domäne von SHP-1 an das pITIM des Fc γ RIIb1 bindet, können beide Tandem-SH2-Domänen der SHP-2 mit Fc γ RIIb1 assoziieren (Famiglietti et al., 1999). Diese Wechselwirkungen sind möglicherweise für eine volle Phosphataseaktivität von SHP-2 erforderlich. Die Arbeit von Nakamura et al. (1998) hat gezeigt, daß Fusionsproteine bestehend aus der N- oder C-terminalen SH2-Domäne von SHP-2 den Fc γ RIIb1 aus dem Zellysat der stimulierten Zellen präzipitieren können. Es stimmt mit dem neuen Befund überein, daß Fc γ RIIB nach Coquervernetzung mit dem BCR als Homodimer existiert (Famiglietti et al., 1999). Auch konnte nicht ausgeschlossen werden, daß beide SHP-1 und SHP-2 gleichzeitig an Fc γ RIIb1 assoziieren.

SHP-1 ist auch in der negativen Regulation der B-Zell-Aktivierung durch CD22 beteiligt (Doody et al., 1995; Lankester et al., 1995). Untersuchungen in unserem Labor zeigten, daß CD22 bei Coquervernetzung von BCR und heterolog exprimierten humanen Fc γ RIIb1 als bei BCR-Vernetzung schneller tyrosinphosphoryliert wird (Panofen, 1996). Auf diese Weise könnte die Phosphataseaktivität auf phosphorylierte ITAM und ITIM, die spezifisch bei gemeinsamer Quervernetzung von BCR und Fc γ RIIb1 induziert wird, zum Teil von dem BCR-assoziierten CD22 verursacht werden (Peaker et al., 1993; Leprince et al., 1993). SHIP-Proteine, die bei Coquervernetzung von BCR und Fc γ RIIB ebenfalls stärker phosphoryliert werden (Chacko et al., 1996; D'Ambrosio et al., 1996), könnten auch in der Rekrutierung von Phosphatasen ebenso eine Rolle spielen.

5.2 Wesentliche Rolle der SHIP-Proteine in Fc γ RIIb1-vermittelten Signalkaskaden

Während die Rekrutierung von SHP-1 durch Fc γ RIIB *in vivo* kaum detektiert werden kann, sind SHIP-Proteine *in vivo* und *in vitro* die Hauptinteraktionspartner des phosphorylierten ITIMs von Fc γ RIIB (D'Ambrosio et al., 1996; Ono et al., 1996; Ono et al., 1997; Kiener et al., 1997; Nadler et al., 1997; Tridandapani et al., 1997a; Famiglietti et al., 1999; Nakamura et al., 2000).

Zahlreiche Untersuchungen zeigen, daß die SH2-Domäne von SHIP mit dem ITIM von Fc γ RIIB in B-Zellen (Ono et al., 1996; Tridandapani et al., 1997a; Coggeshall,

1998; Muraille et al., 2000), dem KIR-ähnlichen Rezeptor gp49B1 in Mastzellen und PECAM-1 (*Platelet Cell Endothelial Adhesion Molecule 1*, oder CD31) in Blutplättchen, nicht aber mit KIR in NK-Zellen assoziieren kann (Kuroiwa et al., 1998; Gupta et al., 1997; Vely et al., 1997). Dies bedeutet, daß die Assoziation wahrscheinlich auch von Aminosäureresten außerhalb des ITIMs beeinflusst wird. Da die Bindung von SHIP an Fc γ RIIb1 ermöglicht, daß mehrere SHIP-Moleküle zur Plasmamembran gebracht und phosphoryliert werden, ist dies ein wesentlicher Schritt der negativ regulatorischen Signalübermittlung in B-Zellen.

Wie bereits diskutiert spielt die anhaltend erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration für die B-Zell-Aktivierung eine entscheidende Rolle. Homologe Rekombination (*Gene-targeting*) Experimente in DT40-Zellen (B-Zelllinie aus *gallus gallus*) haben gezeigt, daß die intrazellulären Tyrosinkinasen Syk und Btk für die Aktivierung der PLC- γ 2 erforderlich sind, wobei der molekulare Mechanismus lange unverstanden blieb, bevor neue Ergebnisse eine zentrale Rolle des Adapterproteins BLNK bei der Integration des PLC- γ 2 Wegs belegten. Durch Untersuchungen an SHIP-negativen DT40-Zellen wurde die Inhibierung des Calciumsignals durch SHIP nachgewiesen (Ono et al., 1997; Bolland et al., 1998; Okada et al., 1998; Hashimoto et al., 1999b; Aman et al., 2000). Hydrolysierung von PI-3,4,5-P₃ an der 5'-Position durch SHIP kann die Rekrutierung und die nachfolgende Aktivierung von Btk inhibieren. Dies führt wiederum zu einer Reduktion der PLC- γ 2 Aktivität (Bolland et al., 1998; Scharenburg et al., 1998b).

Das Aktivierungssignal in dem PLC- γ -Calciumsignalweg kann durch die in B-Zellen exprimierten inhibitorischen Rezeptoren wie Fc γ RII und PIR (*Paired Immunoglobulin-like Receptor*) -B balanciert werden (Budde et al., 1994a; Yamashita et al., 1998). Während PIR-B die Funktion der tyrosinspezifischen Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 benötigt (Maeda et al., 1998; Maeda et al., 1999) um die BCR-vermittelte Erhöhung von [Ca²⁺]_i herunterzuregulieren, ist das Fc γ RII-vermittelte inhibitorischen Signal von der Lipidphosphatase SHIP abhängig (Kurosaki et al., 2000b). Aufgrund der Beweise für die Rekrutierung von SHIP durch das phosphorylierte ITIM von Fc γ RIIB und der zunehmenden Tyrosinphosphorylierung von SHIP nach Coquervernetzung von BCR und Fc γ RIIB wurde die Hypothese aufgestellt, daß auch die Inhibierung des bisher

nicht charakterisierten Plasmamembran Calciumkanals durch Erhöhung der von SHIP katalysierten Dephosphorylierung bewirkt werden kann (Ono et al., 1996; Kiener et al., 1997; Ono et al., 1997; Nadler et al., 1997; Liu et al., 1998b). Da I-1,3,4,5-P₄ ein Aktivator des Calciumkanals CRAC (*Calcium Release Activated Ca²⁺ channel*) ist (Lückhoff et al., 1992), wurde spekuliert, daß SHIP durch Dephosphorylierung die Menge an I-1,3,4,5-P₄ reduzieren und somit den Calciumeinstrom blockieren könnte.

Ob die Überexpression von SHIP oder *Antisense*-SHIP-Expression eine Beeinflussung von CRAC zur Folge hat, ist nicht veröffentlicht. Das Signal zum Öffnen von membranständigen Calciumkanälen in Lymphocyten wird wahrscheinlich über eine Depletion des ER Ca²⁺ Pools generiert, ähnlich wie die von Putney (1990) vorgeschlagene *Capacitative Ca²⁺ Entry* (CCE) Hypothese für exokrine Zellen. Dafür spricht, daß Inhibitoren für die Ca²⁺-ATPasen im ER (bsp. Thapsigargin) zu einem passiven Verlust von Ca²⁺ aus den ER-Speichern führen und anschließend einen PIP₃-unabhängigen Calciumeinstrom induzieren (Mason et al., 1991; Gouy et al., 1990; Fanger et al., 1995). Da das *Drosophila trp* (*transient receptor potential*) Genprodukt, das im Bereich der Porenregion Homologie zu spannungsgesteuerten Ca²⁺ Kanäle hat (Montell et al., 1989), nach Expression in *Xenopus* Oocyten das durch Thapsigargin-induzierte Öffnen der Speichern-regulierten Calciumkanäle verstärkt (Petersen et al., 1995), könnten die in Vertebraten exprimierte *trp*-ähnliche Proteine für den kapazitativen bzw. Calciumfreisetzung-induzierten Calciumeinstrom verantwortlich sein. Obwohl es bislang keine eindeutigen Hinweise für die durch Calciumfreisetzung aktivierten Calciumkanäle in B-Zellen gibt, konnten Hashimoto und Kollegen (1999b) in DT40-Zellen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie-basierten Einzelzellcalciummessung (*single cell calcium imaging*) demonstrieren, daß der mit Thapsigargin-induzierte Calciumeinstrom nicht von SHIP beeinflusst wird. Der erhöhte Calciumspiegel nach BCR-Vernetzung und die deutlich kleinere Menge von in ER-Speichern verbliebenen Calciumionen in SHIP-negativen DT40-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen, deuten darauf hin, daß eine frühzeitige Beendigung der Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern in Anwesenheit von SHIP zur geringeren Aktivierung im Rahmen der BCR-Signalübermittlung führen kann. Zu einem ähnlichen Ergebnis führten Untersuchungen in BMMCs (*Bone Marrow-derived Mast Cells*) von SHIP^{-/-} und von normalen Mäusen, die einen unveränderten

Thapsigargin-induzierten Calciumeinstrom zeigen, wobei die dadurch stimulierte Degranulation der Mastzellen in SHIP-Knockout-Mäusen erhöht ist (Huber et al., 2000).

Die BCR-vermittelte Erhöhung der intrazellulären Calciumspiegel wird zwar durch SHIP auch in kontrollen Fc γ R-negativen DT40-Zellen reduziert (Okada et al., 1998; Hashimoto et al., 1999b), aber diese Inhibierung ist bei der Fc γ RIIB-Coquervernetzung in transfizierten Zellen deutlich stärker. Neue Studien zeigen, daß die Involvierung von SHIP während der negativen Signalübermittlung in B-Zellen auch die Reduktion der Ras-Aktivität bewirkt. In Abb. 20 wird ein Modell der Fc γ RIIB1-Inhibition bei der B-Zell-Aktivierung durch SHIP zusammengestellt. Die Shc-Phosphorylierung wird in aktivierten B-Zellen stark induziert, worauf die Assoziation und Rekrutierung von Grb2 und Sos mit anschließender Ras-Aktivierung erfolgt. Die Assoziation von SHIP mit p52-Shc ist nur bei Coquervernetzung von BCR und Fc γ RIIB eindeutig zu detektieren (Chacko et al., 1996; Liu et al., 1997b; Aman et al., 2000). Wird Fc γ RIIB mit dem BCR Coquervernetzt, führt dies zur vorübergehenden Assoziation der SHIP SH2-Domäne mit dem pT182 von Fc γ RIIB und anschließend zur Zunahme der SHIP Tyrosinphosphorylierung. Nach der Dissoziation des SHIP:Fc γ RIIB-Komplexes binden die NPXY Motive von SHIP an die PTB Domäne von Shc und gleichzeitig bindet die SH2-Domäne von SHIP an die phosphorylierten Tyrosinreste von Shc (Pradhan et al., 1997; Tridandapani et al., 1999). Dadurch kann die SH2-Domäne von SHIP trotz relativ niedriger Affinität für das phosphorylierte Shc mit der SH2-Domäne von Grb2 konkurrieren und so die Ras/Raf/MAPK-Kaskade blockieren (Tridandapani et al., 1997b). Auch die Rekrutierung der Dok-Proteine durch SHIP über die PTB-Domäne von Dok wird durch die stärkere Phosphorylierung von SHIP erleichtert. Dies reguliert ebenfalls den Ras-Signalweg negativ (Tamir et al., 2000; Lemay et al., 2000), obwohl ein Einfluß von SHIP auf die Erk-Aktivierung bei BCR-Vernetzung nicht festgestellt werden konnte (Okada et al., 1998). Interessanterweise zeigten die Untersuchungen von Ingham et al. (1999), daß eine maximale Shc-Tyrosinphosphorylierung von der SHIP Bindung an die PTB Domäne von Shc abhängig ist.

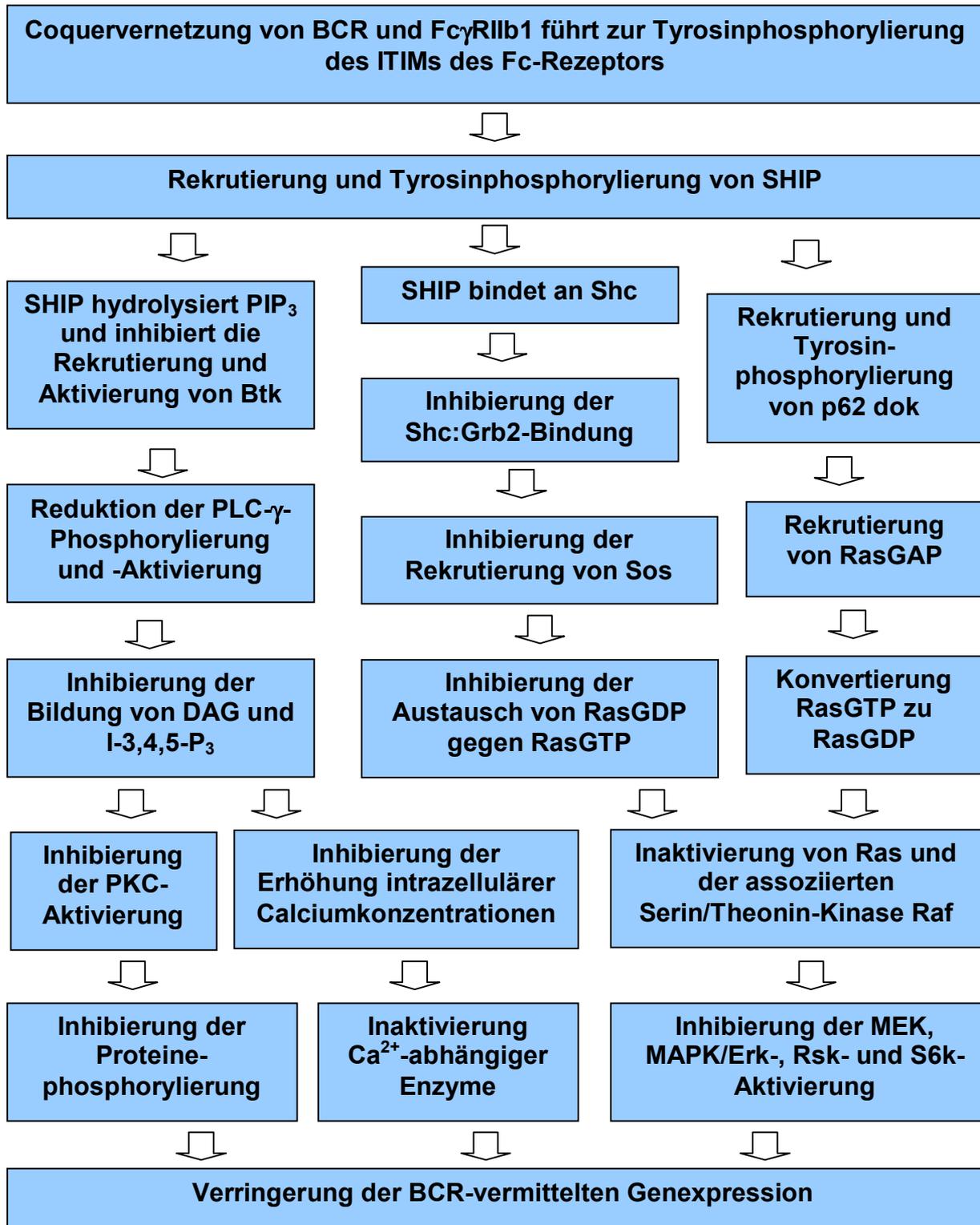


Abb. 20 Modell für die FcγRIIb1-Inhibition der BCR-induzierten Aktivierung durch SHIP.

Die genaue Rekrutierung der SHIP-Proteine, die sich in der positiven und negativen Signalübermittlung von B-Zellen unterscheidet, muß noch durch weitere Untersuchungen aufgeklärt werden. Untersuchungen unseres Labors haben außerdem gezeigt, daß der nach Coquervernetzung mit dem BCR nicht phosphorylierte humane Fc γ RIIb2 in Maus B-Zellen ebenfalls das Öffnen der plasmamembranständigen Calciumkanäle hemmt. In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, daß die Phosphorylierung von Fc γ RIIb1 nach der Coquervernetzung mit dem IgM/Ig α nicht detektierbar war. Die IgM/Ig α -vermittelte Erhöhung der intrazellulären Calciumspiegel konnte ebenfalls durch Fc γ RIIb1 inhibiert werden. Ein sehr geringer Teil von Fc γ RIIb1 könnte trotzdem phosphoryliert sein, der die Inhibition vermittelt. Daher wäre die Transfektion der Tyrosinmutante wichtig gewesen. Möglicherweise können andere spezifisch induzierte Phosphoproteine eine Rolle spielen. Ein ca. 70-72 kDa Protein wurde nach Fc γ RIIb2-Coquervernetzung mit dem BCR, aber nicht nach BCR-Vernetzung, schnell phosphoryliert (30 sec) und konnte spezifisch mit dem BCR:Fc γ RIIb2-Komplex durch die Tandemdomäne GST-(SH2)₂(Syk) präzipitiert werden (Daten nicht gezeigt). Durch Western Blot Analyse konnten wir ausschließen, daß es sich hier um Syk oder HS1 handelt. Viel wahrscheinlicher ist, daß dies ein unbekanntes Adapterprotein ist, das weiter untersucht werden sollte.

Neue Analysen der SHIP-Knockout-Mäuse stellen eine zentrale regulatorische Rolle von SHIP in den BCR-vermittelten Signalkaskaden und B-Zell-Biologie sowohl bei der Aktivierung/Apoptose differenzierter Zellen in der Peripherie als auch bei der Entwicklung hämatopoetischer Vorläuferzellen im Knochenmark heraus (Hegalson et al., 1998; Hegalson et al., 2000; Brauweiler et al., 2000). Obgleich die Bindung der Serin/Threonin-Kinase Akt/PKB an PI-3,4-P₂ *in vitro* zur Aktivierung dieser Kinase führen konnte (Franke et al., 1997; Kippel et al., 1997), wurde gezeigt, daß SHIP in B-Zellen, Fibroblasten und myeloiden Zellen ein inhibitorischen Effekt auf die Akt/PKB Aktivierung vermittelt (Aman et al., 1998; Jacob et al., 1999; Liu et al., 1999). Die Beobachtung der zunehmenden Apoptose von SHIP-negativen DT40-Zellen nach Coquervernetzung von BCR und Fc γ RIIB (Ono et al., 1997; Pearse et al., 1999) und die verstärkte Proliferation primärer B-Zellen der SHIP^{-/-}-Mäuse nach IgM-Vernetzung (Liu et al., 1998b; Hegalson et al., 2000) sind nicht

übereinstimmend. Das heißt, daß SHIP auch eine Rolle in der BCR-Signalübermittlung spielt. Der Mechanismus der SHIP-Proteine in Abwesenheit von Fc γ RIIb1-Coquervernetzung muß daher weiter untersucht werden.

5.3 Modellsysteme für weitere SHIP-Untersuchungen

Im Rahmen der Arbeit wurden zunächst verschiedene Domänen von SHIP kloniert, in *E. coli* zur Expression gebracht und nach erfolgter Aufreinigung zur Produktion polyklonaler Antikörper verwendet. Mit Hilfe von Anti-SH2(SHIP)-Antikörpern konnte festgestellt werden, daß die kleine Isoformen von SHIP durch *in vitro* Protease-Abspaltung verursacht sind (Horn et al., 2001). Diese Ergebnisse liegen nah, daß es sich bei den SHIP-Varianten p125 und p110 general um proteolytischen Abbau handelt, die keine physiologische Relevanz haben.

Intrazellulär exprimierte eukaryotische Proteine werden in *E. coli* häufig in Form von unlöslichen "*inclusion bodies*" abgelagert, wobei intermolekulare Wechselwirkungen von hydrophoben Bereichen eine wichtige Rolle spielen. Für Proteine mit Cysteinresten kann die unvollständige Bildung von Disulfidbrücken im reduzierenden Milieu der Bakterien zu falscher Faltung führen. Die fünf exprimierten potentiellen katalytischen Domänen von SHIP enthalten jeweils fünf bis sieben Cysteinreste, was möglicherweise die Ursache für die unlösliche Expression in *E. coli* ist. Der Anteil von kompletten im Verhältnis zu degradierten Fusionsprotein wurde zwar durch *inclusion bodies* gesteigert, doch der Verlust eines großen Teils der gereinigten Proteine nach Solubilisierungs- und Renaturierungsschritten ist fast nicht zu vermeiden. Es ist also problematisch, die Proteine in größerem Maßstab mit hoher Reinheit z. B. zwecks Kristallisation aufzuarbeiten, um die Grundlagen für ein Verständnis des SHIP-Moleküls legen zu können. Alternative können rekombinante His₆- oder GST-Fusionsproteine auch in einer Reihe anderer Systeme exprimiert werden, nämlich in Säugerzellen, in Insektenzellen mit Hilfe von Bakuloviren oder in Hefezellen. Eine Testexpression einer sezernierten Form der katalytischen Domäne von SHIP wurde im Hefestamm KM71 mit dem *Pichia*-Expressionssystem der Firma Invitrogen durchgeführt, war aber nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt). Da die Röntgenstruktur des SHIP-Moleküls bis jetzt unveröffentlicht ist, wäre die Expression des Proteins in anderen Systemen wie z. B. SHIP in nicht-sezernierter Form, in anderen

Hefestämmen, oder in Säugerzelleexpressionssystemen (COS-7-Zellen, Drayer et al., 1996, Damen et al., 1996, Kavanaugh et al., 1996, Pesesse et al., 1998; Sf9-Insektzellen, Bennett Jefferson, et al., 1997 oder 293T-Zellen, Aman et al., 2000) von großer Bedeutung.

SHIP unterscheidet sich von den anderen Typ II Inositol 5'-Phosphatasen in der Substratspezifität. Und spielt daher für die Signaltransduktion in hämatopoetischen Zellen eine wesentliche Rolle. Um die SHIP-Substratspezifität und die mögliche Regulation der SHIP-Funktion genau untersuchen zu können, ist die Charakterisierung der katalytischen Domäne von SHIP von großer Bedeutung. Nach systematischer *in vitro* Inositol Phosphatase-Analyse mit PI-3,4,5-P₃ und IP₄ als Substrat wurde kürzlich publiziert (Aman et al., 2000), daß die funktionelle katalytische Domäne von Maus SHIP zwischen Aminosäure 400 und 866 liegt. Dies könnte erklärt werden, warum die größte der im Rahmen dieser Arbeit aufgereinigten katalytischen Domänen (AS 396-791) möglicherweise nur geringe Aktivität zeigt. Dennoch zeigt diese geringe katalytische Aktivität offenbar eine Spezifität für die SHIP-Substrate (Prof. Dr. G. W. Mayr, persönliche Mitteilung). Die hier verwendete HPLC-basierte SHIP-Affinitätsmessung (Guse et al., 1995), die relativ aufwendig ist, hat in dem Fall mindestens die gleiche Empfindlichkeit im Vergleich zur traditionellen radioaktiven Methoden. Zur Zeit sind die Bedingungen zum Messen der katalytischen Aktivität von SHIP von Dr. M. Jücker gut etabliert, und erneute Messungen aller fünf Domänen (Abb. 14) an direkt solubilisierten Bakterien-Lysaten statt aufgereinigten Proteinen werden derzeit durchgeführt. Sollten die ersten Ergebnisse reproduzierbar sein, wird der Bereich der AS 396-791 als die minimale SHIP katalytische Domäne bestätigt. Die Aminosäuren zwischen 792 und 866 sind zwar auch essentiell für die SHIP-Aktivität, können aber für die Substratspezifität von SHIP nicht verantwortlich sein. Die positiv geladenen Bereiche von AS 288-430 N-terminal vor der katalytischen Region, die möglicherweise die Affinität von SHIP zu ihren Substraten verstärken könnte, müssen weiter untersucht werden.

Weitere Analysen von SHIP wurde an dem IIA1.6-Modellsystem, das unser Labor für die Untersuchungen der Funktion von FcγRIIb-Isoformen etabliert hat, verwendet. Dazu wurden die FcγRIIb1- oder FcγRIIb2-exprimierenden IIA1.6-Zellen mit der in

pcDNA3 klonierten cDNA für katalytische Domänen von SHIP, für Human und Maus SHIP sowie ein *Antisense*-Oligonucleotid stabil transfiziert und anschließend der Calciumflux am Durchflußcytometer analysiert. Wiederholte Calciumfluß-Analysen an mehreren RT-PCR positiven Klonen ergaben keine signifikante Veränderung des BCR-vermittelten Erhöhung der Calciumspiegel und der Inhibierung dieses Signals nach der Fc γ RIIb-Coquervernetzung (Daten nicht gezeigt). Weitere RT-PCR Untersuchungen mit Hilfe spezifischer Primer wurden durchgeführt, um endogenes SHIP und die transfizierte humane Isoform zu unterscheiden. Die Ergebnisse zeigen, daß die Expression des transfizierten SHIP sehr schwach ist. Außerdem konnte kein Unterschied in der Proteinmenge zwischen *Antisense*-Klonen und untransfizierten Kontrollzellen nachgewiesen werden. Dies bedeutet, daß das *Antisense*-Konstrukt offensichtlich keinen Einfluß auf die Translation hat. Die mit dem CMV-Promotor erreichte Genexpression in IIA1.6- bzw. A20-Zellen ist in Relation zur endogenen Genexpression nicht so stark. In IIA1.6-Zellen können hohe Expressionsraten mit dem "frühen" SV40-Promotor (z. B. Expression der Fc-Rezeptoren), dem "*major late*" Adenovirus-Promotor, SR α -basierten Promotor (z. B. Dok-3-Überexpression, Lemay et al., 2000) und durch retroviralen Gentransfer (FLAG-SH2-Konstrukte, Nakamura et al., 2000) erzielt werden. Die Expression der Maus λ 1-L-Kette ist auch unter Kontrolle eines CMV-Promotors, der extra in die Konstrukte pSV2-gpt-IgM/Ig α bzw. -IgM/Ig β eingebaut wurde (Patel et al., 1993).

Die RT-PCR Daten weisen darauf hin, daß das Expressionsniveau von endogenem SHIP in IIA1.6-Zellen unter bestimmten Kultivierungsbedingungen gesenkt werden könnte. Während es mehrere Klone gibt, die zunächst sehr langsam wachsen und kein SHIP exprimieren, scheint die SHIP-Expression nach einigen Passagen teilweise zuzunehmen. Da die Kontroll-PT-PCR der Expression von β -Aktin bei 25 Zyklen wahrscheinlich die Sättigung erreicht hat, sind weitere quantitative Untersuchungen erforderlich, um die exakten Mengen der SHIP-Expression zu analysieren. Dieses macht die Durchführung und Bewertung der Calciumfluß-Analysen problematisch. Die Ursache dieser unterschiedlichen Expression von SHIP ist unklar, aber eine Möglichkeit liegt darin, daß die SHIP-Überexpression toxisch sein könnte. Die Schwankung würde in Übereinstimmung mit der Beobachtungen sein, daß SHIP eine negative Rolle beim Zellwachstum spielt und zur Apoptose führen kann (Lioubin et

al., 1996; Liu et al. 1997b). Die Ursache liegt wahrscheinlich darin, daß SHIP in B-Zellen und myeloiden Zellen ein inhibitorischen Effekt auf die Akt/PKB Aktivierung vermittelt (Aman et al., 1998; Jacob et al., 1999; Liu et al., 1999). Übrigens wurden bislang keine SHIP-überexprimierenden Zellen veröffentlicht.

Die bis jetzt am besten nachgewiesenen Eigenschaften von SHIP in der Fc γ RIIb1-vermittelten Inhibition des Calciumsignalwegs wurden in der durch homologe Rekombination erzeugten SHIP-negativen Hühner B-Zelllinie DT40 untersucht (Ono et al., 1997; Bolland et al., 1998; Okada et al., 1998; Hashimoto et al., 1999b; Aman et al., 2000). Die neue Fluoreszenzmikroskopie-basierte Einzelzellcalciummessung, die bei den Untersuchungen der SHIP-negativen DT40-Zellen verwendet wird, liefert hier weitere Daten zur funktionellen Analyse. Die überexprimierte SH2-Domäne von SHIP in Maus A20-Zellen konnte z.B. die Rekrutierung von SHIP durch den Fc γ RIIB, sowie die Phosphorylierung von SHIP als auch die Hydrolyse von PI-3,4,5-P₃ durch SHIP blockieren, hatte aber nur einen geringen Einfluß auf Fc γ RIIB-vermittelte Inhibition des Calciumeinstroms (Nakamura et al., 2000). Ob man nach SHIP-Überexpression einen Effekt sehen kann, bleibt bis jetzt noch offen. Während Lemay und Mitarbeiter (2000) demonstrierten, daß überexprimiertes Wt Dok-3 in A20-Zellen durch Rekrutierung von SHIP und Csk die Inhibition BCR-vermittelter NFAT-Aktivierung und IL-2-Sekretion bewirkt, gibt es keinen nennenswerten Einfluß auf die BCR-induzierte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration und die MAPK- und Akt/PKB-Aktivierung konnte nachgewiesen werden. Die SHIP-negativen B-Zellen aus Knockout-Mäusen, die eine erhöhte Proliferation nach BCR-Vernetzung zeigen, haben jedoch im Vergleich zu den Wt Zellen keinen signifikanten Unterschied bei dem Calciumsignal mit Ausnahme der Fc γ RIIB-Coquervernetzung mit dem slgG (Liu et al., 1998b; Helgason et al., 2000). Außerdem zeigten die primären SHIP-negativen Zellen eine erhöhte Tyrosinphosphorylierung von Akt/PKB sowie MAPK sowie eine zunehmende Proliferation bei sowohl Coquervernetzung von slgG und Fc γ RIIB (Liu et al., 1998b) als auch IgM-Vernetzung (Helgason et al., 2000). Die SHIP-negativen DT40-Zellen hatten im Gegensatz dazu eine erhöhte Apoptoserate und verminderte Proliferation nach Coquervernetzung von BCR und Fc γ RIIB (Ono et al., 1997; Pearse et al., 1999). Einerseits könnte ein Unterschied zwischen primären Zellen und Zelllinien bestehen, andererseits liegt wahrscheinlich ein Grund darin, daß

die Signalübermittlung in Maus B-Zellen viel komplexer als die in Hühner B-Zellen ist. SHIP-Homologe in Maus Zellen könnten eine wichtige Rolle spielen und zudem könnten die BCR-vermittelten Signalkaskaden möglicherweise komplizierter sein als bei Hühnern.

Die C-terminale nicht-katalytische Region von SHIP ist nicht nur für viele Wechselwirkungen von SHIP erforderlich, sondern steuert auch neben der SH2-Domäne dessen Funktionen bei wie z. B. die Inhibierung der Differenzierung der erythroiden K562-Zellen und des Calciumflusses in DT40-Zellen (Siegel et al., 1999; Aman et al., 2000). Die selektive Bindung von SHIP an die SH3-Domänen von Grb2 und Src, im Vergleich zu der spezifischen SHIP2:SH3(ABL)-Interaktion in CML Vorläuferzellen, weist darauf hin, daß SHIP und SHIP2 unterschiedliche Signaltransduktionswege modulieren (Kavanaugh et al., 1996; Wisniewski et al., 1999). Ähnliche SHIP:Grb2- und SHIP:Src-Wechselwirkungen wurden in dieser Arbeit gezeigt, außerdem konnte SHIP sowohl in unstimulierten als auch in stimulierten IIA1.6-Zellen mit den SH3-Domänen von Lyn, PI3-K und SH3P7 immunpräzipitiert werden. Die Wechselwirkungen zwischen SHIP und rekombinanten SH3-Domänen verschiedener Adapterproteine und Kinasen bei Quervernetzung von BCR sowie Coquervernetzung von BCR und Fc γ RIIb stimmen mit der katalytischen Aktivität von SHIP bei der Inhibierung des PLC- γ 2-induzierten Calciumsignals und auch der wichtigen Rolle von SHIP in der ITAM- und ITIM-Signalübermittlung überein. Diese Ergebnisse zeigen allerdings nur potentielle Interaktionspartner. Was man durch solche *in vitro* Experimente erfahren kann ist mehr eine Möglichkeit der Wechselwirkung als der absolute Zustand *in vivo*, da biologische Systeme bei der modularen Protein:Protein-Wechselwirkung von mehreren Faktoren abhängig sein können. Ein vorhergesagter Ligand für die SH3-Domäne ist durchaus imstande, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mit einer Reihe von SH3-Domänen zu assoziieren (Sudol et al., 1998). Eine genaue Beschreibung des realen Zustandes könnte nur geschehen, wenn die lokalen Konzentrationen aller möglichen Bindungspartner und ihre Dissoziationskonstanten bekannt sind. Mit welchem Interaktionspartner SHIP zu welchem Zeitpunkt assoziiert werden genauere Untersuchungen daher in Zukunft darüber Aufschluß geben können.

Da die 3'-Positionen von Inositol-Phospholipiden phosphoryliert werden müssen, bevor SHIP diese an der 5'-Position hydrolysieren kann (Damen et al., 1996), gibt es die Möglichkeit, daß SHIP-Proteine viele, wenn nicht alle, von der PI3-Kinase-induzierten Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Ende der Zell-Aktivierung, Zell-Bewegung und Adhäsion von B-Zellen, Mastzellen, Entwicklung von *Xenopus* Oocyten sowie die mit G-CSF und M-CSF behandelte Zellen negativ regulieren können (Huber et al., 1998; Huber et al., 1999; Lioubin et al., 1996; Chacko et al., 1996; Tridandapani et al., 1997; Ono et al., 1996; Liu et al., 1999; Deuter-Reinhard et al., 1997; Hunter et al., 1998). Aus diesem Grund werden SHIP-Proteine, aufbauend auf den zum Teil in dieser Arbeit erzielten Erkenntnissen, in den nächsten Jahren Gegenstand intensiver Forschung sein.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Aktivierung der B-Zellen ist ein exakt regulierter Prozeß, der vor allem von dem B-Zell-Rezeptor Komplex gesteuert wird. Die assoziierten Ig α - und Ig β -Ketten befähigen das membranständige IgG, IgM und IgD, das Zellinnere von der Antigenbindung zu unterrichten, und damit die B-Zell-Proliferation und Differenzierung ruhender B-Zellen zu antikörpersezierenden Plasmazellen zu initiieren. Die von B-Zellen exprimierten Oberflächenmoleküle unterliegen der Kontrolle dieses Aktivierungsprozesses. Die Regulation von Fc γ R11b1, der eine wichtige Funktion bei der Termination der B-Zell-Antwort ausübt, wurde im Vergleich mit der Fc γ R11b2-Isoform an der FcR-negativen Maus B-Zelllinie IIA1.6 durch stabile Expression von unserem Labor erfolgreich untersucht.

Um die Bedeutung beider ITAM-tragenden Ig α - und Ig β -Ketten in der negativen Signaltransduktion analysieren zu können, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Chimärrezeptor IgM/Ig α zusätzlich in die Fc γ R11b1- und Fc γ R11b2-exprimierenden Zellen transfiziert. Der Einfluß beider Fc γ R11b-Isoformen auf die Ig α -vermittelten Signale wurde im direkten Vergleich mit der Fc γ R11b-Coquervernetzung mit dem IgM/Ig β näher untersucht. Es konnte erstmals gezeigt werden, daß Ig α und Ig β eine unterschiedliche Rolle in der Fc γ R11b-vermittelten Signalkaskaden spielen.

Die Fc γ R11b-Coquervernetzung mit dem Chimärrezeptor führte nur in IgM/Ig β -, aber nicht IgM/Ig α -, exprimierenden Zellen zur Tyrosinphosphorylierung des ITIMs von Fc γ R11b1, Jedoch hemmten beider Fc γ R11b-Isoformen den IgM/Ig α bzw. IgM/Ig β induzierten Calciumeinstrom. Diese Ergebnisse stimmen mit den von unserem Labor bereits publizierten Daten überein, daß die Hemmung des Öffnens der Plasmamembrancalciumkanäle unabhängig von der Tyrosinphosphorylierung des ITIMs vermittelt wird. Trotz Pervanadat/H₂O₂-Inhibierung der Phosphatasen war die ITIM-Tyrosinphosphorylierung bei der Coquervernetzung von IgM/Ig α und Fc γ R11b nicht detektierbar. Es ist also möglich, daß die Tyrosinkinase(n), die für die Phosphorylierung von Fc γ R11b1 verantwortlich ist/sind, nur in Anwesenheit von Ig β rekrutiert wird/werden. Untersuchungen von endogenen Ig α und Ig β bei Coquervernetzung des membranständigen IgGs und Fc γ R11b1 zeigten beide Ketten eine reduzierte Tyrosinphosphorylierung im Vergleich zur BCR-Vernetzung. Eine

ähnliche Phosphorylierungskinetik konnte bei der Fc γ RIIb1-Coquervernetzung nur von IgM/Ig β , aber nicht IgM/Ig α , beobachtet werden. Dies weist auf eine essentielle Bedeutung von Ig β für die Initiation der Fc γ RIIb1-vermittelten Signalkaskaden hin. Die selektive Phosphorylierung des ITIMs von Fc γ RIIb1 bei der Coquervernetzung in Anwesenheit von Ig β deutet auf die Beteiligung einer tyrosinspezifischen Phosphatase hin.

An der Regulation des BCR-vermittelten Calciumionenanstiegs ist eine SH2-Domäne enthaltende Inositol Polyphosphat 5'-Phosphatase SHIP beteiligt. SHIP hydrolysiert selektiv PI-3,4,5-P₃ und *in vitro* I-1,3,4,5-P₄, die beide eine wichtige Rolle in dem Calciumsignalweg spielen. SHIP wird nach der Fc γ RIIb1-Coquervernetzung mit dem BCR von dem phosphorylierten ITIM rekrutiert, anschließend tyrosinphosphoryliert und assoziiert mit einer Reihe von Signalübermittelnden Proteinen. Um die SHIP-Proteine genauer analysieren zu können, wurden im zweiten Teil dieser Arbeit zuerst rekombinante SHIP-SH2-Domäne in *E. coli* exprimiert und polyklonale Antikörper hergestellt. Die unlöslich exprimierten katalytischen Domänen von SHIP wurden nach einer Solubilisierungs-Renaturierungsstrategie in die enzymatisch aktive Form überführt und gegen diese wurde ein weiteres Antiserum synthetisiert. Beide Antikörper sind für Western Blot geeignet, jedoch nicht zum Präzipitieren von endogenem SHIP.

Die Assoziation von SHIP über dessen prolinreichen C-Terminus mit rekombinanten SH3-Domänen von Lyn, PI3-Kinase und SH3P7 konnten neben der bekannten SHIP:Grb2- und SHIP:Src-Wechselwirkungen in beiden stimulierten und unstimulierten IIA1.6-Zellen nachgewiesen werden. Für weitere Untersuchungen an SHIP in sowohl der positiven als auch der negativen Signalübermittlung der B-Zelle ist meiner Meinung nach ein neues effizienteres Modellsystem erforderlich, da die SHIP-mRNA-Mengen in IIA1.6-Zellen mit der Kultivierung offensichtlich variieren können, so daß dies die SHIP-Überexpression und die *Antisense*-Expression erschweren.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Aluvihare, V. R.; Khamlichi, A. A.; Williams, G. T.; Adorini, L.; Neuberger, M. S. (1997)** Acceleration of intracellular targeting of antigen by the B-cell antigen receptor: importance depends on the nature of the antigen-antibody interaction. *EMBO J.* 16: 3553-3562.
- Aman, M. J.; Lamkin, T. D.; Okada, H.; Kurosaki, T.; Ravichandran, K. S. (1998)** The inositol phosphatase SHIP inhibits Akt/PKB activation in B cells. *J. Biol. Chem.* 273: 33922-33928.
- Aman, M. J.; Walk, S. F.; March, M. E.; Su, H.; Carver, D. J.; Ravichandran, K. S. (2000)** Essential role for the C-terminal noncatalytic region of SHIP in FcγRIIB1-mediated inhibitory signaling. *Mol. Cell. Biol.* 20(10): 3576-3589.
- Amigorena, S.; Bonnerot, C.; Drake, J. R.; Choquet, D.; Hunziker, W.; Guillet, J. -G.; Webster, P.; Sautes, C.; Mellman, I.; Fridman, W. H. (1992)** Cytoplasmic domain heterogeneity and functions of IgG Fc receptor in B lymphocytes. *Science* 256: 1808-1812.
- Artelt, P.; Morelle, C.; Ausmeier, M.; Fitzek, M.; Hauser, H. (1988)** Vectors for efficient expression in fibroblastoid, myeloid and lymphoid cells via transfection or infection. *Gene* 68: 213-219.
- Ashman, R. F.; Peckham, D.; Stunz, L. L. (1996)** Fc receptor off signal in the B cell involves apoptosis. *J. Immunol.* 157: 5-11.
- Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Sedman, J. G.; Smith, J. A.; Struhl, K. eds. (1995)** *Current protocols in molecular biology.* John Wiley and Sons, New York.
- Baumann, G.; Maier, D.; Freuler, F.; Tschopp, C.; Baudisch, K.; Wienands, J. (1994)** In vitro characterization of major ligands for Src Homology 2 domains derived from protein tyrosine kinases, from the adapter protein Shc and from GTPase-activating protein in Ramos B cells. *Eur. J. Immunol.* 24: 1799-1807.
- Benatar, T.; Carsetti, R.; Furlonger, C.; Karnalia, N.; Mak, T.; Paige, C. J. (1996)** Immunoglobulin-mediated signal transduction in B cells from CD45-deficient mice. *J. Exp. Med.* 183: 329-334.
- Bennett Jefferson, A.; Auethavekiat, V.; Pot, D. A.; Williams, L. T.; Majerus, P. W. (1997)** Signaling inositol polyphosphate-5-phosphatase: characterization of activity and effect of Grb2 association. *J. Biol. Chem.* 272: 5983-5988.
- Bennett, A. M.; Tang, T. L.; Sugimoto, S.; Walsh, C. T.; Neel, B. G. (1994)** Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 couples platelet-derived growth factor receptor beta to Ras. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 7335-7339.
- Bewarder, N. (1997)** FcγRIIa-induzierte Signalvermittlungsprozeß in B-Zellen. Dissertation (Universität Bielefeld).
- Bewarder, N.; Weinrich, V.; Budde, P.; Hartmann, D.; Flaswinkel, H.; Reth, M.; Frey, J. (1996)** In vitro and in vivo specificity of protein tyrosine kinases for immunoglobulin G receptor (FcγRII) phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 16(9): 4735-4743.
- Birnboim, H. C.; Doly, J. (1979)** A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7: 1513-1522.
- Bolland, S.; Pearse, R. N.; Kurosaki, T.; Ravetch, J. V. (1998)** SHIP modulates immune receptor responses by regulating membrane association of Btk. *Immunity* 8: 509-516.

- Bonnerot, C.; Amigorena, S.; Choquet, D.; Pavlovich, R.; Choukroun, V.; Fridman, W. H. (1992) *Role of associated γ -chain in tyrosine kinase activation via murine Fc γ RIII. EMBO J. 11: 2747-2757.*
- Bonnerot, C.; Lankar, D.; Hanau, D.; Spehner, D.; Davoust, J.; Salamero, J.; Fridman, W. H. (1995) *Role of B cell receptor Ig α and Ig β subunits in MHC class II-restricted antigen presentation. Immunity 3:335-347.*
- Boudwijn, B. M.; Coffey, P. J. (1995) *Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol 3-OH kinase signal transduction. Nature 376: 599-602.*
- Bradford, M. A. (1976) *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.*
- Brauweiler, A.; Tamir, D.; Dal Porto, J.; Benschop, R. J.; Helgason, C. D.; Humphries, R. K.; Freed, J. H.; Cambier, J. C. (2000) *Differential regulation of B cell development, activation, and death by the Src homology 2 domain-containing 5-inositol phosphatase (SHIP). J. Exp. Med. 191: 1545-1554.*
- Brooks, D. G.; Qiu, W. Q.; Luster, A. D.; Ravetch, J. V. (1989) *Structure and expression of human IgG FcRII (CD32). J. Exp. Med. 170: 1269-1385.*
- Bruyns, C.; Pesesse, X.; Moreau, C.; Blero, D.; Erneux, C. (1999) *The two SH2-domain-containing inositol 5-phosphatases SHIP1 and SHIP2 are coexpressed in human T-lymphocytes. Biol. Chem. 380: 969-974.*
- Budde, P. (1995) *Regulation von Immunglobulin G Rezeptor Funktionen in B-Zellen. Dissertation (Universität Bielefeld).*
- Budde, P.; Bewarder, N.; Weinrich, V.; Frey, J. (1994a) *Biological functions of human Fc γ RIIa/Fc γ RIIc in B cells. Eur. J. Cell. Biol. 64: 45-60.*
- Budde, P.; Bewarder, N.; Weinrich, V.; Schulzeck, O.; Frey, J. (1994b) *Tyrosine-containing sequence motifs of the human immunoglobulin G receptors FcRIIb1 and FcRIIb2 essential for endocytosis and regulation of calcium flux in B cells. J. Biol. Chem. 269: 30636-30644.*
- Bullock, W. O.; Fernandez, J. M.; Short, J. M. (1987) *BioTechniques 5: 376-379.*
- Burg, D. L.; Furlong, M. T.; Harrison, M. L.; Geahlen, R. L. (1994) *Interactions of Lyn with the antigen receptor during B-cell activation. J. Biol. Chem. 269: 136-142.*
- Burkhardt, A. L.; Brunswick, M.; Bolen, J. B.; Mond, J. J. (1991) *Anti-immunoglobulin stimulation of B lymphocytes activates src-related protein tyrosine kinases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7410-7414.*
- Burnette, W. N. (1981) *"Western Blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfat-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated Protein A. Anal. Biochem. 112: 195-203.*
- Burshtyn, D. N.; Scharenberg, A. M.; Wagtmann, N.; Rajagopalan, S.; Berrada, K.; Yi, T.; Kinet, J. P.; Long, E. O. (1996) *Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitory receptor. Immunity 4: 77-85.*
- Cambier, J. C. (1995) *New nomenclature for the Reth motif (or ARH1/TAM/ARAM/YXXL) [letter]. Immunol. Today 16: 110.*
- Cambier, J. C.; Jensen, W. A. (1994a) *The hetero-oligomeric antigen receptor complex and its coupling to cytoplasmic effectors. Curr. Opin. Gen. Develop. 4: 55-63.*
- Cambier, J. C.; Pleiman, C.; Clark, M. C. (1994b) *Signal transduction by the B-cell antigen receptor and its coreceptors. Annu. Rev. Immunol. 12: 457-486.*

- Campbell, M. A.; Sefton, B. M. (1990)** *Protein tyrosine phosphorylation is induced in murine B lymphocytes in response to stimulation with anti-immunoglobulin.* *EMBO J.* 9: 2125-2132.
- Campbell, M. A.; Sefton, B. M. (1992)** *Association between B-lymphocyte membrane immunoglobulin and multiple members of the Src family of protein tyrosine kinases.* *Mol. Cell. Biol.* 12: 2315-2321.
- Carlberg, K.; Rohrschneider, L. R. (1997)** *Characterization of a novel tyrosine phosphorylated 100 kDa protein that binds to SHP-2 and phosphatidylinositol 3-kinase in hematopoietic cells.* *J. Biol. Chem.* 272: 15943-15950.
- Cassard, S.; Choquet, D.; Fridman, W. H.; Bonnerot, C. (1996)** *Regulation of ITAM signaling by specific sequences in Ig β B-cell antigen receptor subunit.* *J. Biol. Chem.* 271: 23786-23791.
- Castells, M. C.; Wu, X.; Arm, J. P.; Austen, K. F.; Katz, H. R. (1994)** *Cloning of the gp49 gene of the immunoglobulin superfamily and demonstration that one of its two products is an early-expressed mast cell surface protein originally described as gp49.* *J. Biol. Chem.* 269: 8393-8401.
- Chacko, G. W.; Tridandapani, S.; Damen, J. E.; Liu, L.; Krystal, D.; Coggeshall, K. M. (1996)** *Negative signaling in B lymphocytes induces tyrosinphosphorylation of the 145-kDa inositol polyphosphate 5-phosphatase, SHIP.* *J. Immunol.* 157: 2234-2238.
- Chan, V. W. F.; Meng, F.; Soriano, P.; DeFranco, A. L.; Lowell, C. A. (1997)** *Characterization of the B lymphocyte populations in Lyn-deficient mice and the role of Lyn in Signal initiation and down-regulation.* *Immunity* 7: 69-81.
- Cheng, A. M.; Rowley, B.; Pao, W.; Hayday, A.; Bolen, J. B.; Pawson, T. (1995)** *Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development.* *Nature* 378: 303-306.
- Choquet, D.; Ku, G.; Cassard, S.; Malissen, B.; Korn, H.; Fridman, W. H.; Bonnerot, C. (1994)** *Different patterns of calcium signaling triggered through two components of the B lymphocyte antigen receptor.* *J. Biol. Chem.* 269: 6491-6497.
- Choquet, D.; Partiseti, M.; Amigorena, S.; Bonnerot, C.; Fridman, W. H.; Korn, H. (1993)** *Cross-linking of IgG receptors inhibits membrane immunoglobulin-stimulated calcium influx in B-lymphocytes.* *J. Cell Biol.* 121: 355-363.
- Clark, M. R.; Campbell, K. S.; Kazlauskas, A.; Johnson, S. A.; Hertz, M.; Potter, T. A.; Pleiman, C.; Cambier, J. C. (1992)** *The B cell antigen receptor complex: association of Ig α and Ig β with distinct cytoplasmic effectors.* *Science* 258: 123-126.
- Clark, M. R.; Johnson, S. A.; Cambier, J. C. (1994)** *Analysis of the Ig α -tyrosine kinase interaction reveals two levels of binding specificity and tyrosine phosphorylated Ig α stimulation of Fyn activity.* *EMBO J.* 13: 1911-1919.
- Coggeshall, K. M. (1998)** *Inhibitory signaling by B cell Fc γ R11b.* *Curr. Opin. Immunol.* 10: 306-312.
- Conley, M. E.; Rohrer, J. (1995)** *The spectrum of mutations in Btk that cause X-linked agammaglobulinemia.* *Clin. Immunol. Immunopathol.* 76: 192-197.
- Cooper, J. A.; Howell, B. (1993)** *The when and how of Src regulation.* *Cell* 73: 1051-1054.
- Crowley, M. T.; Harmer, S. L.; DeFranco, A. L. (1996)** *Activation-induced association of a 145-kDa tyrosine-phosphorylated protein with Shc and Syk in B lymphocytes and macrophages.* *J. Biol. Chem.* 271: 1145-1152.

- Cyster, J. G.; Goodnow, C. C. (1995)** *Protein tyrosine phosphatase 1C negatively regulates antigen receptor signaling in B lymphocytes and determines thresholds for negative selection. Immunity 2: 13-24.*
- D'Ambrosio, D.; Fong, D. C.; Cambier, J. C. (1996)** *The SHIP phosphatase becomes associated with FcγRIIb1 and is tyrosine phosphorylated during "negative signaling". Immunol. Lett. 54: 77-82.*
- D'Ambrosio, D.; Hippen, K. L.; Minskoff, S. A.; Mellman, I.; Pani, G.; Siminovitch, K. A.; Cambier, J. C. (1995)** *Recruitment and activation of PTP1C in negative regulation of antigen receptor signaling by FcγRIIB1. Science 268: 293-297.*
- Daeron, M. (1997)** *Fc receptor biology. Annu. Rev. Immunol. 15: 203-234.*
- Damen, J. E.; Liu, L.; Cutler, R. L.; Krystal, G. (1993)** *Erythropoietin stimulates the tyrosine phosphorylation of Shc and its association with Grb2 and a 145-kDa tyrosine phosphorylated protein. Blood 82: 2296-2303.*
- Damen, J. E.; Liu, L.; Rosten, P.; Humphries, R. K.; Jefferson, A. B.; Majerus, P. W.; Krystal, G. (1996)** *The 145 kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetrakisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphatase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1689-1693.*
- Damen, J. E.; Liu, L.; Ware, M. D.; Ermolaeva, M.; Majerus, P. W.; Krystal, G. (1998)** *Multiple forms of the SH2-containing inositol phosphatase, SHIP, are generated by C-terminal truncation. Blood 92: 1199-1205.*
- Damerval, C.; Guilloux, M.; Blaisomeau, J.; Vienne, D. (1987)** *Simplification of Heukeshoven and Dernick's silver stain of proteins. Electrophoresis 8: 158-159.*
- DeFranco, A. L. (1992)** *Tyrosine phosphorylation and the mechanism of signal transduction by the B-lymphocyte antigen receptor. Eur. J. Biochem. 210: 381-388.*
- DeFranco, A. L. (1993)** *Structure and function of the B cell antigen receptor. Annu. Rev. Cell. Biol. 9: 377-410.*
- DeFranco, A. L. (1995)** *Transmembrane signaling by antigen receptors of B and T lymphocytes. Curr. Opin. Cell Biol. 7: 163-175.*
- Del Sal, G.; Mannoletti, G.; Schneider, C. (1988)** *An onetube plasmid DNA mini-preparation suitable for sequencing. Nucl. Acids Res. 16: 9878.*
- Denhardt, D. T. (1996)** *Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signaling. Biochem. J. 318: 729-741.*
- Deuter-Reinhard, M.; Apell, G.; Pot, D.; Klippel, A.; Williams, L. T.; Kavanaugh, W. M. (1997)** *SIP/SHIP inhibits Xenopus oocyte maturation induced by insulin and phosphatidylinositol 3-kinase. Mol. Cell. Biol. 17: 2559-2565.*
- Diegel, M. L.; Rankin, B. M.; Bolen, J. B.; Dubois, P. M.; Kiener, P. A. (1994)** *Cross-linking of Fcγ receptor to surface immunoglobulin on B cells provides an inhibitory signal that closes the plasma membrane calcium channel. J. Biol. Chem. 269: 11409-11416.*
- Doody, G. M.; Justement, L. B.; Delibrias, C. C.; Matthews, R. J.; Lin, J.; Thomas, M. L.; Fearson, D. T. (1995)** *A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP. Science 269: 242-244.*
- Doody, G. M.; Dempsey, P. W.; Fearon, D. T. (1996)** *Activation of B lymphocytes: integrating signals from CD19, CD22 and FcγRIIb1. Curr. Opin. Immunol. 8: 378-362.*

- Drachman, J. G.; Griffin, J. D.; Kaushansky, K. (1995)** *The c-Mp1 ligand (thrombopoietin) stimulates tyrosine phosphorylation of Jak2, Shc and c-Mp1.* *J. Biol. Chem.* 270: 4979-4982.
- Drayer, A. L.; Pesesse, X.; De Smedt, F.; Woscholski, R.; Parker, P.; Erneux, C. (1996)** *Cloning and expression of a human placenta inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate 5-phosphatase.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225(1): 243-249.
- Engelhardt, W.; Gorczytza, H.; Butterweck, A.; Mönkemann, H.; Frey, J. (1991)** *Structural requirements of the cytoplasmic domains of the human macrophage Fcγ receptor IIa and B cell Fcγ receptor IIb2 for the endocytosis of immune complexes.* *Eur. J. Immunol.* 21: 2227-2238.
- Famiglietti, S. J.; Nakamura, K.; Cambier, J. C. (1999)** *Unique features of SHIP, SHP-1 and SHP-2 binding to FcγRIIb revealed by surface plasmon resonance analysis.* *Immunol. Lett.* 68: 35-40.
- Fanger, C. M.; Hoth, M.; Crabtree, G. R.; Lewis, R. S. (1995)** *Characterization of T cell mutants with defects in capacitative calcium entry: genetic evidence for the physiological roles of CRAC channels.* *J. Cell Biol.* 131: 655-667.
- Felder, S.; Zhou, M.; Hu, P.; Urena, J.; Ullrich, A.; Chaudhuri, M.; White, M.; Shoelson, S. E.; Schlessinger, J. (1993)** *SH2 domains exhibit high-affinity binding to tyrosine-phosphorylated peptides yet also exhibit rapid dissociation and exchange.* *Mol. Cell. Biol.* 13: 1449-1455.
- Feng, G. S.; Hui, C. C.; Pawson, T. (1993)** *SH2-containing phosphotyrosine phosphatase as a target of protein-tyrosine kinases.* *Science* 259: 1607-1611.
- Flaswinkel, H.; Reth, M. (1994)** *Dual role of the tyrosine activation motif of the Igα protein during signal transduction via the B cell antigen receptor.* *EMBO J.* 13: 83-89.
- 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.; Rawlings, D. J. (1998)** *Btk/Tec kinases regulate sustained increases in intracellular Ca²⁺ following B-cell receptor activation.* *EMBO J.* 17: 1973-1985.
- Fong, D. C.; Brauweiler, A.; Minskoff, S. A.; Bruhns, P.; Tamir, I.; Mellman, I.; Daeron, M.; Cambier, J. C. (2000)** *Mutational analysis reveals multiple distinct sites within Fc Receptor IIB that function in inhibitory signaling.* *J. Immunol.* 165: 4453-4462.
- Frangioni, J. V.; Neel, B. G. (1993)** *Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins.* *Anal. Biochem.* 210: 179-187.
- Franke, T. F.; Kaplan, D. R.; Cantley, L. C.; Toker, A. (1997)** *Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate.* *Science* 275: 665-668.
- Freeman, R. M. Jr.; Plutzky, J.; Neel, B. G. (1992)** *Identification of a human src homology 2-containing protein-tyrosine-phosphatase: a putative homologue of Drosophila corkscrew.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 11239-11243.
- Fu, C.; Turck, C. W.; Kurosaki, T.; Chan, A. C. (1998)** *BLNK: a central linker protein in B cell activation.* *Immunity* 9: 93-103.
- Geier, S. J.; Algate, P. A.; Carlberg, K.; Flowers, D.; Friedman, C.; Trask, B.; Rohrschneider, L. R. (1997)** *The human SHIP gene is differentially expressed in cell lineages of the bone marrow and blood.* *Blood* 89: 1876-1885.

- Gergely, J.; Rozsnyay, Z.; Sarmay, G. (1994)** *New aspects of FcRII mediated B-cell inhibition. Immunologist* 2: 77-81.
- Ghazizaadeh, S.; Bolen, J. B.; Fleit, H. B. (1994)** *Physical and functional association of Src-related protein tyrosine kinases with FcγRII in monocytic THP-1 cells. J. Biol. Chem.* 269: 8878-8884.
- Giuriato, S.; Payrastré, B.; Drayer, A. L.; Plantavid, M.; Woscholski, R.; Parker, P.; Erneux, C.; Chap, H. (1997)** *Tyrosine phosphorylation and relocation of SHIP are integrin-mediated in thrombin-stimulated human blood platelets. J. Biol. Chem.* 272: 26857-26853.
- Goitsuka, R.; Fujimura, Y. -I.; Mamada, H.; Umeda, A.; Morimura, T.; Uetsuka, K.; Doi, K.; Tsuji, S.; 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.; DeFranco, A. L. (1994)** *Biochemistry of B lymphocyte activation. Adv. Immunol.* 55:221-295.
- Gold, M. R.; Matsuuchi, L.; Kelly, R. B.; DeFranco, A. L. (1991)** *Tyrosine phosphorylation of components of the B-cell antigen receptors following receptor cross-linking. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3436-3440.
- Gong, S.; Nussenzweig, M. C. (1996)** *Regulation of an early developmental checkpoint in the B cell pathway by Igβ. Science* 272: 411-414.
- Gorczytza, H. (1991)** *Konstruktion und Expression von zytoplasmatischen Deletionsmutanten und Isoformen des B-Zell Immunglobulinrezeptors II (FcγRIIb). Dipolmarbeit (Universität Bielefeld).*
- Gottschalk, A. R.; Joseph, L. J.; Quintans, J. (1994)** *FcγRII cross-linking inhibits anti-Ig-induced egr-1 and egr-2 expression In BCL₁. J. Immunol.* 152: 2115-2122.
- Gouy, H.; Cefai, D.; Christensen, S. B.; Debre, P.; Bismuth, G. (1990)** *Ca²⁺ influx in human T lymphocytes is induced independently of inositol phosphate production by mobilization of intracellular Ca²⁺ stores. A study with the endoplasmatic reticulum-ATPase inhibitor thapsigargin.*
- Greenman, J.; Tutt, A. L.; George, A. J. T.; Pulford, K. A. F.; Stevenson, G. T.; Glennie, M. J. (1991)** *Characterization of a new monoclonal anti-FcγRII antibody, AT10, and its incorporation into bispecific F(ab')₂ derivative for recruitment of cytotoxic effectors. Mol. Immunol.* 28: 1243-1254.
- Grodberg, J.; Dunn, J. J. (1988)** *OmpT encodes the Escherichia coli outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. J. Bacteriol.* 170: 1245-1253.
- Gu, H.; Pratt, J. C.; Burakoff, S. J.; Neel, B. G. (1998)** *Cloning of p97/Gab2, the major SHP-2-binding protein in hematopoietic cells, reveals a novel pathway for cytokine-induced gene activation. Mol. Cell* 2: 729-740.
- Guan, K. -L.; Dixon, J. E. (1991)** *Eukaryotic proteins expressed in Escherichia coli: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. Anal. Biochem.* 192: 262-267.
- Gupta, N.; Scharenberg, A. M.; Burshtyn, D. N.; Lioubin, M. N.; Rohrschneider, L. R.; Kinet, J. -P.; Long, E. O. (1997)** *Negative signaling pathways of killer cell inhibitory receptors and FcγRIIb1 require distinct phosphatases. J. Exp. Med.* 186: 473-478.
- Gupta, N.; Scharenberg, A. M.; Furman, D. A.; Cantley, L. C.; Kinet, J. -P.; Long, E. O. (1999)** *The SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase (SHIP)*

- recruits the p85 subunit of phosphoinositide 3-kinase during Fc γ R11b1-mediated inhibition of B cell receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 274: 7489-7494.
- Guse, A. H.; Goldwich, A.; Weber, K.; Mayr, G. W. (1995)** Non-radioactive, isomer-specific inositol phosphate mass determinations: high-performance liquid chromatography-micro-metal-dye detection strongly improves speed and sensitivity of analyses from cells and micro-enzyme assays. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* 672(2): 189-98.
- Hönig, S.; Jockusch, B. M.; Kreimer, G.; Veltel, D.; Robenek, H.; Engelhardt, W.; Frey, J. (1991)** Endocytosis of human IgG:Fc receptor complexes by transfected BHK cells. *Eur. J. Cell Biol.* 55: 48-59.
- Habib, T.; Hejna, J. A.; Moses, R. E.; Decker, S. T. (1998)** Growth factors and insulin stimulate tyrosine phosphorylation of the 51C/SHIP2 protein. *J. Biol. Chem.* 18: 605-609.
- Hanahan, D. (1985)** *Techniques for transformation of E. coli-DNA-cloning: A practical approach.* Glover, D. M. ed. IRL Press Limited (Oxford, England) 1: 56-110.
- Harmer, S. L.; DeFranco, A. L. (1999)** The Src homology domain 2-containing inositol phosphatase SHIP forms a ternary complex with Shc and Grb2 in antigen receptor-stimulated B lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 274: 12183-12191.
- Hashimoto, A.; Hirose, K.; Okada, H.; Kurosaki, T.; Iino, M. (1999b)** Inhibitory modulation of B cell receptor-mediated Ca²⁺ mobilization by Src homology 2 domain-containing inositol 5'-phosphatase (SHIP). *J. Biol. Chem.* 274: 11203-11208.
- Hashimoto, S.; Iwamatsu, A.; Ishiai, M.; Okawa, K.; Yamadori, T.; Matsushita, M.; Baba, Y.; Kishimoto, T.; Kurosaki, T.; Tsukada, S. (1999a)** 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: 24357-2364.
- Hata, A.; Sabe, H.; Kurosaki, T.; Takata, M.; Hanafusa, H. (1994)** Functional analysis of Csk in signal transduction through the B-cell antigen receptor. *Mol. Cell. Biol.* 14: 7306-7313.
- Hecht, D.; Zick, Y. (1992)** Selective inhibition of protein tyrosine phosphatase activities by H₂O₂ and vanadate in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188: 773-779.
- Hejna, J. A.; Saito, H.; Merkens, L. S.; Tittle, T. V.; Jakobs, P. M.; Whitney, M. A.; Grompe, M.; Friedberg, A. S.; Moses, R. E. (1995)** Cloning and characterization of a human cDNA (INPPL1) sharing homology with inositol polyphosphate phosphatases. *Genomics* 29: 285-287.
- Helgason, C. D.; Damen, J. E.; Rosten, P.; Grewal, R.; Sorensen, P.; Chappel, S. M.; Borowski, A.; Jirik, F.; Krystal, G.; Humphries, R. K. (1998)** Targeted disruption of SHIP leads to hematopoietic perturbations, lung pathology and a shortened life span. *Genes & Dev.* 12: 1610-1620.
- Helgason, C. D.; Kalberer, C. P.; Damen, J. E.; Chappel, S. M.; Pineault, N.; Krystal, G.; Humphries, R. K. (2000)** A dual role for Src homology 2 domain-containing Inositol-5-phosphatase (SHIP) in immunity: aberrant development and enhanced function of B lymphocytes in SHIP^{-/-} Mice. *J. Exp. Med.* 191: 781-794.

- Hermanson, G. G.; Eisenberg, D.; Kincade, P. W.; Wall, R. (1988) B29: A member of the immunoglobulin gene superfamily exclusively expressed in B-lineage cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 6890-6894.
- Hibbs, M. L.; Tarlinton, D. M.; Armes, J.; Grail, D.; Hodgson, G.; Maglitto, R.; Stacker, S. A.; Dunn, A. R. (1995) Multiple defects in the immune system of the *Lyn*-deficient mice, culminating in autoimmune disease. *Cell* 83: 301-311.
- Hof, P.; Pluskey, S.; Dhe-Paganon, S.; Eck, M. J.; Shoelson, S. E. (1998) Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2. *Cell* 92: 441-450.
- Holgado-Madruga, M.; Emllet, D. R.; Moscatello, D. K.; Godwin, A. K.; Wong, A. J. (1996) A *Grb2*-associated docking protein in EGF and insulin-receptor signaling. *Nature* 379: 560-564.
- Horn, S.; Meyer, J.; Heukeshoven, J.; Fehse, B.; Schulze, C.; Li, S.; Frey, J.; Poll, S.; Stocking, C.; Jücker, M. (2001) The inositol 5-phosphatase SHIP is expressed as 145 and 135 kDa proteins in blood and bone marrow cells in vivo, whereas carboxyl-truncated forms of SHIP are generated by proteolytic cleavage in vitro. *Leukemia* 15: 112-120.
- Huber, M.; Helgason, C. D.; Damen, J. E.; Liu, L.; Humphries, R. K.; Krystal, G. (1998a) The *Src*-homology 2-containing inositol phosphatase (SHIP) is the gatekeeper of mast cell degranulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 11330-11335.
- Huber, M.; Helgason, C. D.; Scheid, M. P.; Duronio, V.; Humphries, R. K.; Krystal, G. (1998b) Targeted disruption of SHIP leads to steel factor induced degranulation of mast cells. *EMBO J.* 17: 7311-7319.
- Huber, M.; Hughes, M. R.; Krystal, G. (2000) Thapsigargin-induced degranulation of mast cells is dependent on transient activation of Phosphatidylinositol-3 Kinase. *J. Immunol.* 165: 124-133.
- Hunter, M. G.; Avalos, B. R. (1998) Phosphatidylinositol 3-Kinase and SH2-containing inositol phosphatase (SHIP) are recruited by distinct positive and negative growth regulatory domains in the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *J. Immunol.* 160: 4979-4987.
- Hutchcroft, J. E.; Harrison, M. L.; Geahlen, R. L. (1992) Association of the 72-kDa protein-tyrosine kinase PTK72 with the B cell antigen receptor. *J. Biol. Chem.* 267: 8613-8619.
- Huyer, G.; Alexander, D. R. (1999) Immunosignaling: SHP-2 docks at multiple ports. *Curr. Biol.* 9: R129-R132.
- Imboden, J. B.; Koretsky, G. A. (1995) Switching off signals. *Curr. Biol.* 5: 727-729.
- Ingham, R. J.; Okada, H.; Dang-Lowson, M.; Dinglasan, J.; van der Geer, P.; Kurosaki, T.; Gold, M. R. (1999) Tyrosine phosphorylation of *Shc* in response to B cell antigen receptor engagement depends on the SHIP inositol phosphatase. *J. Immunol.* 163: 5891-5895.
- Ishiai, M.; Kurosaki, M.; Pappu, R.; Okawa, K.; Ronko, I.; Fu, C.; Shibata, M.; Iwamatsu, A.; Chan, A. C.; Kurosaki, T. (1999) BLNK required for coupling *Syk* to *PLC- γ 2* and *Rac1*-*JNK* in B cells. *Immunity* 10: 117-125.
- Jacob, A.; Cooney, D.; Tridandapani, S.; Kelley, T.; Coggeshall, K. M. (1999) *Fc γ R1b* modulation of surface immunoglobulin-induced Akt activation in murine B cells. *J. Biol. Chem.* 274: 13704-13710.
- Jones, B.; Tite, J. P.; Janeway, C. A. (1986) Different phenotypic variants of the mouse B cell tumor A20/2J are selected by antigen- and mitogen-triggered

- cytotoxicity of L3T4-positive, I-A-restricted T cell clones. J. Immunol.* 136: 348-356.
- Justment, L. B.; Brown, V. K.; Lin, J. (1994)** Regulation of B cell activation by CD45: a question of mechanism. *Immunol. Today* 15: 399-406.
- Kalbrener, F.; Wittig, B.; Schultz, G. (1998)** Inhibition of G proteins by antisense drugs. *Antisense Research*: 341-369.
- Kavanaugh, W. M.; Pot, D. A.; Chin, S. M.; Deuter-Reinhard, M.; Jefferson, A. B.; Norris, F. A.; Masiarz, F. R.; Cousens, L. S.; Majerus, P. W.; Williams, L. T. (1996)** Multiple forms of an inositol polyphosphate 5-phosphatase from signaling complexes with Shc and Grb2. *Curr. Biol.* 6(4): 438-445.
- Kavanaugh, W. M.; Williams, L. T. (1994)** An alternative to SH2 domains for binding tyrosine-phosphorylated proteins. *Science* 266: 1862-1865.
- Keegan, A. D.; Paul, W. E. (1992)** Multichain immune recognition receptors: similarities in structure and signaling pathways. *Immunol. Today* 13: 63-68.
- Kiener, P. A.; Liubin, M. N.; Rohrschneider, L. R.; Ledbetter, J. A.; Nadler, S. G.; Diegel, M. L. (1997)** Co-ligation of the antigen and Fc receptors give rise to the selective modulation of intracellular signaling in B cells: regulation of the association of phosphatidylinositol 3-kinase and 5-phosphatase with the antigen receptor complex. *J. Biol. Chem.* 272: 3838-3844.
- Kim, K. M.; Alber, G.; Weiser, P.; Reth, M. (1993)** Differential signaling through the Ig α and Ig β components of the B cell antigen receptor. *Eur. J. Immunol.* 23: 911-916.
- Kishihara, K.; Penninger, J.; Wallace, V. A.; Kündig, T. M.; Kawai, K.; Wakeham, A.; Timms, E.; Pfeffer, K.; Ohashi, P. S.; Thomas, M. L.; Furlonger, C.; Paige, C. J. (1993)** Normal B lymphocyte development but impaired T cell maturation in CD45-Exon6 Protein tyrosine phosphatase-deficient mice. *Cell* 74: 143-156.
- Klingmüller, U.; Lorenz, U.; Cantley, C.; Neel, B. G.; Lodish, H. F. (1995)** Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferation signals. *Cell* 80: 729-738.
- Klippel, A.; Kavanaugh, W. M.; Pot, D.; Williams, L. T. (1997)** A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain. *Mol. Cell. Biol.* 17: 338-344.
- Koncz, G.; Pecht, I.; Gergely, J.; Sarmay, G. (1999)** Fc γ receptor-mediated inhibition of human B cell activation: the role of SHP-2 phosphatase. *Eur. J. Immunol.* 29: 1980-1989.
- Krystal, G.; Damen, J. E.; Helgason, C. D.; Huber, M.; Hughes, M. R.; Kalesnikoff, J.; Lam, V.; Rosten, P.; Ware, M. D.; Yew, S.; Humphries, R. K. (1999)** SHIP's ahoy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31: 1007-1010.
- Kuroiwa, A.; Yamashita, Y.; Inui, M.; Yuasa, T.; Ono, M.; Nagabukuro, A.; Matsuda, Y.; Takai, T. (1998)** Association of tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2, inositol 5-phosphatase SHIP with gp49B1, and chromosomal assignment of the gene. *J. Biol. Chem.* 273: 1070-1074.
- Kurosaki, T.; Johnson, S. A.; Pao, L.; Sada, K.; Yamamura, H.; 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.; Maeda, A.; Ishiai, M.; Hashimoto, A.; Inabe, K.; Takata, M. (2000b)** Regulation of the phospholipase C-gamma 2 pathway in B cells. *Immunol. Rev.* 176: 19-29.

- Kurosaki, T.; Takata, M.; Yamanashi, Y.; Inazu, T.; Taniguchi, T.; Yamamoto, T.; 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.; Tsukada, S. (2000a) *BLNK: connecting Syk and Btk to calcium signals. Immunity* 12: 1-5.
- Laemmli, U. K. (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature* 227: 80-685.
- Lamkin, T. D.; Walk, S. F.; Liu, L.; Damen, J. E.; Krystal, G.; Ravichandran, K. S. (1997) *Shc interaction with Src homology 2 domain containing inositol 5-phosphatase (SHIP) in vivo requires the Shc-phosphotyrosine binding domain and two specific phosphotyrosines on SHIP. J. Biol. Chem.* 272: 10396-10401.
- Lankester, A. C.; van Schijndel, G. M. W.; von Lier, R. A. W. (1995) *Hematopoietic cell phosphatase is recruited to CD22 following B cell antigen receptor ligation. J. Biol. Chem.* 270: 20305-20308.
- Law, C. L.; Chandran, K. A.; Sidorenko, S. P.; Clark, E. A. (1996a) *Phospholipase C- γ 1 interacts with conserved phosphotyrosyl residues in the linker region of Syk and is a substrate for Syk. Mol. Cell. Biol.* 16: 1305-1315.
- Law, C. L.; Sidorenko, S. P.; Chandran, K. A.; Zhao, C. H.; Shen, S. H.; Fischer, E. H.; Clark, E. A. (1996b) *CD22 associates with protein tyrosine phosphatase 1C, Syk and phospholipase C-gamma 1 upon B cell activation. J. Exp. Med.* 183: 547-560.
- Law, D. A.; Chan, V. W. F.; Datta, S. K.; DeFranco, A. L. (1993) *B-cell antigen receptor motifs have redundant signaling capabilities and bind the tyrosine kinases PTK72, Lyn and Fyn. Curr. Biol.* 3: 645-657.
- Lecoq-Lafon, C.; Verdier, F.; Fichelson, S.; Chretien, S.; Gisselbrecht, S.; Lacombe, C.; Mayeux, P. (1999) *Erythropoietin induces the tyrosine phosphorylation of Gab1 and its association with Shc, SHP-2, SHIP and phosphatidylinositol 3-kinase. Blood* 93: 2578-2585.
- Lemay, S.; Davidson, D.; Latour, S.; Veillette, A. (2000) *Dok-3, a novel adapter molecule involved in the negative regulation of immunoreceptor signaling. Mol. Cell. Biol.* 20: 2743-2754.
- Leprince, C.; Draves, K. E.; Geahlen, R. L.; Ledbetter, J. A.; Clark, E. A. (1993) *CD22 associates with the human surface IgM-B-cell antigen receptor complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3236-3240.
- Lewis, T. S.; Shapiro, P. S.; Ahn, N. G. (1998) *Signal transduction through MAPK cascades. Adv. Cancer Res.* 74: 49-139.
- Li, H. -L.; Davis, W. W.; Whiteman, E. L.; Birnbaum, M. J.; Pure, E. (1999) *The tyrosine kinases Syk and Lyn exert opposing effects on the activation of protein kinase Akt/PKB in B lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 6890-6895.
- Lin, J.; Justment, L. B. (1992) *The MB-1/B29 heterodimer couples the B cell antigen receptor to multiple src family protein tyrosine kinases. J. Immunol.* 149: 1548-1555.
- Lioubin, M. N.; Algate, P. A.; Tsai, S.; Carlberg, K.; Aebersold, A.; Rohrschneider, L. R. (1996) *p150Ship, a signal transduction molecule with inositol polyphosphate-5-phosphatase activity. Genes & Dev.* 10(9): 1084-1095.
- Lioubin, M. N.; Myles, G. M.; Carlberg, K.; Bowtell, D.; Rohrschneider, L. R. (1994) *Shc, Grb2, Sos1 and a 150-kDa tyrosine-phosphorylated protein form complexes with Fms in hematopoietic cells. Mol. Cell. Biol.* 14: 5682-5691.

- Liu, L.; Damane, J. E.; Hughes, M. R.; Babic, I.; Jirik, F. R.; Krystal, G. (1997b) *The Src homology 2 (SH2) domain of SH2-containing inositol 5-phosphatase (SHIP) is essential for tyrosine phosphorylation of SHIP, its association with Shc, and its induction of apoptosis. J. Biol. Chem.* 272: 8983-8988.
- Liu, L.; Damen, J. E.; Cutler, R. L.; Krystal, G. (1994) *Multiple cytokines stimulate the binding of a common 145-kDa protein to Shc at the Grb2 recognition site of Shc. Mol. Cell. Biol.* 14: 6926-6935.
- Liu, L.; Damen, J. E.; Ware, M. D.; Krystal, G. (1997c) *Interleukin-3 induces the association of the inositol 5-phosphatase SHIP with SHP-2. J. Biol. Chem.* 272: 10998-11001.
- Liu, Q.; Dumont, D. J. (1997a) *Molecular cloning and chromosomal localization in human and mouse of the SH2-containing inositol phosphatase, INPP5D (SHIP). Genomics* 39: 109-112.
- Liu, Q.; Shalaby, F.; Jones, J.; Bouchard, D.; Dumont, D. J. (1998a) *The SH2-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase, SHIP, is expressed during hematopoiesis and spermatogenesis. Blood* 91: 2753-2759.
- Liu, Q.; Oliveira-Dos-Santos, A. J.; Mariathasan, S.; Bouchard, D.; Jones, J.; Sarao, R.; Kozieradzki, I.; Ohashi, P. S.; Penninger, J. M.; Dumont, D. J. (1998b) *The inositol polyphosphate 5-phosphatase SHIP is a crucial negative regulator of B cell antigen receptor signaling. J. Exp. Med.* 188: 1333-1342.
- Liu, Q.; Sasaki, T.; Kozieradzki, I.; Wakeham, A.; Itie, A.; Dumont, D. J.; Penninger, J. M. (1999) *SHIP is a negative regulator of growth factor receptor-mediated PKB/Akt activation and myeloid cell survival. Genes & Dev.* 13: 786-791.
- Lowry, O. H.; Rosebough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. (1951) *Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lucas, D. M.; Rohrschneider, L. R. (1999) *A novel spliced form of SH2-containing inositol phosphatase SHIP is expressed during myeloid development. Blood* 93: 1922-1933.
- Lückhoff, A.; Clapham, D. E. (1992) *Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates an endothelial Ca²⁺ permeable channel. Nature* 355: 356.
- Luisiri, P.; Lee, Y. J.; Eisfelder, B. J.; Clark, M. R. (1996) *Cooperativity and segregation of function within the Igα/β heterodimer of the B cell antigen receptor complex. J. Biol. Chem.* 271: 5158-5163.
- Maeda, A.; Kurosaki, M.; Ono, M.; Takai, T.; Kurosaki, T. (1998) *Requirement of SH2-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1 and SHP-2 for paired immunoglobulin-like receptor B (PIR-B)-mediated inhibitory signal. J. Exp. Med.* 187: 1355-1360.
- Maeda, A.; Scharenberg, A. M.; Tsukada, S.; Bolen, J. B.; Kinet, J. P.; Kurosaki, T. (1999) *Paired immunoglobulin-like receptor B (PIR-B) inhibits BCR-induced activation of Syk and Btk by SHP-1. Oncogene* 18: 2291-2297.
- Mahajan, S.; Fargnoli, J.; Burkhardt, A. L.; Kut, S. A.; Saouaf, S. J.; Bolen, J. B. (1995) *Src-family protein tyrosine kinases induce autoactivation of Bruton's tyrosine kinase. Mol. Cell. Biol.* 15: 5304-5311.
- Maresco, D. L.; Osburne, J. M.; Cooney, D.; Coggeshall, K. M.; Anderson, C. L. (1999) *The SH2-containing 5-inositol phosphatase (SHIP) is tyrosine phosphorylated after Fc gamma receptor clustering in monocytes. J. Immunol.* 162: 6458-6455.

- Martin, F.; Bachmann, (1999)** *The Guanine Nucleotide Exchange Factor Vav J. Immunol.* 163: 137-142.
- Mason, M. J.; Mahaat-Smith, M. P.; Grinstein, S. (1991)** *The role of intracellular Ca²⁺ in the regulation of the plasma membrane Ca²⁺ permeability of unstimulated rat lymphocytes. J. Biol. Chem.* 266: 10872-10879.
- Matsuguchi, T.; Salgia, R.; Hallek, M.; Eder, M.; Druker, B.; Ernst, T. J.; Griffin, J. D. (1994)** *Shc Phosphorylation in myeloid cells is regulated by granulocyte macrophage colony-stimulating factor, Interleukin-3, and steel factor is constitutively increased by p210^{BCR/ABL}. J. Biol. Chem.* 269: 5016-5021.
- Miettinen, H. M.; Rose, J. K.; Mellman, I. (1989)** *Fc receptor isoforms exhibit distinct abilities for coated pit localization as a result of cytoplasmic domain heterogeneity. Cell* 58: 317-327.
- Minegishi, Y.; Rohrer, J.; Coustan-Smith, E.; Lederman, H.; Pappu, R.; Campana, D.; Chan, A. C.; Conley, M. E. (1999)** *An essential role for BLNK in human B cell development. Science* 286: 1954-1957.
- Minskoff, S. A.; Matter, K.; Mellman, I. (1998)** *FcγRIIB1 regulates the representation of B cell receptor-bound antigens. J. Immunol.* 161: 2079-2083.
- Montell, C.; Rubin, G. M. (1989)** *Molecular characterization of the Drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. Neuron* 2: 1313-1323.
- Mullis, K. B.; Faloona, F. (1987)** *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol.* 155:335.
- Muraille, E.; Bruhns, P.; Pesesse, X.; Daeron, M.; Erneux, C. (2000)** *The SH2 domain containing inositol 5-phosphatase SHIP2 associates to the immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif of FcγRIIb in B cells under negative signaling. Immunol. Lett.* 72: 7-15.
- Mustelin, T.; Burn, P. (1993)** *Regulation of Src family tyrosine kinases in lymphocytes. TIBS* 18: 215-220.
- Muta, T.; Kurosaki, T.; Misulovin, Z.; Sancez, M.; Nussenzweig, M. C.; Ravetch, J. V. (1994)** *A 13-amino-acid motif in the cytoplasmic domain of FcγRIIB modulates B-cell receptor signaling. Nature* 368: 70-73.
- Nadler, M. J. S.; Chen, B.; Anderson, J. S.; Wortis, H. H.; Neel, B. G. (1997)** *Protein-tyrosine phosphatase SHP-1 is dispensable for FcγRIIb-mediated inhibition of B cell antigen receptor activation. J. Biol. Chem.* 272: 20038-20043.
- Nagai, K.; Takata, M.; Yamamura, H.; Kurosaki, T. (1995)** *Tyrosine phosphorylation of Shc is mediated through Lyn and Syk in B cell receptor signaling. J. Biol. Chem.* 270: 6824-6829.
- Nakamura, K.; Brauweiler, A.; Cambier, J. C. (2000)** *Effects of Src homology domain 2 (SH2) containing inositol phosphatase (SHIP), SH2-containing phosphatase (SHP)-1 and SHP-2 SH2 decoy proteins on FcγRIIb1-effector interactions and inhibitory functions. J. Immunol.* 164: 631-638.
- Nakamura, K.; Cambier, J. C. (1998)** *B cell antigen receptor (BCR)-mediated formation of SHP-2-pp120 complex and its inhibition by FcγRIIb1-BCR coligation. J. Immunol.* 161: 684-691.
- Neuberger, M. S.; Patel, K. J.; Dariavach, P.; Nelms, K.; Peaker, C. J.; 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.

- Nishida, K.; Yoshida, Y.; Itoh, M.; Fukada, T.; Ohtani, T.; Shirogane, T.; Atsumi, T.; Takahashi-Tezuka, M.; Ishihara, K.; Hibi, M.; Hirano, T. (1999)** *Gab-family adapter proteins act downstreams of cytokine and growth factor receptors and T- and B-cell antigen receptors. Blood* 93: 1809-1816.
- Nishigaki, K.; Hanson, C.; Ohashi, T.; Thompson, D.; Muszynski, K.; Ruscetti, S. (2000)** *Erythroid cells rendered erythropoietin independent by infection with Friend spleen focus-forming virus show constitutive activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt kinase: involvement of insulin receptor substrate-related adapter proteins. J. Virol.* 74: 3037-3045.
- Nishizumi, H.; Horikawa, K.; Mlinaric-Rascan, I.; Yamamoto, T. (1998)** *A double-edged kinase Lyn: a positive and negative regulator for antigen receptor-mediated signals. J. Exp. Med.* 187: 1343-1348.
- Nishizumi, H.; Taniuchi, I.; Yamanashi, Y.; Kitamura, D.; Ilic, D.; Mori, S.; Watanabe, T.; Yamamoto, T. (1995)** *Impaired proliferation of peripheral B cells and indication of autoimmune disease in Lyn-deficient mice. Immunity* 3: 549-560.
- O'Shea, J. J.; McVicar, D. W.; Bailey, T. L.; Burns, C.; Smith, M. J. (1992)** *Activation of human peripheral blood T lymphocytes by pharmacological induction of protein-tyrosine phosphorylation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10306-10310.
- Okada, H.; Bolland, S.; Hashimoto, A.; Kurosaki, M.; Kabuyama, Y.; Iino, M.; Ravetch, J. V.; Kurosaki, T. (1998)** *Role of the inositol phosphatase SHIP in B cell receptor-induced Ca²⁺ oscillatory response. J. Immunol.* 161: 5129-5132.
- Olcese, L.; Lang, P.; Vely, F.; Cambiaggi, A.; Marguet, D.; Blery, M.; Hippen, K. L.; Biassoni, R.; Moretta, A.; Moretta, L.; Cambier, J. C.; Vivier, E. (1996)** *Human and mouse killer-cell inhibitory receptors recruit PTP1C and PTP1D protein tyrosine phosphatases. J. Immunol.* 156: 4531-4534.
- Ono, M.; Bolland, S.; Tempst, P.; Revetch, J. V. (1996)** *Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor FcγRIIB. Nature* 283: 263-266.
- Ono, M.; Okada, H.; Bolland, S.; Yanagi, S.; Kurosaki, T.; Revetch, J. V. (1997)** *Deletion of SHIP or SHP-1 reveals two distinct pathways for inhibitory signaling. Cell* 90: 293-301.
- Osborne, M. A.; Zenner, G.; Lubinus, M.; Zhang, X.; Songyang, Z.; Cantley, L. C.; Majerus, P.; Burn, P.; Kochan, J. P. (1996)** *The inositol 5-phosphatase SHIP binds to immunoreceptor signaling motifs and responds to high affinity IgE receptor aggregation. J. Biol. Chem.* 271: 29271-29278.
- Panofen, F. (1996)** *Modulation der B-Zellaktivierung durch CD22. Diplomarbeit (Universität Bielefeld).*
- Papavasiliou, F.; Jankovic, M.; Suh, H.; Nussenzweig, M. C. (1995b)** *The cytoplasmic domains of immunoglobulin (Ig) α and Igβ can independently induce the precursor B cell transition and allelic exclusion. J. Exp. Med.* 182: 1389-1394.
- Papavasiliou, F.; Misulovin, Z.; Suh, H.; Nussenzweig, M. C. (1995a)** *The role of Igβ in precursor B cell transition and allelic exclusion. Science* 268: 408-411.
- Pappu, R.; Cheng, A. M.; Li, B.; Gong, Q.; Chiu, C.; Griffin, N.; White, M.; Sleckman, B. P.; Chan, A. C. (1999)** *Requirement for B cell linker protein (BLNK) in B cell development. Science* 286: 1949-1954.

- Patel, K. J.; Neuberger, M. S. (1993) *Antigen presentation by the B cell antigen receptor is driven by the α/β sheath and occurs independently of its cytoplasmic tyrosines.* *Cell* 74: 939-946.
- Patterson, R. L.; von Rossum, D. B.; Gill, D. L. (1999) *Store-operated Ca^{2+} entry: evidence for secretion-like coupling model.* *Cell* 98: 487-499.
- Pawson, T. (1995) *Protein modules and signaling networks.* *Nature* 373: 573-580.
- Peaker, C. J. G.; Neuberger, M. S. (1993) *Association of CD22 with the B cell antigen receptor.* *Eur. J. Immunol.* 23: 1358-1363.
- Pearse, R. N.; Kawabe, T.; Bolland, S.; Guinaamard, R.; Kurosaki, T.; Ravetch, J. V. (1999) *SHIP recruitment attenuates $Fc\gamma RII B$ -induced B cell apoptosis.* *Immunity* 10: 753-760.
- Pei, D.; Wang, J.; Walsh, C. T. (1996) *Differential functions of the two Src homology 2 domains in protein tyrosine phosphatase SH-PTP1.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 1141-1145.
- Pesesse, X.; Deleu, S.; De Smedt, F.; Drayer, L.; Erneux, C. (1997) *Identification of a second SH2-domain-containing protein closely related to the phosphatidylinositol polyphosphate 5-phosphatase SHIP.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239: 697-700.
- Pesesse, X.; Moreau, C.; Drayer, A. L.; Woscholski, R.; Parker, P.; Erneux, C. (1998) *The SH2 domain containing inositol 5-phosphatase SHIP2 displays phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate and inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate 5-phosphatase activity.* *FEBS Lett.* 437: 301-303.
- Petersen, C. C. H.; Berridge, M. J.; Borgese, M. F.; Bennet, D. L. (1995) *Putative capacitative calcium entry channels: expression of *Drosophila trp* and evidence for the existence of vertebrate homologues.* *Biochem. J.* 311: 41-44.
- Petrie, R. J.; Schnetkamp, P. P.; Patel, K. D.; Awasthi-Kalia, M.; Deans, J. P. (2000) *Transient translocation of the B cell receptor and Src homology 2 domain-containing inositol phosphatase to lipid rafts: evidence towards a role in calcium regulation.* *J. Immunol.* 165: 1220-1227.
- Phillips, N. E.; Parker, D. C. (1983) *Fc -dependent inhibition of mouse B cell activation by whole anti- μ -antibodies.* *J. Immunol.* 130: 602-606.
- Phillips, N. E.; Parker, D. C. (1984) *Cross-linking of B-lymphocyte $Fc\gamma$ receptors and membrane immunoglobulin inhibits anti-immunoglobulin-induced blastogenesis.* *J. Immunol.* 132: 627-632.
- Phillips, N. E.; Parker, D. C. (1987) *$Fc\gamma$ receptor effects on induction of c-myc mRNA expression in mouse B lymphocytes by anti-immunoglobulin.* *Mol. Immunol.* 24: 1199-1205.
- Pleiman, C. M.; Abrams, C.; Gauen, L. T.; Bedzyk, W.; Jongstra, J.; Shaw, A. S.; Cambier, J. C. (1994b) *Distinct p53/56Lyn and p59Fyn domains associate with nonphosphorylated and phosphorylated $Ig\alpha$.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 4268-4272.
- Pleiman, C. M.; D'Ambrosio, D.; Cambier, J. C. (1994a) *The B-cell antigen receptor complex: structure and signal transduction.* *Immunol. Today* 15(9): 393-399.
- Pradhan, M.; Coggeshall, K. M. (1997) *Activation-induced bi-dentate interaction of SHIP and Shc in B lymphocytes.* *J. Cell. Biochem.* 67: 32-42.
- Pulford, K.; Ralfkiaer, E.; MacDonald, S. M.; Erber, W. N.; Falini, B.; Gatter, K. C.; Mason, D. Y. (1986) *A new monoclonal antibody (KB61) recognizing a*

- novel antigen which is selectively expressed in subpopulations of human B lymphocytes. Immunol. 57: 71-76.*
- Putney, J. W. (1990)** *Capacitative calcium entry revisited. Cell Calcium 11: 611-624.*
- Rajewsky, K. (1996)** *Clonal selection and learning in the antibody system. Nature 381: 751-758.*
- Rameh, L. E.; Arvidsson, A. K.; Carraway III, K. L.; Couvillon, A. D.; Rathbun, G.; Crompton, A.; VanRenterghem, B.; Czech, M. P.; Ravichandran, K. S.; Bukakoff, S. J. (1997)** *A comparative analysis of the phosphoinositide binding specificity of pleckstrin homology domains. J. Biol. Chem. 272: 22059-22066.*
- Rameh, L. E.; Chen, C. -S.; Cantley, L. C. (1995)** *Phosphatidylinositol (3,4,5) P₃ interacts with SH2 domains and modulates PI3-kinase association with tyrosine-phosphorylated proteins. Cell 83: 821-830.*
- Ravetch, J. V.; Luster, A. D.; Weinshank, R.; Kochan, J.; Pavlovec, A.; Portnoy, D. A.; Hulmes, J.; Pan, Y. -C. E. Unkeless, J. C. (1986)** *Structural heterogeneity and functional domains of murine Immunoglobulin G Fc receptors. Science 234: 718-725.*
- Rawlings, D. J.; Scharenberg, A. M.; Park, H.; Wahl, M. I.; Lin, S.; Kato, R. M.; Fluckinger, A. -C.; Witte, O. N. (1996)** *Activation of Btk by phosphorylation mechanism initiated by Src family kinases. Science 271: 822-825.*
- Rawlings, D. J.; Witte, O. N. (1995)** *The Btk subfamily of cytoplasmic tyrosine kinases: structure, regulation and function. Semin. Immunol. 7: 237-246.*
- Reth, M. (1989)** *Antigen receptor tail clue. Nature 338: 383.*
- Reth, M. (1992)** *Antigen receptors on B lymphocytes. Annu. Rev. Immunol. 10: 97-121.*
- Reth, M. (1995)** *The B-cell antigen receptor complex and co-receptors. Immuno. Today 16 (7): 310-313.*
- Reth, M.; Wienands, J. (1997)** *Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor. Annu. Rev. Immunol. 15: 453-479.*
- Rijkers, G. T.; Justement, L. B.; Griffioen, A. W.; Cambier, J. C. (1990)** *Improved method for measuring intracellular Ca²⁺ with fluo-3. Cytometry 11: 923-927.*
- Rohrschneider, L. R.; Fuller, J. F.; Wolf, I.; Liu, Y.; Lucas, D. M. (2000)** *Structure, function, and biology of SHIP proteins. Genes & Dev. 14: 505-520.*
- Rowley, R. B.; Burkhardt, A. L.; Chao, H. G.; Matsueda, G. R.; Bolen, J. B. (1995)** *Syk protein-tyrosine kinase is regulated by tyrosine-phosphorylated Ig α /Ig β immunoreceptor tyrosine activation motif binding and autophosphorylation. J. Biol. Chem. 270(11): 590-594.*
- Rozakis-Adcock, M.; McGlade, J.; Mbamula, G.; Pelicci, G.; Daly, R.; Li, W.; Batzer, A.; Thomas, S.; Brugge, J.; Pelicci, P. G. (1992)** *Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. Nature 360: 689-692.*
- Ruzzene, M.; Brunati, A. M.; Marin, O.; Donella-Deana, A.; Pinna, L. A. (1996)** *SH2 domains mediate the sequential phosphorylation of HS1 protein by p72Syk and Src-related protein tyrosine kinases. Biochem. 35: 5327-5332.*
- Sakaguchi, N.; Kashiwamura, S.; Kimoto, M.; Thalmann, P.; Melchers, F. (1988)** *B lymphocyte lineage-restricted expression of mb-1, a gene with CD3-like structural properties. EMBO J. 7(11): 3457-3464.*
- Salim, K.; Bottomley, M. J.; Querfurth, E.; Zvelebil, M. J.; Gout, I.; Scaife, R.; Margolis, R. L.; Gigg, R.; Smith, C. I. E.; Driscoll, P. C. (1996)** *Distinct*

- specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. EMBO J. 15: 6241-6250.*
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. eds. (1989)** *Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, New York).*
- Sanchez, M.; Misulovin, Z.; Burkhardt, A. L.; Mahajan S.; Costa, T.; Franke, R.; Bolen, J. B.; Nussenzweig, M. (1993)** *Signal transduction by immunoglobulin is mediated through Ig α und Ig β . J. Exp. Med. 178: 1049-1055.*
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977)** *DNA-Sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467.*
- Saouaf, S. J.; Mahajan, S.; Rowley, R. B.; Kut, S. A.; Fargnoli, J.; Burkhardt, A. L.; Tsukada, S.; Witte, O. N.; Bolen, J. B. (1994)** *Temporal differences in the activation of three classes of non-transmembrane protein tyrosine kinases following B-cell antigen receptor surface engagement. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 9524-9528.*
- Sarkar, S.; Schlottmann, K.; Cooney, D.; Coggeshall, K. M. (1996)** *Negative signaling via Fc γ R11b1 in B cells blocks phospholipase C γ -2 tyrosine phosphorylation but not Syk and Lyn activation. J. Biol. Chem. 251: 20182-20186.*
- Sarmay, G.; Koncz, G.; Pecht, I.; Gergely, J. (1999)** *Cooperation between SHP-2, phosphatidyl inositol 3-kinase and phosphoinositol 5-phosphatase in the Fc γ R11b mediated B cell regulation. Immunol. Lett. 68: 25-34.*
- Sato, K.; Ochi, A. (1998)** *Superclustering of B cell receptor and Fc γ R11b1 activates Src homology 2-containing protein tyrosine phosphatase-1. J. Immunol. 161: 2716-2722.*
- Sattler, M.; Salgia, R.; Shrikhande, G.; Verma, S.; Choi, J. -L.; Rohrschneider, L. R.; Griffin, J. D. (1997)** *The phosphatidyl polyphosphate 5-phosphatase SHIP and the protein tyrosine phosphatase SHP-2 form a complex in hematopoietic cells which can be regulated by BCR/ABL and growth factors. Oncogene 15: 2379-2384.*
- Sattler, M.; Salgia, R.; Weisberg, E.; Shirkhande, G.; Verma, S.; Byrne, C.; Winkler, T.; Algate, P.; Rohrschneider, L. R.; Griffin, J. D. (1999)** *BCR/ABL directly inhibits expression of SHIP, the SH2-containing polyinositol-5-phosphatase involved in the regulation of hematopoiesis. Mol. Cell. Biol. 19: 7473-7480.*
- Saxton, T. M.; van Oostveen, I.; Bowtell, D.; Aebersold, R.; Gold, M. R. (1994)** *B cell antigen receptor cross-linking induces phosphorylation of the p21ras oncoprotein activators Shc and mSos1 as well as assembly of complexes containing Shc, Grb-2, mSos1 and a 145-kDa tyrosine-phosphorylated protein. J. Immunol. 153: 623-636.*
- Scharenberg, A. M.; El-Hillal, O.; Fruman, D. A.; Beitz, L. O.; Li, Z.; Lin, S.; Gout, I.; Cantley, L. C.; Rawlings, D. J.; Kinet, J. -P. (1998b)** *Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PtdIns-3,4,5-P₃)/Tec kinase-dependent calcium signaling pathway: a target for SHIP-mediated inhibitory signals. EMBO J. 17: 1961-1972.*
- Scharenberg, A. M.; Kinet, J. -P. (1998a)** *PtdIns-3,4,5-P₃: a regulatory nexus between tyrosine kinases and sustained calcium signals. Cell 94: 5-8.*
- Schieven, G. L.; Wahl, A. F.; Myrdal, S.; Grosmaire, L.; Ledbetter, J. A. (1995)** *Lineage-specific induction of B cell apoptosis and altered signal transduction by*

- the phosphotyrosine phosphatase inhibitor bis(maltolato)oxovanadium(IV)*. *J. Biol. Chem.* 270: 20824-20831.
- Schulz, L. D.; Schweizer, P. A.; Rajan, R. V.; Yi, T.; Ihle, J. N.; Matthews, R. J.; Thomas, M. L.; Beier, D. R. (1993)** Mutations of the murine *motheaten* locus are within the hematopoietic cell protein-tyrosine phosphatase (HCPH) gene. *Cell* 73: 1445-1454.
- Schulzeck, O. (1994)** Strukturelle Voraussetzungen des humanen Fc γ R11b1 für die Rezeptor-vermittelte Endozytose und die Regulation des Kalzium-Fluxes in B-Zellen. Diplomarbeit (Universität Bielefeld).
- Sefton, B. M.; Campbell, M. A. (1991)** The role of tyrosine protein phosphorylation in lymphocyte activation. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7: 257-274.
- Shifrin, V. I.; Davis, R. J.; Neel, B. G. (1997)** Phosphorylation of protein-tyrosine phosphatase PTP-1B on identical sites suggests activation of a common signaling pathway during mitosis and stress response in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 272: 2957-2962.
- Siegel, J.; Li, Y.; Whyte, P. (1999)** SHIP-mediated inhibition of K562 erythroid differentiation requires an intact catalytic domain and Shc binding site. *Oncogene* 18: 7135-7148.
- Sillman, A. L.; Monroe, J. G. (1995)** Association of p72Syk with the src homology-2 (SH2) domains of PLC γ 1 in B lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 270: 806-811.
- Sinclair, N. R. StC.; Panoskaltisis, A. (1987)** Immunoregulation by Fc signals. *Immunol. Today* 8: 76-79.
- Smit, L.; de Vries-Smits, M. M.; Bos, J. L.; Borst, J. (1994)** B cell antigen receptor stimulation induces formation of a Shc-Grb2 complex containing multiple tyrosine-phosphorylated proteins. *J. Biol. Chem.* 269: 209-212.
- Smith, D. B.; Johnson, K. S. (1988)** Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67: 31-40.
- Songyang, Z.; Shoelson, S. E.; Chaudhuri, M.; Gish, G.; Pawson, T.; Haser, W. G.; King, F.; Roberts, T.; Ratonofsky, S.; Lechleider, R. J. (1993)** SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 72: 767-778.
- Stone, R. L.; Dixon, J. E. (1994)** Protein tyrosine phosphatase. *J. Biol. Chem.* 269: 31323.
- Stüber, D.; Natile, H.; Garotta, G. (1990)** System for high-level production in *E. coli* and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies and structure-function analysis. *Immunol. Methods* Leftkovits, I.; Pernis, B. eds. Academic Press (New York) 4: 121-152.
- Studier, F. W.; Moffatt, B. A. (1986)** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189: 113-130.
- Studier, F. W.; Rosenberg, A. H.; Dunn, J. J.; Dubendorff, J. W. (1990)** Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185: 60-89.
- Su, Y. -W.; Zhang, Y.; Schweikert, G. A.; Koretzky, M.; Reth, M.; Wienands, J. (1999)** Interaction of SLP adapters with the SH2 domain of Tec family kinases. *Eur. J. Immunol.* 29: 3702-3711.
- Sudol, M. (1998)** From Src Homology domains to other signaling modules: proposal of the 'protein recognition code'. *Oncogene* 17: 1469-1474.

- Taddie, J. A.; Hurley, T. R.; Hardwick, B. S.; Sefton, B. M. (1994) *Activation of B- and T-cells by the cytoplasmic domains of the B-cell antigen receptor proteins Ig α and Ig β* . *J. Biol. Chem.* 269: 13529-13535.
- Takata, M.; Kurosaki, T. (1995) *The catalytic activity of Src-family tyrosine kinase is required for B cell antigen receptor signaling*. *FEBS Lett.* 374: 407-411.
- Takata, M.; Kurosaki, T. (1996) *A role for Bruton's tyrosine kinase in B cell antigen receptor-mediated activation of phospholipase C- γ 2*. *J. Exp. Med.* 184:31-40.
- Takata, M.; Sabe, H.; Hata, A.; Inazu, T.; Homma, Y.; Nukada, T.; Yamanura, H.; Kurosaki, T. (1994) *Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor coupled Ca²⁺ mobilization through distinct pathways*. *EMBO J.* 13:1341-1349.
- Tamir, I.; Stolpa, J. C.; Helgason, C. D.; Nakamura, K.; Bruhns, P.; Daeron, M.; Cambier, J. C. (2000) *The RasGAP-binding protein p62^{dok} is a mediator of inhibitory Fc γ R11b signals in B cells*. *Immunity* 12: 347-358.
- Tauchi, T.; Feng, G. S.; Marshall, M. S.; Shen, R.; Mantel, C.; Pawson, T.; Broxmeyer, H. E. (1994) *The ubiquitously expressed Syp phosphatase interacts with c-kit and Grb2 in hematopoietic cells*. *J. Biol. Chem.* 269: 25206-25211.
- Teh, Y-M.; Neuberger, M. S. (1997) *The Immunoglobulin (Ig) α and Ig β cytoplasmic domains are independently sufficient to signal B cell maturation and activation in transgenic mice*. *J. Exp. Med.* 185(10): 1753-1753.
- Thomas, J. E.; Soriano, P.; Brugge, J. S. (1991) *Phosphorylation of c-Src on tyrosine 527 by another protein tyrosine kinase*. *Science* 254: 568-571.
- Thomas, M. L. (1995) *Of ITAMs and ITIMs: turning on and off the B cell antigen receptor*. *J. Exp. Med.* 181: 1953-1956.
- Torres, R. M.; Flaswinkel, H.; Reth, M.; Rajewsky, K. (1996) *Aberrant B cell development and immune response in mice with a compromised BCR complex*. *Science* 272: 1804-1808.
- Tridandapani, S.; Chacko, G. W.; van Brocklyn, J. R.; Coggeshall, K. M. (1997a) *Negative signaling in B cells causes reduced Ras activity by reducing Shc-Grb2 interactions*. *J. Immunol.* 158: 1125-1132.
- Tridandapani, S.; Kelley, T.; Cooney, D.; Pradhan, M.; Coggeshall, K. M. (1997b) *Negative signaling in B cells: SHIP Grbs Shc*. *Immunol. Today* 18: 424-427.
- Tridandapani, S.; Phee, H.; Shivakumar, L.; Kelley, T. W.; Coggeshall, K. M. (1998) *Role of SHIP in Fc γ R11b-mediated inhibition of Ras activation in B cells*. *Mol. Immunol.* 35: 1135-1146.
- Tridandapani, S.; Pradhan, M.; LaDine, J. R.; Garber, S.; Anderson, C. L.; Coggeshall, K. M. (1999) *Protein interactions of Src homology 2 (SH2) domain-containing inositol 5-phosphatase (SHIP): Association with Shc displaces SHIP from Fc γ R11b in B cells*. *J. Immunol.* 162: 1408-1414.
- Tuscano, J. M.; Engel, P.; Tedder, T. F.; Agarwal, A.; Kehrl, J. H. (1996) *Involvement of p72Syk kinase, p53/56Lyn kinase and phosphatidylinositol-3 kinase in signal transduction via the human B lymphocyte antigen CD22*. *Eur. J. Immunol.* 26: 1246-1252.
- Tuveson, D. A.; Carter, R. H.; Soltoff, S. P.; Fearon, D. T. (1993) *CD19 of B cells as a surrogate kinase insert region to bind phosphatidylinositol 3-kinase*. *Science* 260: 986-989.
- Uher, F. M.; Lamers, M. C.; Dickler, H. B. (1985) *Antigen-antibody complexes bound to B-lymphocyte Fc γ receptors regulate B-lymphocyte differentiation*. *Cell. Immunol.* 95: 368-379.

- van de Winkel, J. G. J.; Capel, P. J. A. (1993) *Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. Immunol. Today* 14: 215-221.
- van den Heirk-Oudijk, I. E.; Westerdaal, N. A. C.; Henriquez, N. V.; Capel, P. J. A.; van de Winkel, J. G. J. (1994) *Functional analysis of human Fc γ RII (CD32) isoforms expressed in B lymphocytes. J. Immunol.* 152: 574-585.
- Vely, F.; Olivero, S.; Olcese, L.; Moretta, A.; Damen, J. E.; Liu, L.; Krystal, G. (1997) *Differential association of phosphatases with hematopoietic co-receptors bearing immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. Eur. J. Immunol.* 27: 1994-2000.
- Venkitaraman, A. R.; Williams, G. T.; Dariavach, P.; Neuberger, M. S. (1991) *The B cell antigen receptor of the five immunoglobulin classes. Nature* 352: 777-781.
- Villarejo, M. R.; Zabin, I. (1974) *β -Galactosidase from termination and deletion mutant strains. J. Bacteriol.* 120(1): 466-474.
- Vogel, W.; Lammers, R.; Huang, J.; Ullrich, A. (1993) *Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation. Science* 259: 1611-1614.
- Vogelstein, B.; Gillespie, D. (1979) *Preparative and analytical purification of DNA from Agarose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 615-619.
- Wang, J.; Koizumi, T.; Watanabe, T. (1996) *Altered antigen receptor signaling and impaired Fas-mediated apoptosis of B cells in Lyn-deficient mice. J. Exp. Med.* 184: 831-838.
- Ware, M.D.; Rosten, P.; Damen, J. E.; Liu, L.; Humphries, R. K.; Krystal, G. (1996) *Cloning and characterization of human SHIP, the 145-kDa inositol 5-phosphatase that associates with Shc following cytokine stimulation. Blood* 88(8): 2833-2840.
- Weinrich, V. (1992) *Herstellung monoklonaler und polyklonaler Antikörper gegen den in E. coli exprimierten Immunglobulin G Rezeptor FcRIIb2. Diplomarbeit (Universität Bielefeld).*
- Weinrich, V. (1997) *Funktion von Fc γ RII Isoformen in B-Zellen. Dissertation (Universität Bielefeld).*
- Weinrich, V.; Sondermann, P.; Bewarder, N.; Wissel, K.; Frey, J. (1996) *Epitope mapping of new monoclonal antibodies recognizing distinct human Fc γ RII (CD32) isoforms. Hybridoma* 15(2): 109-116.
- Weiser, P.; Riesterer, C.; Reth, M. (1994) *The internalization of the IgG2a antigen receptor does not the association with Ig α and Ig β but the activation of protein tyrosine kinases does. Euro. J. Immunol.* 24: 665-671.
- Weng, W. -K.; Jarvis, L.; LeBien, T. W. (1994) *Signaling through CD19 activates Vav/mitogen-activated protein kinase pathway and induces formation of a CD19/Vav/phosphatidylinositol 3-kinase complex in human B cell precursors. J. Biol. Chem.* 269: 5241-5248.
- White, E. (1996) *Life, death, and the pursuit of apoptosis. Genes & Dev.* 10: 1-15.
- Wienands, J.; Larbolette, O.; Reth, M. (1996) *Evidence for a preformed transducer complex organized by the B cell antigen receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7865-7870.
- Wienands, J.; Freuler, F.; Baumann, G. (1995) *Tyrosine-phosphorylated forms of Ig β , CD22, TCR ζ and HOSS are major ligands for tandem SH2 domains of Syk. Int. Immunol.* 7(11): 1701-1708.

- Wienands, J.; Schweikert, J.; Wollscheid, B.; Jumaa, H.; Nielsen, P. J.; 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.
- Williams, G. T.; Dariavach, P.; Venkitaraman, A. R.; Gilmore, D. J.; Neuberger, M. S. (1993) Membrane Immunoglobulin without sheath or anchor. *Mol. Immunol.* 30: 1427-1432.
- Williams, G. T.; Peaker, C. J. G.; Patel, K. J.; Neuberger, M. S. (1994) The α/β sheath and its cytoplasmic tyrosines are required for signaling by the B-cell antigen receptor but not for capping or for serine/threonine-kinase recruitment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 474-478.
- Williams, G. T.; Venkitaraman, A. R.; Gilmore, D. J.; Neuberger, M. S. (1990) The sequence of the μ transmembrane segment determines the tissue specificity of the transport of immunoglobulin M to the cell surface. *J. Exp. Med.* 171: 947-952.
- Wingfield, P. T.; Palmer, I.; Liang, S. -M. (1995) Folding and purification of insoluble (inclusion-body) proteins from *Escherichia coli* Current protocols in protein science. Coligan, J. E.; Dunn, B. M.; Ploegh, H. L.; Speicher, D. W.; Wingfield, P. T. eds. John Wiley and Sons (New York) 1: 6.5.1-6.5.27.
- Wisniewski, D.; Strife, A.; Swendeman, S.; Erdjument-Bromage, H.; Geromanos, S.; Kavanaugh, W. M.; Tempst, P.; Clarkson, B. (1999) A novel SH2-containing phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase (SHIP2) is constitutively tyrosine phosphorylated and associated with Src homologous and collagen gene (SHC) in chronic myelogenous leukemia progenitor cells. *Blood* 93: 2707-2720.
- Woschowski, R.; Parker, P. J. (1997) Inositol lipid 5-phosphatases – traffic signals and signal traffic. *TIBS* 22: 427-431.
- Xiao, S.; Rose, D. W.; Sasaoka, T.; Maegawa, H.; Burke, T. R.; Roller, P. P.; Shoelson, S. E.; Olefsky, J. M. (1994) Syp(SHPTP2) is a positive mediator of growth factor stimulated mitogenic signal transduction. *J. Biol. Chem.* 269: 21244-21248.
- Yamanashi, Y.; Okada, M.; Semba, T.; Yamori, T.; Umemori, H.; Tsunasawa, S.; Toyoshima, K.; Kitamura, D.; Watanabe, T.; Yamamoto, T. (1993) Identification of HS1 protein as a major substrate of protein-tyrosine kinase(s) upon B-cell antigen receptor-mediated signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3631-3635.
- Yamanashi, Y.; Fukui, Y.; Wongsasant, B.; Kinoshita, Y.; Ichimori, Y.; Toyoshima, K.; Yamamoto, T. (1992) Activation of Src-like protein-tyrosine kinase Lyn and its association with phosphatidylinositol 3-kinase upon B-cell antigen receptor-mediated signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1118-1122.
- Yamanashi, Y.; Tamura, T.; Kanamori, T.; Yamane, H.; Nariuchi, H.; Yamamoto, T.; 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.
- Yamashita, Y.; Ono, M.; Takai, T. (1998) Inhibitory and stimulatory functions of paired Ig-like receptor (PIR) family in RBL-2H3 cells. *J. Immunol.* 161: 4042-4047.

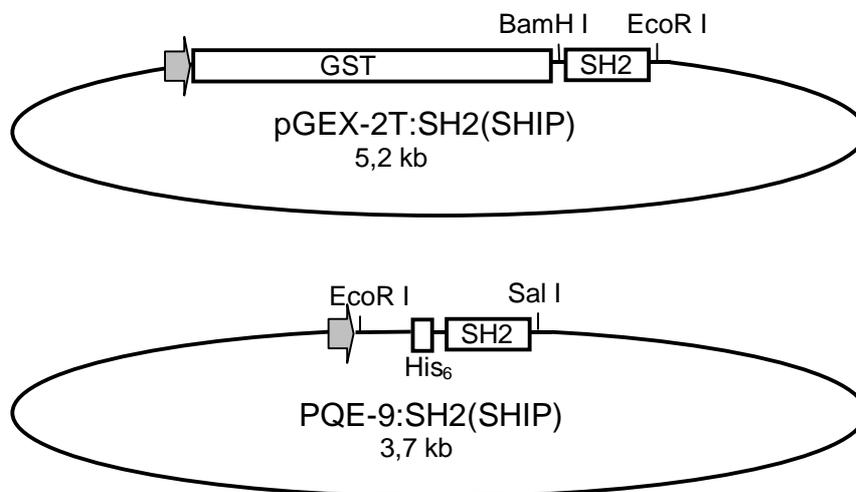
- Yamauchi, K.; Milarski, K. L.; Saltiel, A. R.; Pessin, J. E. (1995)** *Protein tyrosine phosphatase SHPTP2 is a required positive effector for insulin downstream signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 664-668.
- Yang, E.; Zha, J.; Jockel, J.; Boise, L. H.; Thompson, C. B.; Korsmeyer, S. J. (1995)** *Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. Cell* 80: 285-291.
- Yanish-Perron, C.; Vieira, J.; Messing, J. (1985)** *Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene* 33: 103-119.
- Yi, T.; Mui, A. L. -F.; Krystal, G.; Ihle, J. N. (1993)** *Hematopoietic cell phosphatase associates with the interleukin-3 (IL-3) receptor β chain and down regulates IL-3 induced tyrosine phosphorylation and mitogenesis. Mol. Cell. Biol.* 13: 7577-7586.
- Zhang, Y.; Wienands, J.; Zurn, C.; Reth, M. (1998)** *Induction of the antigen receptor expression on B lymphocytes results in rapid competence for signaling of SLP-65 and Syk. EMBO J.* 17: 7304-7310.

8. ANHANG

8.1 Klonierungsschemata

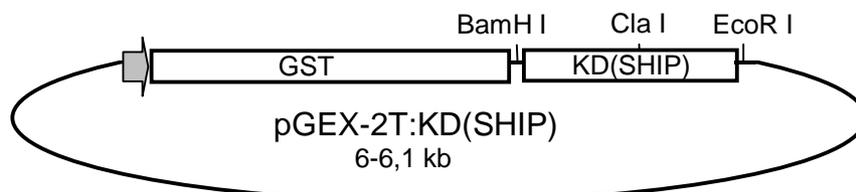
a) Konstrukte der SH2-Domäne von SHIP

- 1) Amplifikation der SH2-Domäne durch RT-PCR
- 2) Klonierung in den Vektor pBluescript KS(+) und Sequenzierung
- 3) Umklonierung in die *E. coli* Expressionsvektoren pGEX-2T und pQE-9

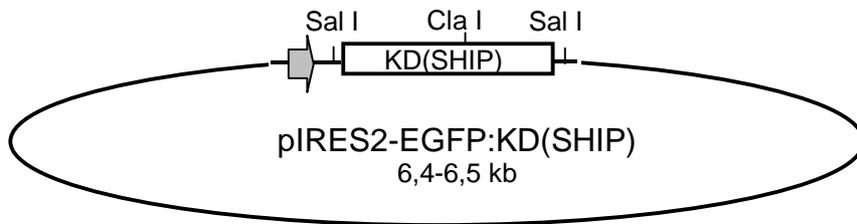
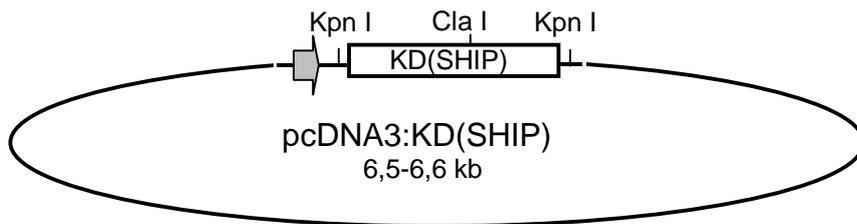


b) Konstrukte der katalytischen Domänen von SHIP

- 1) Amplifikation der katalytischen Domänen mit zusätzlichen Start- und Stoppcodons durch RT-PCR
- 2) Klonierung in die Vektoren pUC18/19 und Sequenzierung
- 3) Umklonierung in den *E. coli* Expressionsvektor pGEX-2T

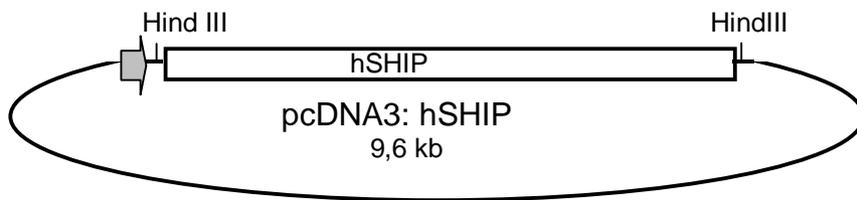
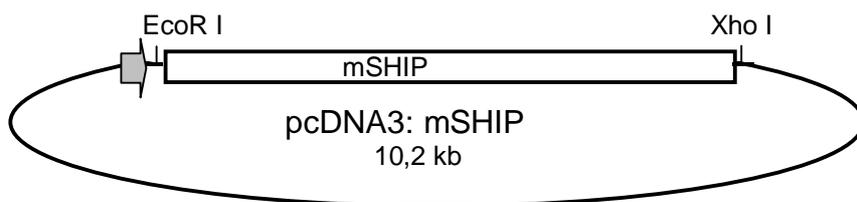


- 4) Umklonierung in die Säugerzellen Expressionsvektoren pcDNA3 und pIRES2-EGFP



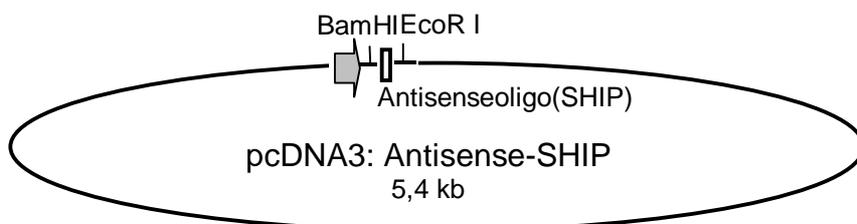
c) Maus SHIP und Human SHIP

1) Umklonierung in den Säugerzellen Expressionsvektor pcDNA3



d) Antisense-SHIP-Konstrukt

1) Klonierung in die Säugerzellen Expressionsvektoren pcDNA3 und Sequenzierung



8.2 DNA- und Protein-Sequenzen der hergestellten Konstrukte

Die zusätzlichen Start- und Stoppcodons und eine Codonänderung (keine Aminosäure-substitution) sind fett und unterstrichen dargestellt.

a) SH2(SHIP)

atc acc cgc tcc aag gca gag gag cta ctt tcc aga gcc ggc aag	45
Ile Thr Arg Ser Lys Ala Glu Glu Leu Leu Ser Arg Ala Gly Lys	15
gac ggg agc ttc ctt gtg cgt gcc agc gag tcc atc ccc cgg gcc	90
Asp Gly Ser Phe Leu Val Arg Ala Ser Glu Ser Ile Pro Arg Ala	30
tgc gca ctc tgc gtg ctg ttc cgg aat tgt gtt tac act tac agg	135
Cys Ala Leu Cys Val Leu Phe Arg Asn Cys Val Tyr Thr Tyr Arg	45
att ctg ccc aat gag gac gat aaa ttc act gtt cag gca tcc gaa	180
Ile Leu Pro Asn Glu Asp Asp Lys Phe Thr Val Gln Ala Ser Glu	60
ggg gtc ccc atg agg ttc ttc acg aag ctg gac cag ctc atc gac	225
Gly Val Pro Met Arg Phe Phe Thr Lys Leu Asp Gln Leu Ile Asp	75
ttt tac aag aag gaa aac atg ggg ctg gtg acc cac ctg cag tac	270
Phe Tyr Lys Lys Glu Asn Met Gly Leu Val Thr His Leu Gln Tyr	90
ccc gtg ccc ctg gag gag gag gat gct	297
Pro Val Pro Leu Glu Glu Glu Asp Ala	99

b) KD(SHIP) (krt)

← Start

tcc aag ggg cag gga aag aca cgg gac gac tct gct gac tac atc	45
Ser Lys Gly Gln Gly Lys Thr Arg Asp Asp Ser Ala Asp Tyr Ile	15
ccc cat gac atc tat gtg att ggc acc cag gag gat ccc ctt gga	90
Pro His Asp Ile Tyr Val Ile Gly Thr Gln Glu Asp Pro Leu Gly	30
gag aag gag tgg ctg gag cta ctc agg cac tcc ctg caa gaa gtc	135
Glu Lys Glu Trp Leu Glu Leu Leu Arg His Ser Leu Gln Glu Val	45
acc agc atg aca ttt aaa aca gtt gcc atc cac acc ctc tgg aac	180
Thr Ser Met Thr Phe Lys Thr Val Ala Ile His Thr Leu Trp Asn	60
att cgc ata gtg gtg ctt gcc aag cca gag cat gag aat cgg atc	225
Ile Arg Ile Val Val Leu Ala Lys Pro Glu His Glu Asn Arg Ile	75
agc cat atc tgc act gac aac gtg aag aca ggc atc gcc aac acc	270
Ser His Ile Cys Thr Asp Asn Val Lys Thr Gly Ile Ala Asn Thr	90
ctg gga aac aag gga gca gtg gga gtg tcc ttc atg ttc aat gga	315
Leu Gly Asn Lys Gly Ala Val Gly Val Ser Phe Met Phe Asn Gly	105
acc tcc ttg ggg ttc gtc aac agc cac ttg act tct gga agt gaa	360
Thr Ser Leu Gly Phe Val Asn Ser His Leu Thr Ser Gly Ser Glu	120

Anhang

aaa aag ctc agg aga aat caa aac tat atg aac atc ctg cgg ttc	405
Lys Lys Leu Arg Arg Asn Gln Asn Tyr Met Asn Ile Leu Arg Phe	135
ctg gcc ctg gga gac aag aag cta agc cca ttt aac atc acc cac	450
Leu Ala Leu Gly Asp Lys Lys Leu Ser Pro Phe Asn Ile Thr His	150
cgc ttc acc cac ctc ttc tgg ctt ggg gat ctc aac tac cgc gtg	495
Arg Phe Thr His Leu Phe Trp Leu Gly Asp Leu Asn Tyr Arg Val	165
gag ctg ccc act tgg gag gca gag gcc atc atc cag aag atc aag	540
Glu Leu Pro Thr Trp Glu Ala Glu Ala Ile Ile Gln Lys Ile Lys	180
caa cag cag tat tca gac ctt ctg gcc cac gac caa ctg ctc ctg	585
Gln Gln Gln Tyr Ser Asp Leu Leu Ala His Asp Gln Leu Leu Leu	195
gag agg aag gac cag aag gtc ttc ctg cac ttt gag gag gaa gag	630
Glu Arg Lys Asp Gln Lys Val Phe Leu His Phe Glu Glu Glu Glu	210
atc acc ttc gcc ccc acc tat cga ttt gaa aga ctg acc cgg gac	675
Ile Thr Phe Ala Pro Thr Tyr Arg Phe Glu Arg Leu Thr Arg Asp	225
aag tat gca tac acg aag cag aaa gca aca ggg atg aag tac aac	720
Lys Tyr Ala Tyr Thr Lys Gln Lys Ala Thr Gly Met Lys Tyr Asn	240
ttg ccg tcc tgg tgc gac cga gtc ctc tgg aag tct tac ccg ctg	765
Leu Pro Ser Trp Cys Asp Arg Val Leu Trp Lys Ser Tyr Pro Leu	255
gtg cat gtg gtc tgt cag tcc tat ggc agt acc agt gac atc atg	810
Val His Val Val Cys Gln Ser Tyr Gly Ser Thr Ser Asp Ile Met	270
acg agt gac cac agc cct gtc ttt gcc acg ttt gaa gca gga gtc	855
Thr Ser Asp His Ser Pro Val Phe Ala Thr Phe Glu Ala Gly Val	285
aca tct caa ttc gtc tcc aag aat ggt cct ggc act gta gat agc	900
Thr Ser Gln Phe Val Ser Lys Asn Gly Pro Gly Thr Val Asp Ser	300
caa ggg cag atc gag ttt ctt gca tgc tac gcc aca ctg aag acc	945
Gln Gly Gln Ile Glu Phe Leu Ala Cys Tyr Ala Thr Leu Lys Thr	315
aag tcc cag act aag ttc tac ttg gag ttc cac tca agc tgc tta	990
Lys Ser Gln Thr Lys Phe Tyr Leu Glu Phe His Ser Ser Cys Leu	330
gag agt ttt gtc aag agt cag gaa gga gag aat gaa gag gga agt	1035
Glu Ser Phe Val Lys Ser Gln Glu Gly Glu Asn Glu Glu Gly Ser	345
gaa gga gag ctg gtg gta cgg ttt gga gag act ctt ccc aag cta	1080
Glu Gly Glu Leu Val Val Arg Phe Gly Glu Thr Leu Pro Lys Leu	360
aag ccc att atc tct gac ccc gag tac tta ctg gac cag cat atc	1125
Lys Pro Ile Ile Ser Asp Pro Glu Tyr Leu Leu Asp Gln His Ile	375
ctg atc agc att	1137
Leu Ile Ser Ile	379
→Stop	

c) KD(SHIP) (n1)

← Start

cat tcg gag cag cca gag cct gac atg atc acc atc ttc att ggc	45
His Ser Glu Gln Pro Glu Pro Asp Met Ile Thr Ile Phe Ile Gly	15
act tgg aac atg ggt aat gca ccc cct ccc aag aag atc acg tcc	90
Thr Trp Asn Met Gly Asn Ala Pro Pro Pro Lys Lys Ile Thr Ser	30
tgg ttt ctc tcc aag ggg cag gga aag aca cgg gac gac tct gct	135
Trp Phe Leu Ser Lys Gly Gln Gly Lys Thr Arg Asp Asp Ser Ala	45
gac tac atc ccc cat gac atc tat gtg att ggc acc cag gag gat	180
Asp Tyr Ile Pro His Asp Ile Tyr Val Ile Gly Thr Gln Glu Asp	60
ccc ctt gga gag aag gag tgg ctg gag cta ctc agg cac tcc ctg	225
Pro Leu Gly Glu Lys Glu Trp Leu Glu Leu Leu Arg His Ser Leu	75
caa gaa gtc acc agc atg aca ttt aaa aca gtt gcc atc cac acc	270
Gln Glu Val Thr Ser Met Thr Phe Lys Thr Val Ala Ile His Thr	90
ctc tgg aac att cgc ata gtg gtg ctt gcc aag cca gag cat gag	315
Leu Trp Asn Ile Arg Ile Val Val Leu Ala Lys Pro Glu His Glu	105
aat cgg atc agc cat atc tgc act gac aac gtg aag aca ggc atc	360
Asn Arg Ile Ser His Ile Cys Thr Asp Asn Val Lys Thr Gly Ile	120
gcc aac acc ctg gga aac aag gga gca gtg gga gtg tcc ttc atg	405
Ala Asn Thr Leu Gly Asn Lys Gly Ala Val Gly Val Ser Phe Met	135
ttc aat gga acc tcc ttg ggg ttc gtc aac agc cac ttg act tct	450
Phe Asn Gly Thr Ser Leu Gly Phe Val Asn Ser His Leu Thr Ser	150
gga agt gaa aaa aag ctc agg aga aat caa aac tat atg aac atc	495
Gly Ser Glu Lys Lys Leu Arg Arg Asn Gln Asn Tyr Met Asn Ile	165
ctg cgg ttc ctg gcc ctg gga gac aag aag cta agc cca ttt aac	540
Leu Arg Phe Leu Ala Leu Gly Asp Lys Lys Leu Ser Pro Phe Asn	180
atc acc cac cgc ttc acc cac ctc ttc tgg ctt ggg gat ctc aac	585
Ile Thr His Arg Phe Thr His Leu Phe Trp Leu Gly Asp Leu Asn	195
tac cgc gtg gag ctg ccc act tgg gag gca gag gcc atc atc cag	630
Tyr Arg Val Glu Leu Pro Thr Trp Glu Ala Glu Ala Ile Ile Gln	210
aag atc aag caa cag cag tat tca gac ctt ctg gcc cac gac caa	675
Lys Ile Lys Gln Gln Gln Tyr Ser Asp Leu Leu Ala His Asp Gln	225
ctg ctc ctg gag agg aag gac cag aag gtc ttc ctg cac ttt gag	720
Leu Leu Leu Glu Arg Lys Asp Gln Lys Val Phe Leu His Phe Glu	240
gag gaa gag atc acc ttc gcc ccc acc tat cga ttt gaa aga ctg	765
Glu Glu Glu Ile Thr Phe Ala Pro Thr Tyr Arg Phe Glu Arg Leu	255

Anhang

acc cgg gac aag tat gca tac acg aag cag aaa gca aca ggg atg	810
Thr Arg Asp Lys Tyr Ala Tyr Thr Lys Gln Lys Ala Thr Gly Met	270
aag tac aac ttg ccg tcc tgg tgc gac cga gtc ctc tgg aag tct	855
Lys Tyr Asn Leu Pro Ser Trp Cys Asp Arg Val Leu Trp Lys Ser	285
tac ccg ctg gtg cat gtg gtc tgt cag tcc tat ggc agt acc agt	900
Tyr Pro Leu Val His Val Val Cys Gln Ser Tyr Gly Ser Thr Ser	300
gac atc atg acg agt gac cac agc cct gtc ttt gcc acg ttt gaa	945
Asp Ile Met Thr Ser Asp His Ser Pro Val Phe Ala Thr Phe Glu	315
gca gga gtc aca tct caa ttc gtc tcc aag aat ggt cct ggc act	990
Ala Gly Val Thr Ser Gln Phe Val Ser Lys Asn Gly Pro Gly Thr	330
gta gat agc caa ggg cag atc gag ttt ctt gca tgc tac gcc aca	1035
Val Asp Ser Gln Gly Gln Ile Glu Phe Leu Ala Cys Tyr Ala Thr	345
ctg aag acc aag tcc cag act aag ttc tac ttg gag ttc cac tca	1080
Leu Lys Thr Lys Ser Gln Thr Lys Phe Tyr Leu Glu Phe His Ser	360
agc	1083
Ser	361

→ **Stop**

d) KD(SHIP) (n2)

← **Start**

cat tcg gag cag cca gag cct gac atg atc acc atc ttc att ggc	45
His Ser Glu Gln Pro Glu Pro Asp Met Ile Thr Ile Phe Ile Gly	15
act tgg aac atg ggt aat gca ccc cct ccc aag aag atc acg tcc	90
Thr Trp Asn Met Gly Asn Ala Pro Pro Pro Lys Lys Ile Thr Ser	30
tgg ttt ctc tcc aag ggg cag gga aag aca cgg gac gac tct gct	135
Trp Phe Leu Ser Lys Gly Gln Gly Lys Thr Arg Asp Asp Ser Ala	45
gac tac atc ccc cat gac atc tat gtg att ggc acc cag gag gat	180
Asp Tyr Ile Pro His Asp Ile Tyr Val Ile Gly Thr Gln Glu Asp	60
ccc ctt gga gag aag gag tgg ctg gag cta ctc agg cac tcc ctg	225
Pro Leu Gly Glu Lys Glu Trp Leu Glu Leu Leu Arg His Ser Leu	75
caa gaa gtc acc agc atg aca ttt aaa aca gtt gcc atc cac acc	270
Gln Glu Val Thr Ser Met Thr Phe Lys Thr Val Ala Ile His Thr	90
ctc tgg aac att cgc ata gtg gtg ctt gcc aag cca gag cat gag	315
Leu Trp Asn Ile Arg Ile Val Val Leu Ala Lys Pro Glu His Glu	105
aat cgg atc agc cat atc tgc act gac aac gtg aag aca ggc atc	360
Asn Arg Ile Ser His Ile Cys Thr Asp Asn Val Lys Thr Gly Ile	120
gcc aac acc ctg gga aac aag gga gca gtg gga gtg tcc ttc atg	405
Ala Asn Thr Leu Gly Asn Lys Gly Ala Val Gly Val Ser Phe Met	135

ttc aat gga acc tcc ttg ggg ttc gtc aac agc cac ttg act tct	450
Phe Asn Gly Thr Ser Leu Gly Phe Val Asn Ser His Leu Thr Ser	150
gga agt gaa aaa aag ctc agg aga aat caa aac tat atg aac atc	495
Gly Ser Glu Lys Lys Leu Arg Arg Asn Gln Asn Tyr Met Asn Ile	165
ctg cgg ttc ctg gcc ctg gga gac aag aag cta agc cca ttt aac	540
Leu Arg Phe Leu Ala Leu Gly Asp Lys Lys Leu Ser Pro Phe Asn	180
atc acc cac cgc ttc acc cac ctc ttc tgg ctt ggg gat ctc aac	585
Ile Thr His Arg Phe Thr His Leu Phe Trp Leu Gly Asp Leu Asn	195
tac cgc gtg gag ctg ccc act tgg gag gca gag gcc atc atc cag	630
Tyr Arg Val Glu Leu Pro Thr Trp Glu Ala Glu Ala Ile Ile Gln	210
aag atc aag caa cag cag tat tca gac ctt ctg gcc cac gac caa	675
Lys Ile Lys Gln Gln Gln Tyr Ser Asp Leu Leu Ala His Asp Gln	225
ctg ctc ctg gag agg aag gac cag aag gtc ttc ctg cac ttt gag	720
Leu Leu Leu Glu Arg Lys Asp Gln Lys Val Phe Leu His Phe Glu	240
gag gaa gag atc acc ttc gcc ccc acc tat cga ttt gaa aga ctg	765
Glu Glu Glu Ile Thr Phe Ala Pro Thr Tyr Arg Phe Glu Arg Leu	255
acc cgg gac aag tat gca tac acg aag cag aaa gca aca ggg atg	810
Thr Arg Asp Lys Tyr Ala Tyr Thr Lys Gln Lys Ala Thr Gly Met	270
aag tac aac ttg ccg tcc tgg tgc gac cga gtc ctc tgg aag tct	855
Lys Tyr Asn Leu Pro Ser Trp Cys Asp Arg Val Leu Trp Lys Ser	285
tac ccg ctg gtg cat gtg gtc tgt cag tcc tat ggc agt acc agt	900
Tyr Pro Leu Val His Val Val Cys Gln Ser Tyr Gly Ser Thr Ser	300
gac atc atg acg agt gac cac agc cct gtc ttt gcc acg ttt gaa	945
Asp Ile Met Thr Ser Asp His Ser Pro Val Phe Ala Thr Phe Glu	315
gca gga gtc aca tct caa ttc gtc tcc aag aat ggt cct ggc act	990
Ala Gly Val Thr Ser Gln Phe Val Ser Lys Asn Gly Pro Gly Thr	330
gta gat agc caa ggg cag atc gag ttt ctt gca tgc tac gcc aca	1035
Val Asp Ser Gln Gly Gln Ile Glu Phe Leu Ala Cys Tyr Ala Thr	345
ctg aag acc aag tcc cag act aag ttc tac ttg gag ttc cac tca	1080
Leu Lys Thr Lys Ser Gln Thr Lys Phe Tyr Leu Glu Phe His Ser	360
agc tgc tta gag agt ttt gtc aag agt cag gaa gga	1116
Ser Cys Leu Glu Ser Phe Val Lys Ser Gln Glu Gly	372

→ **Stop**

e) KD(SHIP) (n3)

← **Start**

cat tcg gag cag cca gag cct gac atg atc acc atc ttc att ggc	45
His Ser Glu Gln Pro Glu Pro Asp Met Ile Thr Ile Phe Ile Gly	15

Anhang

act tgg aac atg ggt aat gca ccc cct ccc aag aag atc acg tcc	90
Thr Trp Asn Met Gly Asn Ala Pro Pro Pro Lys Lys Ile Thr Ser	30
tgg ttt ctc tcc aag ggg cag gga aag aca cgg gac gac tct gct	135
Trp Phe Leu Ser Lys Gly Gln Gly Lys Thr Arg Asp Asp Ser Ala	45
gac tac atc ccc cat gac atc tat gtg att ggc acc cag gag gat	180
Asp Tyr Ile Pro His Asp Ile Tyr Val Ile Gly Thr Gln Glu Asp	60
ccc ctt gga gag aag gag tgg ctg gag cta ctc agg cac tcc ctg	225
Pro Leu Gly Glu Lys Glu Trp Leu Glu Leu Leu Arg His Ser Leu	75
caa gaa gtc acc agc atg aca ttt aaa aca gtt gcc atc cac acc	270
Gln Glu Val Thr Ser Met Thr Phe Lys Thr Val Ala Ile His Thr	90
ctc tgg aac att cgc ata gtg gtg ctt gcc aag cca gag cat gag	315
Leu Trp Asn Ile Arg Ile Val Val Leu Ala Lys Pro Glu His Glu	105
aat cgg atc agc cat atc tgc act gac aac gtg aag aca ggc atc	360
Asn Arg Ile Ser His Ile Cys Thr Asp Asn Val Lys Thr Gly Ile	120
gcc aac acc ctg gga aac aag gga gca gtg gga gtg tcc ttc atg	405
Ala Asn Thr Leu Gly Asn Lys Gly Ala Val Gly Val Ser Phe Met	135
ttc aat gga acc tcc ttg ggg ttc gtc aac agc cac ttg act tct	450
Phe Asn Gly Thr Ser Leu Gly Phe Val Asn Ser His Leu Thr Ser	150
gga agt gaa aaa aag ctc agg aga aat caa aac tat atg aac atc	495
Gly Ser Glu Lys Lys Leu Arg Arg Asn Gln Asn Tyr Met Asn Ile	165
ctg cgg ttc ctg gcc ctg gga gac aag aag cta agc cca ttt aac	540
Leu Arg Phe Leu Ala Leu Gly Asp Lys Lys Leu Ser Pro Phe Asn	180
atc acc cac cgc ttc acc cac ctc ttc tgg ctt ggg gat ctc aac	585
Ile Thr His Arg Phe Thr His Leu Phe Trp Leu Gly Asp Leu Asn	195
tac cgc gtg gag ctg ccc act tgg gag gca gag gcc atc atc cag	630
Tyr Arg Val Glu Leu Pro Thr Trp Glu Ala Glu Ala Ile Ile Gln	210
aag atc aag caa cag cag tat tca gac ctt ctg gcc cac gac caa	675
Lys Ile Lys Gln Gln Gln Tyr Ser Asp Leu Leu Ala His Asp Gln	225
ctg ctc ctg gag agg aag gac cag aag gtc ttc ctg cac ttt gag	720
Leu Leu Leu Glu Arg Lys Asp Gln Lys Val Phe Leu His Phe Glu	240
gag gaa gag atc acc ttc gcc ccc acc tat cga ttt gaa aga ctg	765
Glu Glu Glu Ile Thr Phe Ala Pro Thr Tyr Arg Phe Glu Arg Leu	255
acc cgg gac aag tat gca tac acg aag cag aaa gca aca ggg atg	810
Thr Arg Asp Lys Tyr Ala Tyr Thr Lys Gln Lys Ala Thr Gly Met	270
aag tac aac ttg ccg tcc tgg tgc gac cga gtc ctc tgg aag tct	855
Lys Tyr Asn Leu Pro Ser Trp Cys Asp Arg Val Leu Trp Lys Ser	285

tac ccg ctg gtg cat gtg gtc tgt cag tcc tat ggc agt acc agt	900
Tyr Pro Leu Val His Val Val Cys Gln Ser Tyr Gly Ser Thr Ser	300
gac atc atg acg agt gac cac agc cct gtc ttt gcc acg ttt gaa	945
Asp Ile Met Thr Ser Asp His Ser Pro Val Phe Ala Thr Phe Glu	315
gca gga gtc aca tct caa ttc gtc tcc aag aat ggt cct ggc act	990
Ala Gly Val Thr Ser Gln Phe Val Ser Lys Asn Gly Pro Gly Thr	330
gta gat agc caa ggg cag atc gag ttt ctt gca tgc tac gcc aca	1035
Val Asp Ser Gln Gly Gln Ile Glu Phe Leu Ala Cys Tyr Ala Thr	345
ctg aag acc aag tcc cag act aag ttc tac ttg gag ttc cac tca	1080
Leu Lys Thr Lys Ser Gln Thr Lys Phe Tyr Leu Glu Phe His Ser	360
agc tgc tta gag agt ttt gtc aag agt cag gaa gga gag aat gaa	1125
Ser Cys Leu Glu Ser Phe Val Lys Ser Gln Glu Gly Glu Asn Glu	375
gag gga agt gaa gga gag ctg gtg gta cgg ttt gga gag act ctt	1170
Glu Gly Ser Glu Gly Glu Leu Val Val Arg Phe Gly Glu Thr Leu	390
ccc aag cta aag ccc	1185
Pro Lys Leu Lys Pro	395

→**Stop**

f) KD(SHIP) (5n3n)

← **Start**

ggc tca gaa tct acc aac agg cgt tcc ctt atc cct ccg gtc acc	45
Gly Ser Glu Ser Thr Asn Arg Arg Ser Leu Ile Pro Pro Val Thr	15
ttt gag gtg aag tca gag tcc ctg ggc att cct cag aaa atg cat	90
Phe Glu Val Lys Ser Glu Ser Leu Gly Ile Pro Gln Lys Met His	30
ctc aaa gtg gac gtt gag tct ggg aaa ctg atc gtt aag aag tcc	135
Leu Lys Val Asp Val Glu Ser Gly Lys Leu Ile Val Lys Lys Ser	45
aag gat ggt tct gag gac aag ttc tac agc cac aaa aaa atc ctg	180
Lys Asp Gly Ser Glu Asp Lys Phe Tyr Ser His Lys Lys Ile Leu	60
cag ctc att aag tcc cag aag ttt cta aac aag ttg gtg att ttg	225
Gln Leu Ile Lys Ser Gln Lys Phe Leu Asn Lys Leu Val Ile Leu	75
gtg gag acg gag aag gag aaa atc ctg agg aag gag tat gtt ttt	270
Val Glu Thr Glu Lys Glu Lys Ile Leu Arg Lys Glu Tyr Val Phe	90
gct gac tct aag aaa aga gaa ggc ttc tgt caa ctc ctg cag cag	315
Ala Asp Ser Lys Lys Arg Glu Gly Phe Cys Gln Leu Leu Gln Gln	105
atg aag aac aag cat tcg gag cag cca gag cct gac atg atc acc	360
Met Lys Asn Lys His Ser Glu Gln Pro Glu Pro Asp Met Ile Thr	120
atc ttc att ggc act tgg aac atg ggt aat gca ccc cct ccc aag	405
Ile Phe Ile Gly Thr Trp Asn Met Gly Asn Ala Pro Pro Pro Lys	135

Anhang

aag atc acg tcc tgg ttt ctc tcc aag ggg cag gga aag aca cgg	450
Lys Ile Thr Ser Trp Phe Leu Ser Lys Gly Gln Gly Lys Thr Arg	150
gac gac tct gct gac tac atc ccc cat gac atc tat gtg att ggc	495
Asp Asp Ser Ala Asp Tyr Ile Pro His Asp Ile Tyr Val Ile Gly	165
acc cag gag gat ccc ctt gga gag aag gag tgg ctg gag cta ctc	540
Thr Gln Glu Asp Pro Leu Gly Glu Lys Glu Trp Leu Glu Leu Leu	180
agg cac tcc ctg caa gaa gtc acc agc atg aca ttt aaa aca gtt	585
Arg His Ser Leu Gln Glu Val Thr Ser Met Thr Phe Lys Thr Val	195
gcc atc cac acc ctc tgg aac att cgc ata gtg gtg ctt gcc aag	630
Ala Ile His Thr Leu Trp Asn Ile Arg Ile Val Val Leu Ala Lys	210
cca gag cat gag aat cgg atc agc cat atc tgc act gac aac gtg	675
Pro Glu His Glu Asn Arg Ile Ser His Ile Cys Thr Asp Asn Val	225
aag aca ggc atc gcc aac acc ctg gga aac aag gga gca gtg gga	720
Lys Thr Gly Ile Ala Asn Thr Leu Gly Asn Lys Gly Ala Val Gly	240
gtg tcc ttc atg ttc aat gga acc tcc ttg ggg ttc gtc aac agc	765
Val Ser Phe Met Phe Asn Gly Thr Ser Leu Gly Phe Val Asn Ser	255
cac ttg act tct gga agt gaa aaa aag ctc agg aga aat caa aac	810
His Leu Thr Ser Gly Ser Glu Lys Lys Leu Arg Arg Asn Gln Asn	270
tat atg aac atc ctg cgg ttc ctg gcc ctg gga gac aag aag cta	855
Tyr Met Asn Ile Leu Arg Phe Leu Ala Leu Gly Asp Lys Lys Leu	285
agc cca ttt aac atc acc cac cgc ttc acc cac ctc ttc tgg ctt	900
Ser Pro Phe Asn Ile Thr His Arg Phe Thr His Leu Phe Trp Leu	300
ggg gat ctc aac tac cgc gtg gag ctg ccc act tgg gag gca gag	945
Gly Asp Leu Asn Tyr Arg Val Glu Leu Pro Thr Trp Glu Ala Glu	315
gcc atc atc cag aag atc aag caa cag cag tat tca gac ctt ctg	990
Ala Ile Ile Gln Lys Ile Lys Gln Gln Gln Tyr Ser Asp Leu Leu	330
gcc cac gac caa ctg ctc ctg gag agg aag gac cag aag gtc ttc	1035
Ala His Asp Gln Leu Leu Leu Glu Arg Lys Asp Gln Lys Val Phe	345
ctg cac ttt gag gag gaa gag atc acc ttc gcc ccc acc tat cga	1080
Leu His Phe Glu Glu Glu Glu Ile Thr Phe Ala Pro Thr Tyr Arg	360
ttt gaa aga ctg acc cgg gac aag tat gca tac acg aag cag aaa	1125
Phe Glu Arg Leu Thr Arg Asp Lys Tyr Ala Tyr Thr Lys Gln Lys	375
gca aca ggg atg aag tac aac ttg ccg tcc tgg tgc gac cga gtc	1170
Ala Thr Gly Met Lys Tyr Asn Leu Pro Ser Trp Cys Asp Arg Val	390
ctc tgg aag tct tac ccg ctg gtg cat gtg gtc tgt cag tcc tat	1215
Leu Trp Lys Ser Tyr Pro Leu Val His Val Val Cys Gln Ser Tyr	405

ggc agt acc agt gac atc atg acg agt gac cac agc cct gtc ttt	1260
Gly Ser Thr Ser Asp Ile Met Thr Ser Asp His Ser Pro Val Phe	420
gcc acg ttt gaa gca gga gtc aca tct caa ttc gtc tcc aag aat	1305
Ala Thr Phe Glu Ala Gly Val Thr Ser Gln Phe Val Ser Lys Asn	435
ggt cct ggc act gta gat agc caa ggg cag atc gag ttt ctt gca	1350
Gly Pro Gly Thr Val Asp Ser Gln Gly Gln Ile Glu Phe Leu Ala	450
tgc tac gcc aca ctg aag acc aag tcc cag act aag ttc tac ttg	1395
Cys Tyr Ala Thr Leu Lys Thr Lys Ser Gln Thr Lys Phe Tyr Leu	465
gag ttc cac tca agc tgc tta gag agt ttt gtc aag agt cag gaa	1440
Glu Phe His Ser Ser Cys Leu Glu Ser Phe Val Lys Ser Gln Glu	480
gga gag aat gaa gag gga agt gaa gga gag ctg gtg gta cgg ttt	1485
Gly Glu Asn Glu Glu Gly Ser Glu Gly Glu Leu Val Val Arg Phe	495
gga gag act ctt ccc aag cta aag ccc	1512
Gly Glu Thr Leu Pro Lys Leu Lys Pro	504
→Stop	

8.3 Abkürzungsverzeichnis

8.3.1 Spezielle Abkürzungen

[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Calciumkonzentration
2-YT	2-Yeast Tryptone; zweifach Hefe-Pepton-Medium
A	Adenin
Ala	Alanin
Amp	Ampicillin, α-D-Aminobenzylpenicillin
AMPS	Ammoniumperoxidisulfat
Arg	Arginin
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure(n)
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BASH	B cell Adapter containing Src Homology 2 domain
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoylphosphat, Toluidin-Salz
BCR	B-Zell-Rezeptor
BGH	Bovine Growth Hormone
Bisacrylamid	N, N'-Methylenbis-acrylamid
Blk	B lymphoid kinase (Tyrosinkinase der Src-Familie)
BLNK	B cell Linker protein

bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Btk	<i>Bruton's tyrosine kinase</i> (Tyrosinkinase der Tec-Familie)
C	Cytosin
C-	Carboxyl-
CCE	<i>Capacitative Ca²⁺ Entry</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	Komplementäre DNA
Click's	von Click modifiziertes RPMI
CML	<i>Chronic Myelogenous Leukemia</i>
CMV	Cytomegalovirus
CRAC	<i>Calcium-Release Activated Calcium channel</i>
CSF-1	<i>Colony Stimulating Factor-1</i>
Csk	<i>C-terminal Src kinase</i> (Src-homologe Tyrosinkinase)
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
Cys	Cystein
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EPO	<i>Erythropoietin</i>
ER	Endoplasmatische Retikulum
Erk	<i>Extracellular signal-regulated protein kinase</i>
EtBr	Ethidiumbromid, 3,8-Diamino-6-ethyl-5-phenylphenanthridiumbromid
F(ab') ₂	<i>Fragment antigen binding</i>
FACS	<i>Fluorescent Activated Cell Sorter</i>
FB	<i>Final Bleeding</i> ; letzte Serumabnahme
Fc	<i>Fragment crystalline</i>
Fc _ε R	IgE-Rezeptor, Fc-Rezeptor für IgE

Fc γ R	IgG-Rezeptor, Fc-Rezeptor für IgG
FcR	Fc-Rezeptor (Rezeptor für den konstanten Fc-Teil von Ig)
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
FSC	Vorwärtsstreulicht
Fyn	<i>Fibroblast tyrosine kinase</i> (Tyrosinkinase der Src-Familie)
G	Guanin
G α M	Ziege-Anti-Maus-Antikörper
G α R	Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper
G418	Geneticin, O-2-Amino-2-deoxy-6-C-methyl- α -D-glukopyranosyl-garamin
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
G-CSF	<i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i>
GEF	<i>Guanine nucleotide Exchange Factor</i>
GITC	Guanidinium Isothiocyanat
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
Grb	<i>Growth factor receptor-binding protein</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintrisphosphat
GTPase	GTP-Hydrolase
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
Hck	<i>Hematopoietic cell kinase</i> (Tyrosinkinase der Src-Familie)
HCP	<i>Hematopoietic Cell Phosphatase</i>
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinol]-ethansulfonsäure
His	Histidin
HMW	<i>High Molecular Weight</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HS1	<i>Hematopoietic-lineage Specific protein 1</i>
HSV	Herpes Simplex Virus
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Ile	Isoleucin
IP3	Inositoltrisphosphat
IP4	Inositoltetrakisphosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid

IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i>
IRS	<i>Insulin Receptor Substrate</i>
ITAM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif</i>
ITIM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif</i>
JNK	<i>c-Jun NH2-terminal Kinase</i>
Kan	Kanamycin
kb	1000 bp
KIR	<i>Killer cell Inhibitory Receptor</i>
<i>lacZ</i>	β -Galactosidase-Gen
LB	<i>Luria-Bertani Broth</i>
LBG	LB-Medium mit Glucose
Lck	<i>Lymphoid cell kinase</i> (Tyrosinkinase der Src-Familie)
Leu	Leucin
LMP	<i>Low Melting Point</i>
LMW	<i>Low Molecular Weight</i>
LTB	<i>Large Taking Blood</i> ; zweite Serumabnahme
Lyn	<i>Lck/yes-related novel tyrosine kinase</i> (Tyrosinkinase der Src-Familie)
Lys	Lysin
mAK	Monoklonale Antikörper
MAPK	MAP-Kinase, <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i> , Polylinker
M-CSF	<i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
<i>me</i>	<i>Motheaten</i>
MEK	MAPK/ERK Kinase
Met	Methionin
<i>me^v</i>	<i>Motheaten-viable</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MIRR	<i>Multi chain Immune Recognition Receptor</i>
MPA	Mycophenolsäure
mRNA	Messenger-RNA
N-	Amino-
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NC	Nitrozellulose
neo	Gen für das Neomycin-Phosphotransferase
NF- κ B	(Gruppe von Transkriptionsfaktoren)
Ni ²⁺ -NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
NIP	5-iodo-4-hydroxy-3-nitrophenacetyl
NK-Zellen	natürliche Killerzellen

NP40	Nonidet P40 Ersatzprodukt
P	Phosphatgruppe
pA	PolyA-Schwänze
PAA	Polyacrylamid
pac	Gen für die Puromycin-N-Acetyltransferase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAK	Polyklonale Antikörper
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i> ; phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PE	Phycoerythrin
PECAM	<i>Platelet cell Endothelial Adhesion Molecule</i>
PEG	Polyethylenglykol
PerCP	Chlorophyllderivat
PH	<i>Pleckstrin-Homology</i>
Phe	Phenylalanin
PI3-K	Phosphatidyl-Inositol-3'-Kinase
PIP	Phosphatidyl-Inositolphosphat
PIP2	Phosphatidyl-Inositolbisphosphat
PIP3	Phosphatidyl-Inositoltrisphosphat
PIR-B	<i>Paired Immunoglobulin-like Receptor B</i>
PIS	Präimmunserum
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pro	Prolin
PTB	<i>Phosphotyrosine Bindung</i>
PTK	Proteintyrosinkinase
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
pY	phosphorylierter Tyrosinrest
R α M	Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper
Ras	<i>Rasheed sarcoma</i> ; p21 ^{ras} Onkoprotein des H-ras-Gens (eine Superfamilie der monomeren GTPasen)
RIPA	Radio-Immuno-Präzipitationsassay
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease

RPMI	<i>Roswell Park Memorial Insititute</i>
Rsk	<i>ribosomal S6 kinase</i>
RT	Reverse Transkription
S6k	<i>ribosomal S6 kinase</i>
Sarcosyl	N-Lauroyl-Sarcosin, Natrium Salz
SDS	Natriumdodecylsufat
Ser	Serin
SH	<i>Src-Homology</i>
Shc	<i>Src homologous and collagen</i>
SHIP	<i>SH2-domain-containing Inositol polyphosphat 5'-Phosphatase</i>
SHP	<i>SH2-domain-containing Phosphatase</i>
slg	<i>Surface Ig</i> ; membranständiges Ig
SIP	<i>Signaling Inositol Phosphatase</i>
SLP	<i>Src homology 2 domain-containing Leukocyte Protein</i>
SOC	<i>Store-Operated Calcium channel</i>
Sos	<i>Son of Sevenless</i> ; Homologies Protein zum Produkt des <i>Drosophila Sevenless</i> -Gens
Src	Tyrosinkinase <i>Rous Sarkom</i>
SSC	Rechtwinkelstreulicht
STB	<i>Small Taking Blood</i> ; Erste Serumabnahme
STE	Kochsalz enthaltende TE-Puffer
STET	Saccharose-Tris-EDTA-Triton-Puffer
Syk	<i>Spleen tyrosine kinase</i> (Tyrosinkinase der Syk/ZAP-70 Familie)
T	Thymin
T ₄	von Bakteriophagen T ₄ abstammend
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
Thr	Threonin
TK	Thymin Kinase
TM	Transmembranregion
Tm	Schmelzpunkt
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-ammoniummethan
Triton X-100	4-(2',2',4',4'-Tetramethylbutyl)-phenyldecaethylenglycolether
Trp	Tryptophan

<i>trp</i>	<i>Transient receptor potential</i>
TSS	<i>Treatment of Septic Shock</i>
Tyr	Tyrosin (Y)
Tween 20	Polyoxylethylen(20)-sorbitanmonolaurat
U	<i>Unit</i> , Einheit der Enzymaktivität
Val	Valin
Vav	p ^{95Vav} ; Produkt des Vav-Protoonkogens
Wt	Wildtyp
ZAP-70	Zeta-Ketten-assoziiertes Protein p70 (Tyrosinkinase der Syk/ZAP-70 Familie)

8.3.2 Allgemeine Abkürzungen

d	Tage
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
h	Stunde
H ₂ O _{bidest}	bidestilliertes Wasser (elektrischer Widerstand mindestens 17 MΩ)
min	Minuten (´)
Mr	relative Molmasse
o/n	über Nacht
OD	optische Dichte (Absorption)
OD ₂₆₀	OD bei einer Wellenlänge von 260 nm
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunden (´´)
v/v	Verhältnis Volumen/Volumen
w	Gewicht
w/v	Verhältnis Gewicht/Volumen

8.4 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1	Strukturmodell eines BCR-Komplexes	3
Abb. 2	Schematische Darstellung der humanen FcγRIIb	6
Abb. 3	Domänenstruktur von p145 SHIP	16
Abb. 4	Schematischer Aufbau der chimären Rezeptoren IgM/Igα und IgM/Igβ	57
Abb. 5	IgM/Igα- und IgM/Igβ-Oberflächenexpression der transfizierten IIA1.6-FcγRIIb1- oder -FcγRIIb2-Zellen	59
Abb. 6	Inhibition des Calciumionenanstiegs nach Coquervernetzung von slgG bzw. IgM/Igα und FcγRIIb	61

Abb. 7	Detektion der Tyrosinphosphorylierung der Fc γ RIIb-Isoformen nach der Coquervernetzung mit dem IgM/Ig α	63
Abb. 8	Unterschiedliche Tyrosinphosphorylierung des Fc γ RIIb1 nach der Coquervernetzung mit sIgG, IgM/Ig α und IgM/Ig β	65
Abb. 9	Detektion der Fc γ RIIb-Tyrosinphosphorylierung nach Pervanadat/H ₂ O ₂ Behandlung	67
Abb. 10	Kinetik der IgM/Ig α -Tyrosinphosphorylierung nach Quervernetzung und Fc γ RIIb-Coquervernetzung	70
Abb. 11	Unterschiedliche Modulation der Tyrosinphosphorylierung von endogenem Ig α und Ig β nach Coquervernetzung von BCR und Fc γ RIIb1 bzw. Fc γ RIIb2	72
Abb. 12	Assoziation der Tyrosinkinassen Lyn und Fyn an die chimären IgM-Rezeptoren	74
Abb. 13	Aufreinigung der SHIP-SH2-Domäne und Test des damit hergestellten polyklonalen Antikörpers	76
Abb. 14	Schematische Darstellungen verschiedenen katalytischen Domänen von p145 SHIP	78
Abb. 15	Lokalisation der rekombinanten katalytischen Domänen von SHIP in <i>E. coli</i>	79
Abb. 16	Aufreinigung der enzymatisch aktiven katalytischen Domänen von SHIP und Test des damit hergestellten polyklonalen Antikörpers	81
Abb. 17	Spezifische RT-PCR des endogenen Maus SHIP und transfizierten humanen SHIP	84
Abb. 18	Nachweis des SHIP-Proteins in einem RT-PCR positiven <i>Antisense</i> -Klon	86
Abb. 19	Bindung von p145 SHIP an verschiedene GST-SH3-Domänen	88
Abb. 20	Modell für die Fc γ RIIb1-Inhibition der BCR-induzierten Aktivierung durch SHIP	102
Tab. 1	ITAM verschiedener signalvermittelnder Ketten im Sequenzvergleich	4
Tab. 2	ITIM verschiedener Rezeptoren im Sequenzvergleich	5

Lebenslauf

Name	Li
Vorname	Shi
Geschlecht	weiblich
Geburtstag	01.04.1968
Geburtsort	Hebei, VR China
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	chinesisch
Schulbesuch	
09.1975 – 07.1980	Grundschule, Nanjing
09.1980 – 07.1983	Mittelschule, Nanjing
09.1983 – 07.1986	Obere Mittelschule, Shijiazhuang Abschluß: Abitur
Hochschulstudium	
09.1986 – 07.1990	Studium der Biochemie an der Universität Hebei Abschluß: Bachelor der Naturwissenschaft
09.1990 – 07.1993	Studium der Zellbiologie an der Pädagogischen Universität Beijing Abschluß: Magister der Naturwissenschaft
04.1995 – 10.1995	Deutschkurs an der Technischen Universität Berlin Abschlußprüfung: PNdS
Promotion	
05.1996	Beginn der Dissertation bei Herrn Prof. Dr. J. Frey, Fakultät für Chemie, Abteilung Biochemie II, Universität Bielefeld
05.1996 – 04.1999	Stipendiatin des Graduiertenkollegs „Zelluläre Grundlagen biotechnischer Prozesse“, Universität Bielefeld
Berufstätigkeit	
05.1994 – 11.1994	Gastwissenschaftlerin bei der Gruppe Gentherapie am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch
05.1996 – 04.2001	Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld
Sprachkenntnisse	Deutsch, Englisch; Chinesisch