

**STUDIEN AN SIGNALLEITENDEN ADAPTERPROTEINEN
IN WILDTYPISCHEN UND VIRUSINFIZIERTEN
LYMPHOCYTEN**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften**

vorgelegt von

Niklas Engels

aus Ellerau in Schleswig-Holstein

Januar 2005

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2000 bis November 2004 am Max-Planck-Institut für Immunbiologie in Freiburg in der Abteilung von Prof. Dr. M. Reth und an der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld in der Abteilung für Molekulare Immunologie und Biochemie unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. J. Wienands durchgeführt.

ABKÜRZUNGEN

ADAP	<i>adhesion and degranulation promoting adapter protein</i>
BCR	B-Zell-Antigenrezeptor
Btk	<i>Bruton's tyrosine kinase</i>
Crk	<i>CT10 regulator of kinase</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr Virus
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiammoniumtetraacetat
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FCS	Fötales Kälberserum
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	(Influenza-Virus-) Hämagglutinin
HRPO	Meerrettich-Peroxidase
Ig	Immunglobulin
ITAM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif</i>
Itk	<i>Interleukin-2 inducible T cell kinase</i>
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie
LMP	Latentes Membranprotein
orf	offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PH	<i>Pleckstrin-homology</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3'-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PLC- γ	Phospholipase-C- γ
PRAM-1	<i>promyelocytic retinoic-acid receptor α induced adapter molecule-1</i>
PTK	Protein-Tyrosinkinase
p-Tyr	phospho-Tyrosin
RT	Reverse Transkription
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SH	<i>Src-homology</i>
SLP	<i>SH2-domain containing leucocyte protein</i>
Syk	<i>spleen tyrosine kinase</i>
TCR	T-Zell Antigenrezeptor
wt	Wildtyp
ZAP-70	<i>zeta associated protein of 70 kDa</i>

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	6
EINLEITUNG	7
VON DER SEITENKETTE ZU MULTIMOLEKULAREN SIGNALLEITUNGSKOMPLEXEN – EIN HISTORISCHER ÜBERBLICK ÜBER DIE B-ZELL-IMMUNOLOGIE.....	7
<i>Antikörper – von der Entdeckung bis zur Strukturaufklärung</i>	7
<i>Lymphocyten – klonale Selektion durch Aktivierung von Antigenrezeptoren</i>	10
<i>Antigenrezeptoren auf Lymphocyten – Seitenketten sind Multiproteinkomplexe</i>	11
<i>Das ITAM</i>	13
<i>Cytoplasmatische Protein-Tyrosin-Kinasen in Lymphocyten</i>	14
<i>Lipid-modifizierende Enzyme</i>	16
<i>Adapterproteine – die Entdeckung multimolekularer Signalleitungskomplexe</i>	18
<i>Neuartige Adapterproteine in Lymphocyten</i>	22
<i>„Lipid rafts“</i>	24
<i>LMP2A – ein virales Protein manipuliert die B-Zell-Biologie</i>	26
ZIELE DER ARBEIT	29
MATERIALIEN UND METHODEN	30
MATERIALIEN.....	30
<i>Chemikalien</i>	30
<i>Antikörper</i>	31
<i>GST-Fusionsproteine</i>	32
<i>Kommerzielle Nachweis- und Reaktionssysteme</i>	32
<i>Enzyme</i>	32
<i>Plasmide</i>	33
<i>Peptide</i>	33
<i>Oligonukleotide</i>	33
Oligonukleotide für zielgerichtete Mutagenesen.....	33
Oligonukleotide für Sequenzierungen.....	34
Oligonukleotide für Klonierungen.....	34
Oligonukleotide zur RT-PCR-Gewebeexpressionsanalyse.....	35
<i>Puffer und Medien</i>	35
Puffer für molekularbiologische Arbeiten.....	35
Puffer für biochemische Arbeiten.....	35
Medien und Nährböden für Bakterien.....	36
Medien für die Zellkultur.....	36
<i>Transformationskompetente Bakterien</i>	36
<i>Sonstige Materialien</i>	36
METHODEN.....	37
<i>Zellkultur</i>	37
Allgemeines.....	37
Zellkulturbedingungen.....	37
Zelllinien.....	37

Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen.....	38
Durchflußcytometrie.....	38
Transiente Transfektion adhärenter Zellen.....	38
<i>Molekularbiologische Methoden</i>	38
Fragmentierung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	38
Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren.....	39
Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	39
Phenol-Chloroform-Fällung von Proteinen.....	39
Ethanol-Fällung von DNA.....	39
Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung.....	39
Ligation von DNA-Fragmenten.....	39
Transformation kompetenter Bakterien.....	40
Plasmidisolierung.....	40
Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen.....	40
Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	40
Zielgerichtete Mutagenese.....	40
Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR).....	41
RT-PCR-Expressionsanalyse.....	41
Klonierung von PCR-Fragmenten.....	41
Sequenzierung von DNA.....	41
Klonierung der humanen und murinen p120-cDNAs.....	42
Klonierung der humanen NBP64-cDNA.....	42
<i>Biochemische Methoden</i>	42
Stimulation von B-Zellen über den BCR.....	42
Stimulation von Zellen mit Pervanadat/H ₂ O ₂	43
Affinitätsreinigungen mit Antikörpern, GST-Fusionsproteinen oder Peptiden.....	43
Kompetitionsexperimente mit Peptiden.....	43
Expression und Isolierung von GST-Fusionsproteinen.....	44
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	44
Western-Blot-Analyse.....	44
Herstellung von Antiseren in Kaninchen.....	44
DATENBANKEN UND SOFTWARE.....	45
<i>Ausgewählte Internet-Adressen von Datenbanken und Plattformen mit Links zu Software für die Molekularbiologie</i>	45
<i>Sequenzanalyse-Software</i>	45
ERGEBNISSE	46
IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON INTERAKTIONSPARTNERN DES ADAPTERPROTEINS SLP-65.....	46
<i>SLP-65 bindet unabhängig von phosphorylierten ITAM- Tyrosinresten an Ig-α/Ig-β</i>	46
<i>Die Interaktion zwischen GST-SLP-65 und Ig-α/Ig-β erfolgt über das außerhalb des Ig-α-ITAMs gelegene Tyrosin an Position 204</i>	46
<i>SLP-65 assoziiert mit Ig-α/Ig-β in vivo</i>	48
UNTERSUCHUNG DER ROLLE VON SLP-65 FÜR LMP2A-VERMITTELTE SIGNALLEITUNGSEREIGNISSE.....	51
<i>LMP2A induziert die konstitutive Tyrosinphosphorylierung von SLP-65, nicht jedoch von PLC-γ2</i>	51
IDENTIFIZIERUNG NEUER SIGNALLEITENDER ELEMENTE IN LYMPHOCYTEN.....	53
<i>p120 ist ein neues Adapterprotein mit Homologie zu ADAP und PRAM-1</i>	53

<i>Analyse der Gewebeexpression von p120</i>	56
<i>Klonierung der p120-cDNA aus humanen und murinen Zellen</i>	57
<i>Transfektion von p120-HA in Fibroblasten führt zur Expression eines 120 kDa Proteins</i>	57
<i>p120 assoziiert mit SKAP-Proteinen in vitro</i>	58
<i>Identifizierung und Klonierung der cDNA eines neuen BEACH-Domänen Proteins, NBP64</i>	59
<i>Sequenzvergleich verschiedener BEACH-Domänen</i>	63
<i>NBP64 wird präferentiell in lymphatischem Gewebe exprimiert</i>	64
DISKUSSION	66
IG- α : MEHR ALS NUR EIN ITAM.....	66
<i>Asymmetrische Tyrosinphosphorylierung des Ig-α/Ig-β Heterodimers</i>	66
<i>Funktionelle Unterschiede zwischen Ig-α und Ig-β</i>	68
<i>Funktionelle Relevanz der Interaktion von SLP-65 und Ig-α</i>	68
SLP-65 IN EBV-INFIZIERTEN B-ZELLEN.....	69
<i>Das LMP2A-vermittelte „maintenance“-Signal verläuft über SLP-65</i>	69
IDENTIFIZIERUNG NEUER SIGNALLEITENDER ELEMENTE IN LYMPHOCYTEN.....	70
<i>p120: ein neues Adapterprotein mit Homologie zu ADAP und PRAM-1</i>	70
<i>NBP64: ein neuartiges BEACH-Domänen Protein in Lymphocyten</i>	72
KONKLUSIONEN.....	74
REFERENZEN	75
ANHANG	88
PLASMIDRESTRIKTIONSKARTEN.....	88
LEBENS LAUF.....	89

ZUSAMMENFASSUNG

Das Immunsystem der Wirbeltiere ist ein aus verschiedenartigen Zellen bestehendes System, das den Organismus vor Krankheitserregern schützt. Im Falle einer Infektion vermag es die Erreger meist zu eliminieren und dem Individuum anschließend einen langanhaltenden Schutz vor einer erneuten Infektion mit dem gleichen Erreger zu verleihen. Das Immunsystem wird im wesentlichen von Leukocyten gebildet, von denen B- und T-Lymphocyten das sog. adaptive Immunsystem darstellen. B- und T-Lymphocyten besitzen hochspezifische Rezeptoren, die an Pathogene oder deren Bestandteile (allg. Antigene) binden können. Diese Antigenrezeptoren lösen durch Bindung an ein Antigen Signale im Inneren der Zelle aus, die für deren Aktivierung und die darauffolgende Initiation einer Immunantwort notwendig sind. Das cytoplasmatische Adapterprotein SLP-65 ist für B-Zell-Antigenrezeptor- (BCR-) vermittelte Signalleitungsereignisse essentiell, da es signalleitende Enzyme und deren Substrate in multimolekularen Komplexen organisiert. Ohne diese Organisation verläuft die Aktivierung nachfolgender biochemischer Prozesse ineffizient oder bleibt gänzlich aus, was beim Menschen eine schwere Immundefizienz zur Folge hat. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten biochemischen Untersuchungen zur Funktion von SLP-65 führten zu der Entdeckung, daß SLP-65 über seine SH2-Domäne direkt mit der BCR-Komponente Ig- α interagiert. Diese Interaktion erfolgt über eine außerhalb des ITAMs gelegene, bis dato unbekannte Phosphorylierungsstelle in Ig- α , Tyrosin 204 (Y₂₀₄). Desweiteren konnte demonstriert werden, daß SLP-65 essentiell für die Funktion des Latenten Membranproteins 2A (LMP2A), eines Proteins des Epstein-Barr Virus (EBV), ist. Das EBV infiziert selektiv B-Lymphocyten, in denen es einen lebenslangen latenten Infektionszustand etablieren kann. LMP2A ist an der Aufrechterhaltung der Latenz beteiligt und bedient sich zu diesem Zweck, wie in dieser Arbeit gezeigt wird, des SLP-65-Proteins.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung neuer signalleitender Proteine in Lymphocyten. Mittels Recherche in Sequenzdatenbanken konnten zwei neue Gene identifiziert und deren cDNAs kloniert werden. Bei den davon abgeleiteten Proteinen, p120 und NBP64, handelt es sich vermutlich um Adapterproteine, da bekannte katalytische Domänen nicht vorhanden sind. p120 weist Homologie zu den hämatopoetischen Adapterproteinen ADAP und PRAM-1 auf. Ferner assoziiert es wie diese *in vitro* mit Proteinen der SKAP-Familie. NBP64 enthält eine BEACH-Domäne und mehrere WD40-*repeats*, sowie vermutlich eine PH-ähnliche Domäne. Die Funktion aller dieser Domänen ist unklar, jedoch sind keine BEACH-Domänen oder WD40-*repeats* enthaltenden Proteine mit katalytischer Aktivität bekannt. Während die Expression von p120 nicht abschließend geklärt ist, wird NBP64 präferentiell in lymphatischem Gewebe exprimiert.

Zusammengenommen werden in dieser Arbeit neue Eigenschaften des BCRs und des Adapterproteins SLP-65 in normalen und EBV-infizierten B-Zellen beschrieben. Desweiteren werden zwei neue Adapterproteine, p120 und NBP64, vorgestellt.

EINLEITUNG

VON DER SEITENKETTE ZU MULTIMOLEKULAREN SIGNALLEITUNGSKOMPLEXEN – EIN HISTORISCHER ÜBERBLICK ÜBER DIE B-ZELL-IMMUNOLOGIE

Antikörper – von der Entdeckung bis zur Strukturaufklärung

Im Jahre 1890 beschrieben Emil von Behring und Shibasaburo Kitasato, damals Mitarbeiter von Geheimrat Robert Koch in Berlin, die Beobachtung, daß das Serum von Kaninchen, die gegen Tetanus immunisiert worden waren, imstande ist das Toxin dieser Bakterien zu neutralisieren¹. Das neutralisierende Agens im Serum immunisierter Tiere wurde Antikörper genannt, da es eine Einheit (einen Körper) darstellt, die gegen (anti) eine körperfremde Substanz (ein Antigen) gerichtet ist. Diese Entdeckung, für die von Behring 1901 der erste Nobelpreis für Medizin verliehen wurde, bereitete in der medizinischen Praxis den Weg zur Prävention und Behandlung von infektiösen Erkrankungen durch Transfer von (Anti-) Serum. Die Bildung der Antikörper sowie die Entstehung ihrer Vielfalt blieb jedoch für viele Generationen ein unverständenes Phänomen. Bereits 1897, wenige Jahre nach ihrer Entdeckung, veröffentlichte Paul Ehrlich ein richtungsweisendes Konzept zur Entstehung von Antikörpern, die Seitenketten-Theorie, nach der Antigene durch Bindung an körpereigene Zelloberflächenrezeptoren (Seitenketten) die Produktion von löslichen Seitenketten (Antikörpern) auslösen² (Abb. 1). Die chemische Natur der Antikörper war zu jener Zeit weder bekannt, noch hatte man Vorstellungen davon wie biologische Makromoleküle überhaupt entstehen. Wie nah Ehrlich dennoch mit seiner – zu damaliger Zeit allerdings keinesfalls allgemein akzeptierten – Theorie an der Wirklichkeit lag, sollte sich jedoch erst viele Jahrzehnte später herausstellen.

Gegen Ende der 1930er Jahre stellte sich heraus, daß Antikörper Proteine sind und zur Klasse der Globuline gehören³, der Begriff Immunglobulin (Ig) für alle Globuline mit Antikörper-Aktivität wurde etwa 20 Jahre später eingeführt. 1961 konnte im Labor von Gerald Edelman erstmals gezeigt werden, daß Antikörper aus leichten und schweren Polypeptidketten mit Molekulargewichten von 20.000, bzw. 50.000 bestehen, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind⁴. Kurze Zeit später formulierte Rodney Porter als erster das richtige Modell für die Struktur eines Antikörpermoleküls, bestehend aus zwei über Disulfidbrücken miteinander verbundenen schweren (H) Ketten, die jeweils mit einer leichten (L) Kette disulfidverbrückt sind⁵. H- und L-Ketten bilden je zwei Antigenbindungsstellen, die miteinander verbundenen schweren Ketten vermitteln unterschiedliche biologische

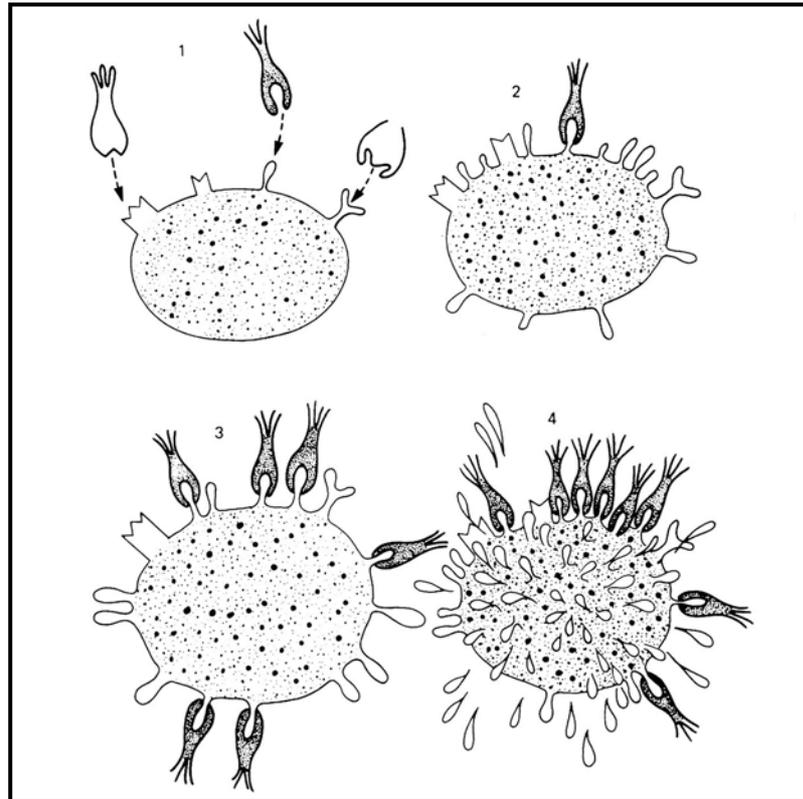


Abb.1: Paul Ehrlichs Seitenkettentheorie der Antikörperentstehung von 1900^{2,6}. Eine Zelle mit Oberflächenrezeptoren unterschiedlicher Spezifitäten (durch unterschiedliche Formen angedeutet) wird durch Antigenbindung zur Produktion von löslichen Rezeptoren (Antikörpern) angeregt. Mit der Ausnahme, daß B-Lymphocyten jeweils Antigenrezeptoren mit nur einer Spezifität exprimieren, unterscheidet sich dieses Modell kaum von heutigen Vorstellungen.

Funktionen (Abb. 2). Die Aufklärung der Aminosäuresequenzen vieler verschiedener Antikörper, die in den Labors von Edelman und Porter sowie vieler anderer vorangetrieben wurde, führte zur Entdeckung der zwei unterschiedlichen L-Ig-Ketten, κ und λ , sowie der fünf verschiedenen Isotypen von H-Ig-Ketten zwischen denen man heutzutage unterscheidet und von denen letztere sich in ihren biologischen Funktionen unterscheiden: IgG, bestehend aus zwei γ -H-Ketten, die mit zwei κ - oder λ -L-Ketten paaren, mit der stöchiometrischen Zusammensetzung $H\gamma_2L_2$ stellt den Hauptanteil an Serumimmunglobulinen dar. Pentameres IgM mit μ -Ketten wird zu Beginn einer Antikörper-Antwort gebildet; IgA mit α -Ketten, das durch Epithelien transportiert werden kann; IgE mit ϵ -Ketten, das eine Rolle bei allergischen Reaktionen spielt, sowie IgD mit δ -Ketten, das hauptsächlich als membranständiges Ig als

Teil des B-Zell-Antigenrezeptors vorliegt. 1969 schließlich gelang es Edelman die vollständige Aminosäuresequenz eines Ig-Moleküls zu entschlüsseln. Intensive Vergleiche vieler sequenzierter Antikörpermoleküle führten zur Entdeckung variabler Ig-Domänen mit „hypervariablen Bereichen“. Dies ließ vermuten, daß die hypervariablen Regionen die spezifische Bindungsstelle eines Antikörpers darstellen. Die Bestätigung dieser Annahme erfolgte kurze Zeit später durch die erstmalige röntgenkristallographische Darstellung der dreidimensionalen Struktur eines Komplexes aus Antigenbindungsstelle und eines Antigens⁷. Es bewahrheitete sich die Hypothese Paul Ehrlich's, der sich die Antigen-Antikörper-Bindung als Interaktion chemisch definierter komplementärer molekularer Strukturen vorstellte und darin den Grund für die Spezifität von Antikörpern sah. Für ihre Beiträge zur Strukturaufklärung von Antikörpern wurde Edelman und Porter 1972 der Nobelpreis für Medizin verliehen.

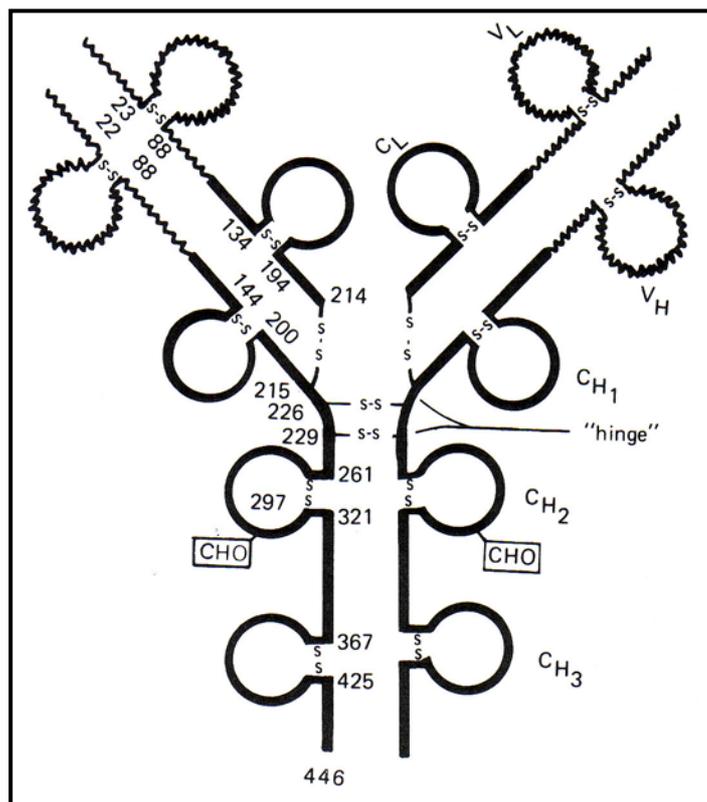


Abb.2: Antikörpermodell von Gerald Edelman von 1970⁸. Die durch Disulfidbrücken (S-S) stabilisierten Immunglobulindomänen schwerer (VH, CH1-CH3) und leichter Ketten (VL, CL) sind als Kreise, variable Domänen (VH, VL) durch gewellte Linien dargestellt. CHO: Glykosylierung

Lymphocyten – klonale Selektion durch Aktivierung von Antigenrezeptoren

Paul Ehrlich's Theorie, daß Antigen-spezifische Antikörper in membrangebundener Form bereits vor dem ersten Kontakt mit dem entsprechenden Antigen im Körper existieren, und die gesteigerte Produktion löslicher Antikörper durch das Antigen ausgelöst wird, wurde Mitte der 1950er Jahre von Nils Jerne neu formuliert und von Frank Macfarlane Burnett, Joshua Lederberg und Maurice Talmage einige Jahre später um die Theorie der „klonalen Selektion“ erweitert⁹⁻¹¹. Das Prinzip der klonalen Selektion geht davon aus, daß nicht nur einzelne lymphoide Zellen mit spezifischen Antigenrezeptoren, sondern Klone dieser Zellen existieren. Die Interaktion eines Antigens mit Antigenrezeptoren auf lymphoiden Zellen würde, so Burnets Annahme, durch einen unbekanntem Mechanismus deren Proliferation und Differenzierung zur Antikörperproduktion auslösen. Alle Tochterzellen würden demzufolge identische Antigenrezeptoren besitzen und identische immunologische Reaktionen ausführen. Joshua Lederberg befasste sich zur gleichen Zeit mit der Frage der praktisch unbegrenzten Variabilität von Antikörpern. Er schlug vor, daß sich während des gesamten Lebens eines Individuums in den Vorläufern der späteren Antikörper-produzierenden Zellen eine große Anzahl an spontanen und zufälligen Mutationen ereignet, die die Diversität der Antikörper-codierenden Gene bewirken. Die „neuen alten“ Ideen von Jerne und Burnett lösten das rund 50 Jahre vorherrschende Instruktionsprinzip ab, wonach Antigene Antikörpern ein komplementäres Abbild ihrer eigenen Struktur einprägen und so deren Spezifität hervorrufen. Burnett wurde 1960 u.a. für seine theoretischen Arbeiten mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet. Die exakte Natur der antikörperproduzierenden lymphoiden Zelle war zu jener Zeit noch nicht bekannt, die Aufklärung dieses Rätsels wurde jedoch ebenfalls u.a. von Burnett eingeleitet, der 1962 zusammen mit Warner und Szenberg als erster zwei Klassen von Lymphocyten in Vögeln beschrieb¹². Eine Klasse war Thymus-abhängig und kontrollierte zell-vermittelte Immunreaktionen, die andere war abhängig von einem Organ, dessen Existenz sich auf Vögel beschränkt und den Namen Bursa fabricius trägt, und die Entwicklung von Antikörper-produzierenden Zellen ermöglicht. Das Konzept zweier unterschiedlicher Lymphocyten-Linien fand allerdings erst größere Beachtung als die Dichotomie auch in Säugetieren evident wurde^{13,14}. 1969 wurde die Nomenklatur „T-Zellen“ für im Thymus heranreifende Lymphocyten sowie „B-Zellen“ für Bursa-äquivalente Zellen eingeführt, die sich bei Säugetieren im Knochenmark entwickeln¹⁵. Die Rolle der dem Knochenmark entstammenden B-Lymphocyten bei der Produktion von Antikörpern in Säugetieren wurde in einer Reihe von Experimenten von Miller und Mitchell et al. demonstriert^{16,17}. Sie konnten zeigen, daß Antikörper-produzierende Zellen sich mit Hilfe

aktivierter T-Zellen aus B-Zellen entwickeln. In etwa zur gleichen Zeit zeigte sich durch die Arbeit vieler Labors und mittels unterschiedlicher Techniken, daß Lymphocyten Immunglobuline auf ihrer Zelloberfläche exprimieren¹⁸. Diese wurden bald als Antigenbindende Rezeptoren angesehen und experimentelle Daten stützten die Hypothese, daß die Rezeptor-Antigen-Interaktion – so wie von Ehrlich und Burnett postuliert – eine zelluläre Reaktion auslöst, die eine Immunantwort einleitet und zur Produktion löslicher Immunglobuline derselben Spezifität wie die der membrangebundenen führt¹⁹.

Antigenrezeptoren auf Lymphocyten – Seitenketten sind multi-Protein-Komplexe

Bald nach Entdeckung der membranständigen Immunglobuline (mIg) wurden Unterschiede zwischen denen auf B-Zellen und solchen auf T-Zellen offenbar. Während es sich bei B-Zell Antigenrezeptoren (BCR) offensichtlich um vollständige Ig-Moleküle handelte, schienen T-Zell Antigenrezeptoren (TCR) trunkierte Ig-Moleküle ohne sog. Fc-Teil zu enthalten, die später TCR- α - und - β -Ketten genannt wurden. Die Untersuchung von mIg-Molekülen ergab, daß sie nur sehr kurze intrazelluläre Peptidmotive besitzen, im Fall von mIgM und mIgD nur drei Aminosäuren²⁰. Dies wurde als viel zu kurz angesehen um mit intrazellulären Proteinen kommunizieren, respektive interagieren zu können, um Information vom Extrazellularraum ins Cytoplasma zu transportieren. Eine Lösung für dieses Problem brachte die Entdeckung von TCR-assoziierten Transmembranproteinen, die erst als T3-, später als CD3-Komplex zusammengefaßt wurden^{21,22}. Die CD3-Komponenten γ, δ, ϵ und ζ besitzen neben extrazellulären Domänen unterschiedlicher Art allesamt intrazelluläre Anteile, die deutlich länger sind als die der antigenbindenden Proteine. Der gesamte Komplex aus antigenbindenden TCR- α und - β Ketten und CD3-Komponenten wurde fortan als TCR bezeichnet. Kurze Zeit später wurden in den Labors von Michael Reth und John Cambier analoge Proteine in B-Zellen beschrieben. Diese wurden Ig- α (alternativ CD79a, Genprodukt des Gens mb-1) und Ig- β (CD79b, Genprodukt des Gens B29) genannt, besitzen ebenfalls intrazelluläre Domänen und sind genau wie die CD3 Komponenten nicht-kovalent mit den antigenbindenden mIg-Molekülen assoziiert²³⁻²⁸. Es zeigte sich, daß Ig- α und Ig- β als disulphidverbrücktes Heterodimer mit allen mIg-Isotypen assoziieren, und daß der BCR-Komplex aus mIg, Ig- α und Ig- β nur als Ganzes auf der Zelloberfläche exprimiert werden kann²⁰. Entsprechendes gilt auch für den TCR. Nach Aufklärung der molekularen Zusammensetzung des BCRs wurde ein symmetrisches Modell mit je zwei Ig- α /Ig- β Heterodimeren, die ein mIg-Molekül flankieren, angenommen und für die kommenden 10 Jahre allgemein akzeptiert (Abb. 3a).

Dieses Modell hatte Bestand, da man annahm, daß polare Aminosäurereste der zwei mIg-Transmembrandomänen durch die Transmembrandomänen des Ig- α /Ig- β Dimers vom unpolaren Milieu der Plasmamembran abgeschirmt würden²⁰. Allerdings wurde die exakte Stöchiometrie experimentell nicht bestimmt bis schließlich 2000 demonstriert wurde, daß nur je *ein* Ig- α /Ig- β Dimer mit *einem* mIg-Molekül assoziiert vorliegt, und daß BCRs der Zusammensetzung [IgH+L]₂[Ig α + β]₁ möglicherweise noch höher strukturierte, i.e. oligomere Einheiten in der Plasmamembran bilden (Abb. 3b)²⁹. Kurz nach der Identifizierung von Ig- α und Ig- β wurden Unterschiede zwischen BCRs auf reifen B-Zellen und sich entwickelnden B-Zellen im Knochenmark entdeckt. Sog. Prä-B-Zellen des Knochenmarks exprimieren anstelle einer IgL-Kette zwei Proteine, VpreB und λ 5, die an μ - schwere Ketten binden und zusammen als eine Ersatz-L-Kette fungieren³⁰. Diesen Komplex bezeichnet man, da er nur auf prä-B-Zellen zu finden ist als prä-BCR. VpreB und λ 5 werden nach erfolgreichem Rearrangement der die leichten Ketten codierenden Gene durch eine κ - oder λ - leichte Kette ersetzt³¹⁻³⁴. Als Ausnahme von dieser Regel wurde erst kürzlich eine Population von prä-B-Zellen in der Maus identifiziert, die zwar μ -Ketten aber weder VpreB noch λ 5 exprimieren³⁵. In Analogie zu B-Zellen exprimieren sich entwickelnde prä-T-Zellen im Thymus einen sog. prä-TCR, bei dem die TCR- α -Kette des reifen TCRs durch das Transmembranprotein prä-T- α ersetzt ist.

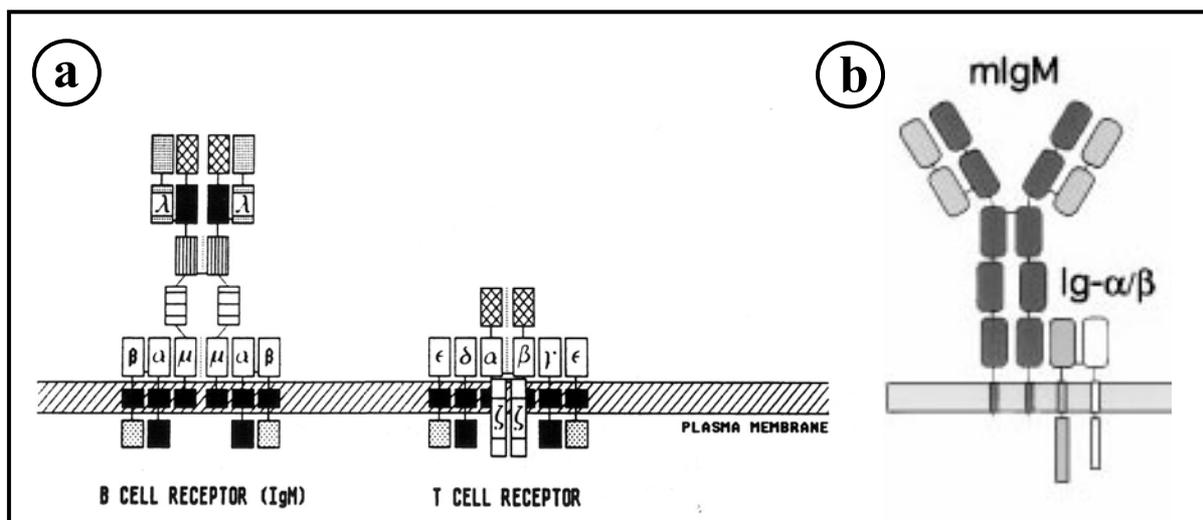


Abb.3: Modell des BCRs und TCRs von M. Reth von 1992²⁰ (a) und 2000²⁹ (b). Der in den 1990er Jahren vermutete symmetrische Aufbau von Antigenrezeptoren konnte 2000 für den BCR widerlegt werden²⁹.

Das ITAM

Einige intrazelluläre biochemische Prozesse, die in Lymphocyten durch Stimulation von Antigenrezeptoren ausgelöst werden, wurden bereits in den 1980er Jahren, vor Entdeckung der signalleitenden Komponenten, beschrieben³⁶⁻⁴⁷. Zur gleichen Zeit wurde eine Vielzahl von Genen identifiziert, die während der Aktivierung von Lymphocyten aktiviert werden⁴⁸. Der Mechanismus jedoch, der die Ereignisse an der Plasmamembran mit denen im Zellkern verknüpft, blieb mehr oder weniger unbekannt und wurde noch 1990 als „missing link“ bezeichnet⁴⁸.

1989 beschrieb Michael Reth ein Peptidsequenz-Motiv innerhalb der cytoplasmatischen Domänen der Signalleitungskomponenten des TCRs, BCRs und des Fc-ε-Rezeptors, bestehend aus einigen sauren und aliphatischen Aminosäureresten sowie zwei konservierten Tyrosinresten, die sich in einem exakt definierten Abstand zueinander befinden⁴⁹ (Abb. 4). Dieses Peptidmotiv mit der Konsensussequenz D/Ex₇D/ExxYxxI/Lx₇YxxI/L (im Ein-Buchstaben-Code für Aminosäuren, wobei x eine beliebige Aminosäure darstellt) erwies sich nach anfänglichen Zweifeln als das zentrale signalgebende Motiv vieler Immunrezeptoren und bekam daher den Namen *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif* (ITAM)⁵⁰.

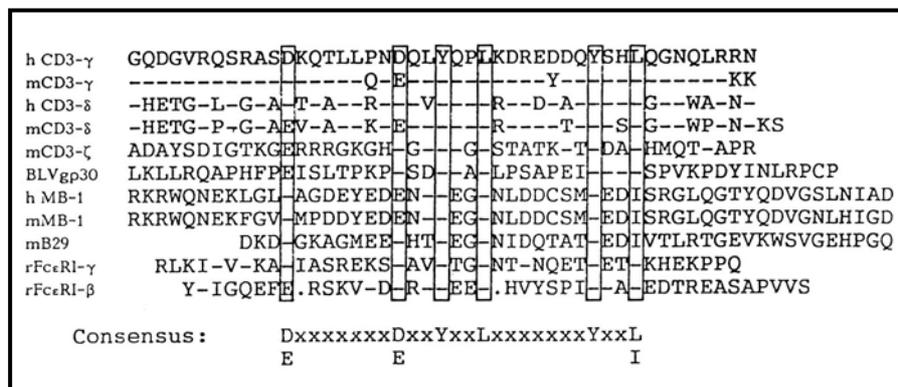


Abb.4: Sequenzvergleich der cytoplasmatischen Aminosäuren signalleitender Komponenten verschiedener Immunrezeptoren von M. Reth von 1989⁴⁹. Das später als ITAM bezeichnete Motiv ist als Konsensussequenz angegeben.

Ein ITAM umfaßt gerade einmal 26 Aminosäuren, von denen lediglich sechs konserviert sind. Ob ITAMs definierte Sekundärstrukturen ausbilden können ist nicht bekannt. Diese unbeantwortete Frage nährte die anfängliche Skepsis am Konzept der ITAMs. Einige Kritiker hatten Schwierigkeiten sich mit der Idee anzufreunden, wonach ITAMs Bindestellen für die

damals noch unbekannt Proteine darstellen sollten, die das Signal zur Aktivierung und Differenzierung von T- und B-Zellen generieren⁴⁹. Diese Annahme fand jedoch bald Bestätigung durch Experimente mit chimären Rezeptormolekülen im Labor von Arthur Weiss⁵¹. Ferner trug die Entdeckung lymphocytärer cytoplasmatischer Protein Tyrosin Kinasen (PTKs) sowie die Identifizierung der Funktion sog. Src-Homologie (SH) 2-Domänen zur Akzeptanz des ITAM-Konzepts bei. SH2-Domänen wurden erstmals 1986 als ca. 100 Aminosäuren umfassende nicht-katalytische Domänen von PTKs der Src-Familie beschrieben und man vermutete, daß sie regulatorische Funktionen erfüllen⁵². Anfang der 90er Jahre kristallisierte sich heraus, daß SH2-Domänen, die mittlerweile als Teil vieler weiterer Proteine identifiziert worden waren, Interaktionsdomänen sind, die an phosphorylierte Tyrosinreste binden können⁵³⁻⁵⁷. Viele darauffolgende Untersuchungen erbrachten, daß SH2-Domänen unterschiedlicher Proteine mit unterschiedlicher Spezifität und Affinität an unterschiedliche Phosphopeptide binden^{58,59}. Die Spezifität einer SH2-Domänen – Phosphopeptid Interaktion erwies sich als abhängig von den das Phospho-Tyrosin flankierenden Resten, besonders jene an Position +3 vom Tyrosin stellten sich als besonders wichtig heraus⁶⁰. Aufgrund ihrer Spezifität und struktureller Eigenschaften kann man SH2-Domänen heute in verschiedene Familien einteilen⁶¹. Die Funktion der einzelnen Aminosäuren des ITAMs wurde bald nach ihrer Entdeckung durch die Arbeiten vieler Labors detailliert geklärt und es stellte sich heraus, daß die beiden Tyrosinreste essentiell für die signalgebende Funktion von Antigenrezeptoren sind⁶²⁻⁶⁵. Damit war auch klar, daß PTKs eine entscheidende Rolle bei der Signalinitiation spielen und nicht heterotrimere G-Proteine, die anfänglich von einigen Fachleuten favorisiert worden waren^{66,67}. Mit der Entdeckung des ITAMs und der lymphocytenspezifischen PTKs wurde das Tor für eine „neue Disziplin“ der Immunologie, die Antigenrezeptor-induzierte Signaltransduktion, aufgestoßen.

Cytoplasmatische Protein-Tyrosin-Kinasen in Lymphocyten

Die initiale Beobachtung, daß die T-Zell Co-Rezeptormoleküle CD4 und CD8 mit der Src-Familien-PTK Lck interagieren⁶⁸⁻⁷⁰ führte zu weiteren Untersuchungen, die zeigten, daß auch TCR und BCR mit teils Lymphocytenspezifischen, teils ubiquitär exprimierten Src-Kinasen assoziieren⁷¹⁻⁷⁴. T-Zellen exprimieren neben Lck auch Fyn und Yes^{71,75}, in B-Zellen stellten sich Lyn, Blk und Fyn als besonders prominent heraus^{76,77}. Src-PTKs besitzen eine charakteristische Struktur mit einer nicht konservierten N-terminalen Region, gefolgt von je einer SH2-, SH3- und katalytischen Domäne, sowie einem regulatorischen C-terminalen Tyrosinrest (Abb. 5). Sie werden über eine N-terminale Verknüpfung mit Myristyl-

Fettsäureresten in der Plasmamembran verankert. Biochemische Arbeiten demonstrierten, daß Src-PTKs schon in ruhenden Zellen mit BCR-, resp. TCR-Komponenten interagieren⁷⁸⁻⁸¹. Die Variante einer humanen T-Zelllinie, die defizient für Lck ist (JCaM1), zeigt keine intrazellulären Signale nach TCR-Stimulation⁸². Ähnlich verhält es sich mit einem Abkömmling der B-Zelllinie DT40 aus dem Huhn, der defizient für Lyn ist und keine anderen Src-PTKs exprimiert⁸³. Auf diesen und anderen Daten basiert die Vorstellung, daß Src-PTKs die ersten, Rezeptor-proximalen Kinasen sind, die nach BCR- oder TCR-Stimulation aktiviert werden und nachfolgende Signalleitungsereignisse initiieren. Die spätestens seit Mitte der 1990er Jahre routinemäßig angewendete Technik der gezielten Gen-Inaktivierung mittels homologer Rekombination revolutionierte (nicht nur) die Forschung auf dem Gebiet der Signaltransduktion in Lymphocyten. Mutationsanalysen in Mäusen und Zelllinien, die defizient für die jeweiligen Proteine gemacht wurden, brachten schnell die Bedeutung der PTKs für die Initiation der BCR- und TCR-vermittelten Signalleitung ans Licht^{84,85}. Ein weiterer experimenteller Meilenstein war die Herstellung von Phospho-Tyrosin-spezifischen Antikörpern. Mit diesem biochemischen Werkzeug war es fortan möglich, Protein-Tyrosinphosphorylierungen schnell und einfach nachzuweisen und von Phosphorylierungen an Serin- oder Threoninresten zu unterscheiden.

1991, zwei Jahre nachdem Michael Reth das ITAM vorgestellt hatte, wurde eine B-Zell-spezifische PTK beschrieben, die neben einer katalytischen Domäne zwei N-terminale SH2-Domänen enthält und den Namen Syk (*spleen tyrosine kinase*) bekam⁸⁶⁻⁸⁸. Zur gleichen Zeit wurde ein analoges Protein mit identischem Aufbau in T-Zellen beschrieben und ZAP-70 (*zeta-associated protein of 70 kD*) genannt^{89,90}. ZAP-70, wie der Name andeutet, interagiert mit der TCR- ζ -Kette und schnell wurde klar, daß diese Interaktion über die zwei Tandemartig angeordneten SH2-Domänen auf der einen Seite, sowie den phosphorylierten ITAM-Tyrosinresten auf der anderen Seite vermittelt wird⁹¹⁻⁹⁴. Ein entsprechender Mechanismus wurde ebenfalls für die Interaktion zwischen Syk und Ig- α /Ig- β gefunden^{73,92,95-98}. Die SH2-Domänen vermittelte Bindung der PTKs der Src- und Syk-Familie führt nicht nur zur Assoziation mit dem aktivierten Rezeptor, sie steigert auch die katalytische Aktivität der Kinasen mittels eines allosterischen Regulationsmechanismus⁹⁹⁻¹⁰⁶. In ruhenden Lymphocyten befinden sich die genannten PTKs in einer auto-inhibitorischen Konformation, die nach Bindung der SH2-Domänen an Phospho-Liganden in eine offene, katalytisch aktive Konformation übergeht. Dennoch scheinen auch in Abwesenheit eines Stimulus PTKs und einige ihrer Substrate in präformierten Komplexen vorzuliegen¹⁰⁷. Diese spielen möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Vermittlung liganden-unabhängiger BCR-

Signale, die sowohl für die Entwicklung von prä-B-Zellen im Knochenmark als auch für das Überleben reifer Zellen in der Peripherie von entscheidender Bedeutung sind¹⁰⁸⁻¹¹⁰ (s.u.).

1952 beschrieb der amerikanische Militärkinderarzt Col. Ogden Bruton das Krankheitsbild einer Immundefizienz, die durch das komplette Fehlen von Serum-Antikörpern gekennzeichnet ist¹¹¹. Später stellte sich heraus, daß die Abwesenheit von Antikörpern im Blut der Patienten aus dem Fehlen von B-Zellen resultiert. Diese als erste beschriebene Immundefizienz des Menschen bekam den Namen Morbus Bruton oder *X-linked agammaglobulinemia* (XLA). Mit der Identifizierung des Gens, welches bei Patienten mit XLA betroffen ist im Jahr 1993, wurde offensichtlich, daß eine weitere Klasse von PTKs die Entwicklung und Aktivierung von B-Zellen kontrolliert^{112,113}. Bei dem Genprodukt des XLA-Gens handelt es sich um eine PTK mit ähnlicher Domänenstruktur wie die der Src-Kinasen, mit dem Unterschied, daß sie weder über Fettsäure-Modifikation mit der Plasmamembran interagiert, noch einen regulatorischen C-terminalen Tyrosinrest aufweist. Ein weiterer Unterschied besteht in der Anwesenheit einer Pleckstrin-Homologie (PH) und einer Tec-Homologie (TH) Domäne. Die neue PTK bekam den Namen Btk für *Bruton's tyrosin kinase*. Ein analoges Protein aus T-Zellen wurde in etwa zur gleichen Zeit entdeckt und Itk (*Interleukin 2 inducible T cell kinase*) getauft^{114,115}. Aufgrund ihrer Unterschiede zu Src-Kinasen wurden sie in die neue Familie der Tec-PTKs (nach dem Prototypen dieser Familie, Tec) eingeordnet. ITAM-enhaltende Immunrezeptoren aktivieren also drei unterschiedliche Klassen von cytoplasmatischen PTKs, die eine Vielzahl von Substrat-Proteinen, darunter sie selbst, phosphorylieren und dadurch meist aktivieren.

Lipid-modifizierende Enzyme

Zu den PTK-regulierten Effektormolekülen gehören u.a. die Lipid-modifizierenden Enzyme Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI3K) sowie Phospholipase C-gamma (PLC- γ). Die PI3K phosphoryliert Plasmamembran-Lipide an 3'-Position. Handelt es sich beim Substrat um Phosphatidyl-Inositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), so entsteht das Produkt Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃), das als Bindepartner für PH-Domänen fungiert und dadurch die Membranassoziation PH-Domänen enthaltender Proteine ermöglicht. PIP₂ stellt auch das Substrat für die PLC- γ dar, die durch dessen Spaltung die intrazellulären Botenstoffe Diacylglycerol (DAG) und Inositol-3'-Phosphat (IP₃) generiert. DAG verbleibt in der Plasmamembran, IP₃ hingegen diffundiert ins Cytosol und löst durch Bindung an IP₃-Rezeptoren, die sich in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) befinden, die Öffnung von Ca²⁺-Kanälen in der ER-Membran aus, was zu einem schlagartigen Anstieg der

intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt, der, langsam absinkend, mehrere Minuten andauern kann. Dieser Effekt wurde bereits in den 1980er Jahren vor der Identifizierung der beteiligten Enzyme als Folge der Stimulation von Antigenrezeptoren beschrieben^{39,42,44}. Ein erhöhter Ca^{2+} -Spiegel ist Voraussetzung für viele intrazelluläre Signalleitungsprozesse und nachfolgende Aktivierung diverser Gene¹¹⁶. Die Phosphorylierung von PLC- γ an Tyrosinresten und ihre damit einhergehende Aktivierung wurde erstmals in Fibroblasten nach Behandlung mit EGF (*epidermal growth factor*)¹¹⁷⁻¹²¹ oder PDGF (*platelet-derived growth factor*)¹²²⁻¹²⁴ demonstriert. Desweiteren interagiert PLC- γ mittels ihrer beiden SH2-Domänen mit den phosphorylierten EGF- und PDGF-Rezeptortyrosinkinasen^{53,55}. Es dauerte nicht lange bis in verschiedenen Labors die Phosphorylierung einer Isoform, PLC- γ 2, in BCR-stimulierten B-Zellen demonstriert werden konnte¹²⁵. Gen-Inaktivierungsexperimente in Zelllinien bestätigten die essentielle Funktion der PLC- γ 2 für die Mobilisierung von Ca^{2+} und damit die Aktivierung von B-Zellen¹²⁶.

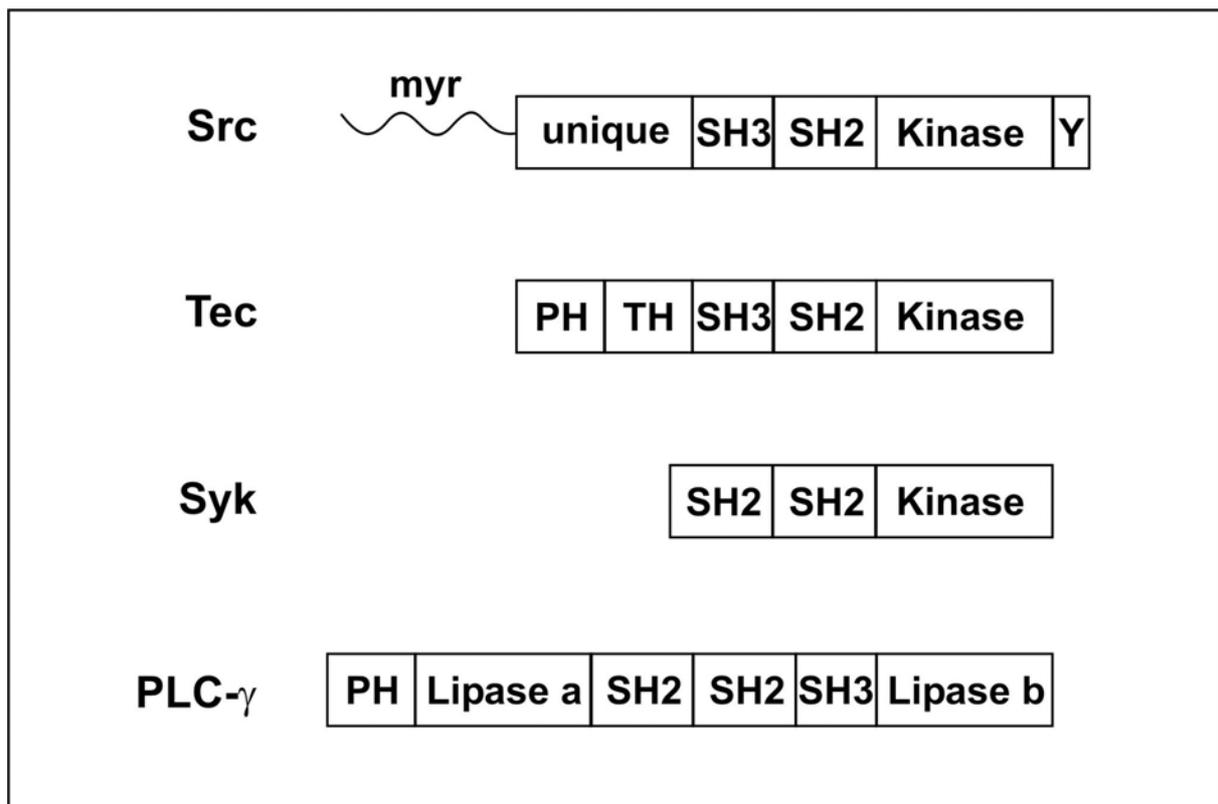


Abb.5: Domänenstruktur cytoplasmatischer Protein-Tyrosin-Kinasen und der PLC- γ . SH: Src-homology, PH: Pleckstrin-homology, TH: Tec-homology, myr: Myristoilierung, Y: regulatorischer Tyrosinrest

Adapterproteine – die Entdeckung multimolekularer Signalleitungskomplexe

1988 beschrieben H. Hanafusa und Kollegen ein Onkogen des Vogelvirus CT10, dessen Produkt bekannte nicht-katalytische (SH2- und SH3-) Domänen enthielt, dem jedoch jegliche katalytischen Domänen fehlten. Trotzdem war dieses Protein in der Lage zelluläre PTKs zu aktivieren und bekam daher den Namen Crk (für *CT10 regulator of kinase*)¹²⁷. Das erste Adapterprotein war gefunden. In der Folge wurden zahllose solcher Proteine, die in die unterschiedlichsten Signalkaskaden involviert sind, identifiziert und intensiv untersucht. Allen Adapterproteinen ist das Vorhandensein von Protein-Protein-Interaktionsdomänen oder Interaktionsmotiven gemein und ihre Expression beschränkt sich keinesfalls auf das hämatopoetische System. Die in hämatopoetischen Zellen und besonders in Lymphocyten exprimierten Adapterproteine können allerdings als die derzeit am besten untersuchten betrachtet werden. Ein Merkmal vieler spezifisch in Lymphocyten exprimierter Adapterproteine sind das Vorhandensein von Konsensus-Tyrosinphosphorylierungsmotiven und/oder Prolin-reichen Sequenzen, sowie von Domänen, die an diese Motive binden können, i.e. SH2-Domänen, Phospho-Tyrosin-Bindungs- (PTB-) Domänen oder SH3-Domänen. Desweiteren finden sich PH-Domänen, die hauptsächlich an phosphorylierte Lipide binden und somit der Membranrekrutierung cytosolischer Proteine dienen, oder WW-Domänen, die ebenfalls an Prolin-reiche Peptidmotive binden können. 1995 beschrieb das Labor von Gary Koretzky ein Adapterprotein, dessen Expression sich auf T-Zellen, sowie einige myeloide Zellen beschränkt. Dieses Protein, SLP-76 (*SH2-domain containing leukocyte protein of 76 kDa*), enthält zahlreiche Tyrosinphosphorylierungsmotive, Prolin-reiche Sequenzbereiche sowie eine C-terminale SH2-Domäne^{128,129}. Kurze Zeit später wurde im Labor von Larry Samelson das erste transmembranständige Adapterprotein, LAT (*linker for activation of T cells*), als ein T-Zell spezifisches Genprodukt identifiziert¹³⁰. Beide Proteine, SLP-76 und LAT erwiesen sich, wie durch Gen-Inaktivierungsexperimente gezeigt wurde, als essentiell sowohl für die Entwicklung von Thymocyten in der Maus, als auch für die Mobilisierung von intrazellulärem Calcium in Zelllinien¹³¹⁻¹³⁴. Es stellte sich heraus, daß beide Proteine über ein weiteres Adapterprotein, Gads, miteinander interagieren und gemeinsam an der Aktivierung von PLC- γ beteiligt sind¹³⁵⁻¹³⁸. Fehlt eines der genannten Adapterproteine unterbleibt die Aktivierung der PLC- γ und der cytosolische Ca²⁺-Anstieg nach TCR-Stimulation bleibt aus. Die Anwesenheit von Adapterproteinen erwies sich also als essentiell für die Aktivierung eines cytosolischen Enzyms und daraus wurde ersichtlich, daß die Formierung von multimolekularen Komplexen aus unterschiedlichen Enzymenklassen wie PTKs und der PLC- γ sowie die Relokalisation von cytosolischen Proteinen in die Nähe des aktivierten

Antigenrezeptors, i.e. zur Plasmamembran, von Adapterproteinen vermittelt wird. Etwas später wurden analoge Proteine in B-Zellen beschrieben: SLP-65 (auch BLNK (*B-cell linker*) oder BASH (*B-cell adapter containing a SH2 domain*) genannt) ist eines der Haupt-PTK-Substrate in B-Zellen und wurde 1998 von unserem Labor u.a. beschrieben¹³⁹⁻¹⁴¹. Wie SLP-76 besitzt es diverse Konsensus-Tyrosinphosphorylierungsmotive, Prolin-reiche Abschnitte und eine C-terminale SH2-Domäne. Seine Expression ist restringiert auf B-Zellen und Makrophagen¹⁴² und wie SLP-76 in T-Zellen spielt auch SLP-65 eine entscheidende Rolle bei der BCR-induzierten Aktivierung der PLC- γ . Im phosphorylierten Zustand bietet SLP-65 Bindestellen für die SH2-Domänen von PLC- γ 2 sowie Btk¹⁴³⁻¹⁴⁵. Dies ermöglicht die für ihre Aktivierung essentielle duale Phosphorylierung der PLC- γ durch Btk und Syk^{146,147}. Über welchen Mechanismus der phospho-SLP-65/Btk/PLC- γ -Komplex zum aktivierten Rezeptor und damit zur aktivierten PTK Syk rekrutiert wird ist im Gegensatz zur Situation in T-Zellen nach wie vor nicht geklärt. Allerdings scheint ein kürzlich identifiziertes Pendant zu LAT, NTAL (*non T-cell activation linker*)¹⁴⁸ oder LAB (*linker for activation of B-cells*)¹⁴⁹ an diesem Vorgang nicht beteiligt zu sein¹⁵⁰. Eine unerwartete Rolle scheint der SLP-65/Btk-Komplex für die Limitierung der Expansion der prä-B-Zell-Population im Knochenmark zu spielen. Die Abwesenheit von SLP-65 und/oder Btk im Mausmodell führt zu einer hohen Rate von prä-B-Zell-Tumoren^{151,152}. Auch bei Patienten mit prä-B-Zell-Leukämien konnte mit großer Häufigkeit das Fehlen von SLP-65 festgestellt werden¹⁵³. Die zugrundeliegenden Signale, die für die Tumorsuppressor-Aktivität von SLP-65 und Btk verantwortlich sind, sind nicht bekannt. Die katalytische Aktivität von Btk scheint für diesen Effekt nicht notwendig zu sein¹⁵⁴, wohl aber die Membranrekrutierung von SLP-65 (M. Reth et al., unveröffentlicht). In der vorliegenden Arbeit wurde eine mögliche Rolle der SH2-Domäne von SLP-65 bei dessen Membranrekrutierung untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß die SH2-Domäne an ein bis dato unbekanntes, außerhalb des Ig- α -ITAMs gelegenes, Tyrosinphosphorylierungsmotiv bindet. Dieses Tyrosinphosphorylierungsmotiv mit der Sequenz YQDV ist evolutionär konserviert und interagiert im phosphorylierten Zustand spezifisch mit SLP-65¹⁵⁵. Eine Funktion dieser hier beschriebenen Interaktion für die Initiation von BCR-vermittelten Signalen ist unklar, wird aber diskutiert^{156,157}.

Die SH2-Domäne von SLP-76 wurde in Gary Koretzkys Labor für die Affinitätsreinigung eines 130 kD Phosphoproteins aus T-Zellen eingesetzt. Das isolierte Protein bekam den Namen SLAP-130 (*SLP-76 associated protein of 130 kD*)¹⁵⁸, und, da es zur gleichen Zeit im Labor von Chris Rudd identifiziert wurde, Fyb (*Fyn-binding protein*)¹⁵⁹, wurde später aber in ADAP (*Adhesion and Degranulation promoting Adapter Protein*) umbenannt, obwohl es

neueren Erkenntnissen zufolge nicht an der Degranulation von Mastzellen beteiligt ist¹⁶⁰. ADAP wird in T-Zellen und vielen anderen hämatopoetischen Zellen mit Ausnahme von B-Zellen und Erythrocyten exprimiert. Zwei Isoformen, p130 und p120, wurden beschrieben, die durch alternatives Spleißen entstehen¹⁶¹. Funktionelle Unterschiede der beiden Isoformen wurden bisher nicht beobachtet. ADAP enthält mehrere Tyrosinphosphorylierungsmotive der Konsensussequenz YDDV, bzw. YEDV, die als Bindestellen für SLP-SH2-Domänen fungieren. Ferner assoziiert es mit der Src-PTK Fyn über dessen SH2-Domäne¹⁵⁹. Neben einigen Prolin-reichen Abschnitten enthält ADAP eine C-terminale SH3-Domäne, über die es mit Proteinen der SKAP- (*Src-kinase associated phosphoprotein*) Familie, SKAP55 und SKAP-HOM, interagieren kann¹⁶². SH3-Domänen wurden wie SH2-Domänen erstmalig in Src-PTKs entdeckt und sind ~60 Aminosäuren umfassende Interaktionsdomänen, die mit Prolin-reichen Peptidsequenzen interagieren können. Auch bei ihnen wird die Spezifität durch die umgebenden Aminosäuren des Bindemotivs bestimmt. Im Gegensatz zu SH2-Domänen ist ihre Interaktion in der Regel konstitutiv, ferner beschränkt sich ihr Vorkommen nicht auf signalleitende Proteine⁶¹. Die SH3-Domäne von ADAP weist einige Besonderheiten auf: einige in SH3-Domänen konservierte Reste sind nicht vorhanden, dafür geht ihr N-terminal eine helikale Struktur voraus, die ausgedehnte Kontakte mit der eigentlichen SH3-Domäne eingeht¹⁶³. Diese Besonderheiten verhindern eine Bindung an konventionelle Prolin-reiche Peptidmotive. Stattdessen assoziiert die ADAP-SH3-Domäne mit SKAP55 über das Motiv RKxxYxxY¹⁶². Verstärkt wird die Interaktion von ADAP mit SKAP-Proteinen über deren SH3-Domänen, die beide an ADAP binden können^{164,165}. Desweiteren enthält ADAP mehrere EVH1 (*Ena/Vasodilator stimulated phosphoprotein (VASP) homology domain 1*) Bindestellen, über die es mit Proteinen aus der Ena/VASP-Familie interagiert¹⁶⁶.

Im Gegensatz zu SLP-76 und LAT ist ADAP nicht notwendig für die Mobilisierung von Ca²⁺ und die Aktivierung von MAP-Kinasen. Anfängliche Überexpressionsstudien in T-Zelllinien führten zu widersprüchlichen Ergebnissen. Eine Gruppe beschrieb einen inhibitorischen Einfluß von ADAP auf die TCR-stimulierte Aktivität des IL-2 Promoters^{158,167}, eine andere Gruppe veröffentlichte das gegenteilige Resultat^{159,161}. Kongruente Ergebnisse publizierten dagegen zwei Arbeitsgruppen, die durch Herstellung von ADAP-defizienten Mäusen dessen Funktion *in vivo* demonstrierten^{168,169}. Sowohl die Entwicklung als auch die Funktion von T-Zellen ADAP-defizienter Mäuse sind beeinträchtigt. Es befinden sich weniger T-Zellen im peripheren lymphatischen Gewebe, ferner sind deren Proliferation nach Stimulation *ex vivo* sowie T-Zell abhängige Immunantworten deutlich vermindert. Während TCR-induzierte Signalleitungsereignisse normal zu sein scheinen, ist die TCR-stimulierte Adhäsion an

Integrin-Liganden deutlich verringert. Die verstärkte Adhäsion von T-Zellen an Integrin-Liganden nach TCR-Aktivierung ist ein seit langem bekanntes Phänomen. Jedoch lagen die molekularen Mechanismen ebenso lange im Dunkeln. Die Untersuchungen an ADAP-defizienten T-Zellen sowie Ergebnisse zur Funktion der GTPase Rap1 brachten erstmals Einblicke in die molekularen Mechanismen dieses Phänomens. Die Verstärkung Integrin-vermittelter Adhäsion kann prinzipiell auf zwei verschiedene Arten hervorgerufen werden. Zum einen durch eine Erhöhung der Affinität von Integrin-Molekülen durch Konformationsänderungen, zum anderen durch eine Erhöhung der Avidität durch „Clustering“ von Integrinen auf der Zelloberfläche¹⁷⁰. In ADAP-defizienten T-Zellen ist das Integrin-Clustering und damit die Aviditätsmodulation stark beeinträchtigt^{168,169}. Eine mögliche Rolle von ADAP bei der Affinitätsmodulation wurde nicht untersucht. Ob die GTPase Rap1 und das Adapterprotein ADAP in den gleichen Signalleitungsweg involviert sind und falls ja, in welcher Abhängigkeit sich beide zueinander befinden ist nicht bekannt, wird aber zur Zeit in der Literatur diskutiert¹⁷¹. Ob SLP-76, bzw. die Interaktion von SLP-76 mit ADAP für das Clustering von Integrinen auf der Zelloberfläche notwendig ist, ist ebenfalls nicht bekannt, allerdings wurde eine Beteiligung von SLP-76 bei der Integrin-vermittelten Adhäsion von Blutplättchen beschrieben¹⁷². Die Beteiligung von ADAP-organisierten Proteinkomplexen an der TCR-stimulierten Integrin-vermittelten Adhäsion wird gestützt durch den Phänotyp von T-Zellen aus SKAP55-defizienten Mäusen. Diese zeigen ebenso wie ADAP-defiziente T-Zellen eine stark reduzierte Integrin-vermittelte Adhäsion an Fibronectin oder Antigen-präsentierende Zellen¹⁷³.

In B-Lymphocyten wird weder ADAP exprimiert, noch ist ein ADAP-analoges Protein in B-Zellen bekannt. Jedoch wurde kürzlich die Beteiligung der PTKs Lyn, Syk und Btk, sowie der PLC- γ und Protein Kinase C beim BCR-induzierten Integrin-Clustering berichtet¹⁷⁴. Andere ADAP-exprimierende Zellen des hämatopoetischen Systems, u.a. Blutplättchen und Monocyten/Makrophagen scheinen sich in ADAP-defizienten Mäusen normal zu entwickeln und normal zu funktionieren. Eine Erklärung hierfür wäre eine mögliche funktionelle Redundanz ADAP-homologer Proteine, wie z.B. das 2001 ebenfalls in G. Koretzky's Labor beschriebene PRAM-1 (*promyelocytic leukemia retinoic acid receptor induced adaptor molecule 1*)¹⁷⁵. PRAM-1 wird hauptsächlich in myeloiden Zellen exprimiert und scheint an der Integrin-vermittelten Aktivierung von neutrophilen Granulocyten beteiligt zu sein¹⁷⁶. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein bis dato unbeschriebenes Gen „in silico“ identifiziert und dessen cDNA kloniert. Das Genprodukt der klonierten cDNA weist Sequenz- und Strukturhomologie mit ADAP und PRAM-1 auf.

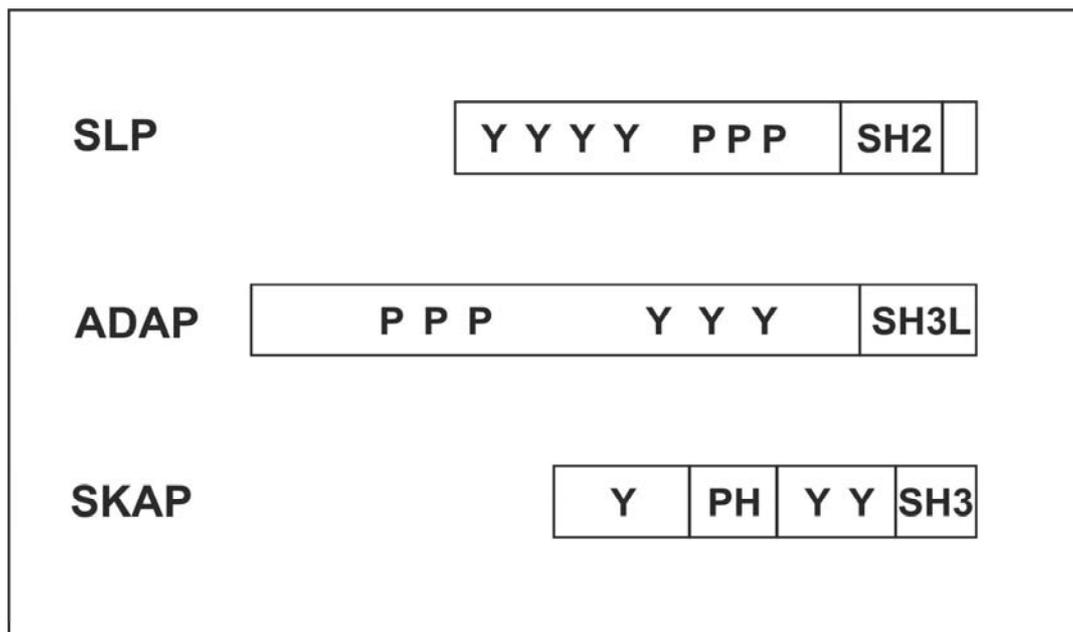


Abb.6: Domänenstruktur der SLP-, ADAP- und SKAP-Adapterproteine. SH3L: SH3-ähnliche Domäne (s. Text), Y: Tyrosinphosphorylierungsstelle, PPP: Prolin-reicher Bereich

Neuartige Adapterproteine in Lymphocyten

1996 wurde das Gen, dessen Funktion bei Patienten mit Chediak-Higashi Syndrom (CHS) beeinträchtigt ist, identifiziert¹⁷⁷⁻¹⁷⁹. CHS-Patienten leiden unter ausgeprägten immunologischen Defekten, Hypopigmentierung und progressiven neurologischen Fehlfunktionen. Ohne Knochenmarkstransplantation versterben sie meist im Kindesalter¹⁸⁰. Zu den immunologischen Defekten gehören verminderte T- und NK-Zell Cytotoxizität, eine beeinträchtigte Chemotaxis von Monocyten und Granulocyten, sowie lymphoproliferative Erkrankungen^{181,182}. Das CHS-Protein bekam den Namen LYST (*lysosomal trafficking regulator*), da es an der Sortierung von Proteinen zu Lysosomen, Endosomen und Plasmamembran beteiligt zu sein scheint^{183,184}. Es stellt den Prototyp einer neuartigen Familie von „Riesen-“ Proteinen mit molekularen Massen von teilweise über 350 kDa dar. In den letzten Jahren wurden weitere Mitglieder dieser Familie in Vertebraten beschrieben. Darunter ein Protein, das hauptsächlich in neuronalem Gewebe exprimiert wird und den Namen Nbea (*Neurobeachin*) bekam¹⁸⁵. Das kürzlich beschriebene BWF1 (*BEACH-domain, 5 WD40-repeats and a FYVE domain 1*) wird nur im Embryonalstadium im Gehirn exprimiert. In der adulten Maus findet man BWF1-Transskripte hingegen hauptsächlich in der Leber, der Niere

und im Testis¹⁸⁶. 2001, bzw. 2004 wurden die cDNAs zweier weiterer Mitglieder dieser Proteinfamilie, ALFY (*autophagy-linked FYVE-protein*)¹⁸⁷ und LBA (*LPS-responsive beige-like anchor gene*)¹⁸⁸, kloniert. ALFY wird ubiquitär, LBA nach Zugabe von LPS in B-Zellen und Makrophagen exprimiert. Desweiteren findet man unterschiedliche Transskript-Isoformen in vielen anderen Geweben. Die einzige bisher bekannte Gemeinsamkeit all dieser Proteine ist ihre konservierte Domänenstruktur am C-Terminus, bestehend aus einer BEACH-Domäne gefolgt von mehreren WD40-repeats. Vom CHS und dem entsprechenden Mausmodell, der „beige-Maus“, leitet sich die Bezeichnung BEACH (*beige and CHS*) ab. BEACH-Domänen umfassen ~300 Aminosäuren und sind unter Eukaryoten von der Hefe bis zum Menschen verbreitet^{184,189}. Sie liegen immer in Kombination mit sog. WD40-repeats vor, die auch in vielen anderen Proteinen vorkommen. WD40-repeats sind ~40 Aminosäuren lange Domänen, die meistens ein zentrales Tryptophan-Aspartat (WD)-Motiv enthalten. Die gamma-Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine bestehen gänzlich aus repetitiven WD40-repeats. In anderen Proteinen liegen sie am N-Terminus, zentral oder am C-Terminus vor. Sowohl die Funktion von BEACH-Domänen, als auch die von WD40-repeats ist nicht bekannt. Allerdings ist kein WD40-repeats-enthaltendes Proteine mit katalytischer Aktivität bekannt, weshalb man vermuten kann, daß es sich bei BEACH-Domänen-Proteinen um Adapterproteine handelt. Die dreidimensionale Struktur der Nbea-BEACH-Domäne wurde vor kurzem gelöst¹⁹⁰. Interessanterweise enthält sie in ihrem Zentrum keine typischen Sekundärstrukturen wie z.B. α -Helices oder β -Faltblätter. Aus der 3D-Struktur wurde ersichtlich, daß die Nbea-BEACH-Domäne in enger Assoziation mit einer „unkonventionellen“ PH-Domäne vorliegt, die sich direkt N-terminal von der BEACH-Domäne befindet und mit Hilfe gängiger Software offenbar nicht identifizierbar ist, da sie kaum Sequenzhomologie zu konventionellen PH-Domänen aufweist. Die beiden Domänen bilden engen physischen Kontakt und fungieren möglicherweise als funktionelle Einheit¹⁹⁰. Kürzlich wurde der Phänotyp einer Nbea-defizienten Maus publiziert, der durch eine völlige Bewegungsunfähigkeit der Tiere charakterisiert ist. Dies ist auf eine komplette Abwesenheit von induzierter synaptischer Transmitterfreisetzung an Neuro-muskulären Verbindungen zurückzuführen. Da sie nicht atmen können, sterben die Tiere unmittelbar nach der Geburt¹⁹¹. In dieser Arbeit wird ein weiteres Mitglied dieser noch jungen Familie von BEACH-Domänen enthaltenden Proteinen vorgestellt, das präferentiell in Lymphocyten exprimiert wird.

„Lipid rafts“

Gegen Ende der 1980er Jahre beobachteten einige Wissenschaftler, die sich mit dem Transport und der Sortierung von Membranlipiden beschäftigten, Unterschiede in der Lipidzusammensetzung von Plasmamembranbereichen in Epithelzellen. Bald wurde deutlich, daß in diesen Zellen auch manche Proteine selektiv zu ganz bestimmten Plasmamembranbereichen transportiert werden. In besagten Plasmamembranbereichen findet man eine Anreicherung von Sphingolipiden (Glycosphingolipide und Sphingomyelin) und Cholesterin¹⁹². Diese Anreicherung findet man auch in sog. Caveolae, Clathrin-freien Plasmamembran-Einstülpungen, die in Endo- und Transcytose-Prozesse involviert sind. Bald wurden mehrere Begriffe für diese lateral abgegrenzten Plasmamembran-Mikrodomänen eingeführt, u.a. GEMs (*glycolipid-enriched plasma-membrane microdomains*), DIGs (*detergent-insoluble glycolipid-enriched domains*) oder auch *lipid rafts*. Die ersten Untersuchungen, die eine Rolle von lipid rafts bei der Signalinitiation von Immunrezeptoren ergaben, wurden am Fc-epsilon-Rezeptor I auf Mastzellen durchgeführt¹⁹³⁻¹⁹⁵. Die Erarbeitung einfacher biochemischer Protokolle zur Isolierung von lipid rafts führte bald darauf zur Veröffentlichung einer Unzahl von Arbeiten, die sich mit der Funktion der rafts in T- und B-Zellen befassten. Diese Studien ergaben u.a., daß BCR- und TCR- sich vor Stimulation nicht in den lipid rafts befinden, nach ihrer Stimulation aber in lipid rafts nachweisbar sind¹⁹⁶⁻²⁰⁰. Ähnliche Ergebnisse wurden, bei nur wenigen Ausnahmen, für fast jedes daraufhin untersuchte Signalleitungsmolekül aus Lymphocyten beschrieben^{201,202}. Einige Proteine liegen konstitutiv mit lipid rafts assoziiert vor. Darunter sind die über Myristoylierung in der Plasmamembran verankerten Src-PTKs, sowie einige palmytoylierte Transmembran-Adapterproteine, u.a. LAT und NTAL. Interessanterweise ist deren Funktion komplett abhängig von der Verankerung in den rafts, was durch Mutationsanalysen demonstriert wurde^{148,203}. Trotz der intensiven Arbeiten in den letzten Jahren steht eine befriedigende Erklärung für die Notwendigkeit von lipid rafts für die Signalinitiation von ITAM-enthaltenden Immunrezeptoren nach wie aus. Einer gängigen Hypothese zu Folge stellen rafts Plattformen für die Assemblierung von multi-Protein-Komplexen dar, von denen diverse Signalkaskaden ausgehen. Ferner könnte die laterale Kompartimentalisierung der Plasmamembran und der damit assoziierten Signalmoleküle deren Interaktion in Abwesenheit eines Stimulus unterbinden.

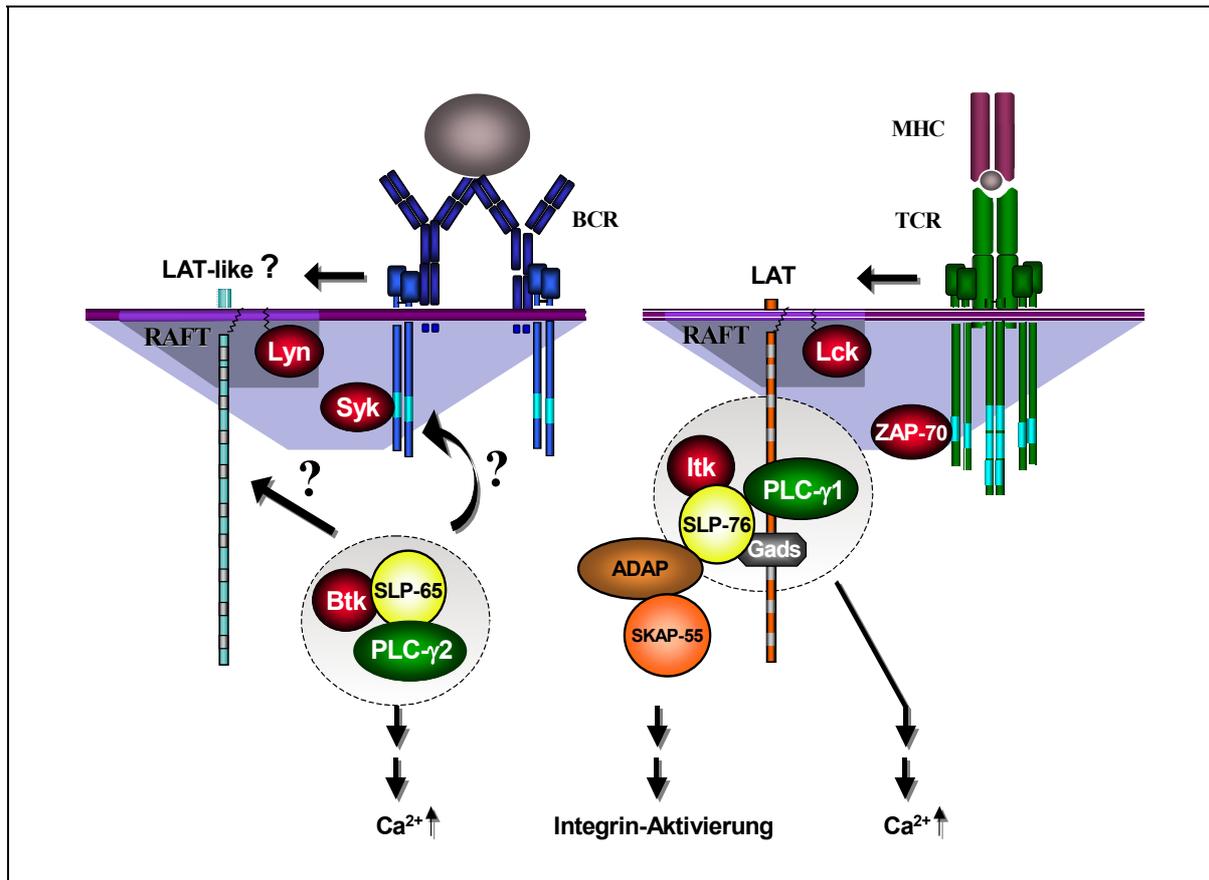


Abb.7: Die Antigenrezeptor-proximalen Signalleitungsereignisse in B- und T-Zellen. Nach Antigen-Bindung assoziieren die Rezeptor-Komplexe mit „lipid rafts“. In den „lipid rafts“ werden PTKs (rot) und die PLC- γ (grün) durch SLP-Adapterproteine (gelb) zu multimolekularen Komplexen organisiert. In T-Zellen sind daran das membranständige Adapterprotein LAT und das cytoplasmatische Adapterprotein Gads beteiligt. Wie dieser durch einen gestrichelten Kreis markierte „Calcium-Initiationskomplex“ in B-Zellen zur Plasmamembran, bzw. in die „lipid rafts“ gelangt ist nicht bekannt. Ein Protein aus B-Zellen mit LAT-äquivalenter Funktion ist nicht bekannt. Ebenfalls unbekannt ist, ob ein ADAP-homologes Protein in B-Zellen exprimiert wird.

Von den überaus komplexen und über viele Mechanismen miteinander verflochtenen Signalleitungswegen, die nach BCR- oder TCR-Stimulation ausgelöst werden, wurden hier nur die initialen, Rezeptor-proximalen Ereignisse beschrieben. Der Aktivierung cytosolischer PTKs folgt die Aktivierung einer Vielzahl von Signalkaskaden, die je nach Differenzierungsstadium und Umgebungssituation der Zelle ganz Unterschiedliche biologische Effekte zur Folge haben kann. In reifen B-Zellen, die mit dem Blut und der Lymphe im Körper zirkulieren, ist die Bindung von Antigen an den BCR der erste Schritt zur

Aktivierung, i.e. Proliferation und Differenzierung der Zelle zur Antikörper-produzierenden Plasmazelle, wie in Burnetts Theorie der klonalen Selektion postuliert. In unreifen, sich im Knochenmark entwickelnden Zellen, oder in reifen Zellen, die keine Hilfe von T-Zellen erhalten, können BCR-induzierte Signale hingegen zu Apoptose oder Anergie der Zelle führen. Ob sich die Signale, die zu so unterschiedlichen zellulären Reaktionen wie Differenzierung oder Zelltod führen qualitativ unterscheiden ist eine der ungelösten Fragen der Immunologie. Möglicherweise unterscheiden sich aber weniger die Signale an sich, als vielmehr die Schalter, welche durch die Signale letzten Endes betätigt werden. Mit anderen Worten, die Modulation der Genexpression könnte in unterschiedlichen zellulären Entwicklungsstadien differieren.

LMP2A – ein virales Protein manipuliert die B-Zell-Biologie

1990 beschrieben Richard Longnecker und Elliot Kieff zwei integrale Membranproteine des Epstein-Barr Virus (EBV), die durch alternatives Spleißen derselben mRNA entstehen²⁰⁴. Die Genprodukte, LMP2A (Latent Membrane Protein 2A) und LMP2B unterscheiden sich durch das Vorhandensein eines ~119 Aminosäuren umfassenden N-Terminus in LMP2A. Der Name deutet an, daß diese Proteine, wie das zuvor entdeckte LMP1, in latent mit EBV infizierten Zellen exprimiert werden. Das EBV gehört zur Familie der Herpesviren und infiziert selektiv B-Lymphocyten über das B-Zell-spezifische Oberflächenprotein CD21, sowie Zellen des Nasen-Rachen-Epithels²⁰⁵. Wie alle Mitglieder der Herpesvirusfamilie kann es eine latente Infektion etablieren. Von Latenz spricht man in der Virologie, wenn ein Virus im Organismus vorliegt ohne infektiöse Partikel zu produzieren, im Gegensatz zur Persistenz, bei der z.T. große Mengen Viruspartikel freigesetzt werden. Allen Viren gemeinsam ist, daß sie im Laufe ihrer Evolution Mechanismen entwickelt haben mit Hilfe derer sie die Wirtszellen, in denen sie sich replizieren, zu ihrem Vorteil manipulieren. Da Herpesviren ihr Genom in der Regel nicht ins Wirtsgenom integrieren, sondern es episomal vorliegt, bedarf es zur Aufrechterhaltung einer Latenz also bestimmter Genprodukte, die zum einen die Virusvermehrung unterdrücken und zum anderen dafür sorgen, daß das episomale Genom nicht verlorenght. Das LMP2A ist das einzige EBV-Genprodukt, dessen Transskripte in verschiedenen Untersuchungen in allen unterschiedlichen Latenzformen, zwischen denen man bei EBV-Infektionen unterscheiden zu können meint, nachgewiesen werden konnte²⁰⁶⁻²⁰⁹. LMP2A scheint also für die Aufrechterhaltung der EBV-Latenz von entscheidender Bedeutung zu sein. LMP2A ist in sofern ein ungewöhnliches Protein, als daß es 12 Transmembrandomänen besitzt; N- und C-Terminus ragen beide ins Zellinnere (Abb.8). Der

N-Terminus enthält mehrere Konsensus-Tyrosinphosphorylierungsmotive, von denen zwei sich im Kontext eines ITAMs befinden²¹⁰. Die ITAM-Tyrosine sowie ein weiterer Tyrosinrest an Position 112 (Y₁₁₂) sind in latent infizierten B-Zellen konstitutiv phosphoryliert^{211,212}. Während das ITAM eine Bindestelle für Syk darstellt, fungiert das Y₁₁₂EEA-Motiv als Interaktionsstelle für Src-PTKs, v.a. Lyn²¹². Desweiteren wurden MAP-Kinasen und Ubiquitin-Ligasen als Bindepartner des LMP2A-N-Terminus identifiziert^{213,214}. Das konstitutiv phosphorylierte LMP2A liegt in *lipid rafts* vor und fungiert als Inhibitor des BCRs²¹⁵⁻²¹⁸. Der Mechanismus mittels dessen es die BCR-induzierte Aktivierung cytosolischer PTKs und die Mobilisierung von intrazellulärem Ca²⁺ unterbindet ist nicht verstanden, jedoch geht man davon aus, daß es PTKs vom BCR abzieht und deren Ubiquitin-vermittelte Degradation einleitet²¹⁸⁻²²⁰. Für diesen Vorgang sind die drei konstitutiv phosphorylierten Tyrosinreste und die Assoziation mit *lipid rafts* unabdingbar^{211,212,215,221}. Neben der Inhibition des BCRs ist LMP2A jedoch auch in der Lage BCR-abhängige Signale, die für die Entwicklung sowie für das Überleben von B-Zellen essentiell sind, zu substituieren. In transgenen Mäusen, die LMP2A B-Zell-spezifisch exprimieren akkumulieren BCR-negative B-Zellen in der Peripherie²²². Solche Zellen können in wildtypischen Mäusen nicht existieren, was von Klaus Rajewsky's Labor 1997 eindrucksvoll demonstriert wurde¹⁰⁹. Die induzierte Abschaltung der BCR-Expression auf reifen zirkulierenden B-Zellen führt zu deren Eliminierung durch Apoptose. Dies bedeutet, daß der BCR auch in Abwesenheit von Antigen Signale ins Zellinnere vermittelt, die für das Überleben der Zellen von essentieller Bedeutung sind. Die Natur dieses sog. *maintenance*-Signals ist nicht gut charakterisiert, jedoch könnten präformierte Proteinkomplexe daran beteiligt sein (s.o.)^{107,108}. Ein ligandenunabhängiges Signal wird auch als notwendig für die Reifung von B-Zellen im Knochenmark angenommen¹⁰⁸. Jedoch ist in diesem Fall das letzte Wort noch nicht gesprochen und neuere Daten lassen Bestandteile der extrazellulären Matrix als Liganden für prä-BCRs möglich erscheinen²²³⁻²²⁶. Einige Arbeiten aus dem Labor von Richard Longnecker dokumentieren, daß Btk, Akt/PKB und Ras an der LMP2A-vermittelten Signalleitung beteiligt sind²²⁷⁻²²⁹. Die vorliegende Arbeit dokumentiert eine essentielle Rolle von SLP-65 für das LMP2A-vermittelte *maintenance*-Signal in B-Lymphocyten²³⁰.

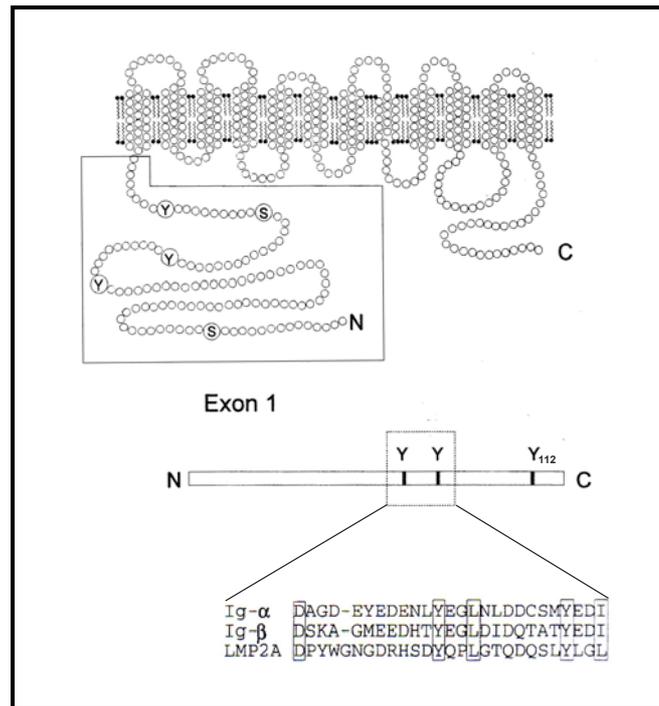


Abb.8: Struktur des LMP2A des Epstein-Barr Virus nach²¹⁴ und²¹¹. Der durch Exon 1 codierte 119 Aminosäuren umfassende cytoplasmatische N-Terminus ist gesondert dargestellt. Konstitutiv phosphorylierte Tyrosinreste und die Lage des ITAMs sind angegeben.

ZIELE DER ARBEIT

Die Ziele dieser Arbeit waren:

1. Die Identifizierung von Bindepartnern der SH2-Domäne des Adapterproteins SLP-65. Dazu sollten mittels biochemischer Methoden SLP-65-assoziierte Phosphoproteine aus aktivierten B-Lymphocyten isoliert, identifiziert und charakterisiert werden.
2. Die Untersuchung der Funktion von SLP-65 und SLP-65-assoziierten Proteinen für LMP2A-vermittelte Signalleitungsprozesse in EBV-infizierten B-Zellen. Zu diesem Zweck wurden SLP-65-organisierte Proteinkomplexe in EBV-transformierten B-Zelllinien biochemisch analysiert. Ferner wurde in Kollaboration mit dem Labor von Richard Longnecker in Chicago, USA, die Rolle von SLP-65 für die Signalleitung des LMP2A in einem Mausmodell *in vivo* untersucht.
3. Die Identifizierung neuer Elemente, die Signalleitungsprozesse in Lymphocyten regulieren. Hierfür wurde versucht mittels „*in silico*“-Verfahren bis dato unbekannte Gene, bzw. deren Produkte zu ermitteln, die aufgrund von Sequenzhomologie mit bekannten signalleitenden Proteinen vermutlich an Signalleitungsvorgängen beteiligt sind. Die cDNAs der ermittelten Kandidaten sollten kloniert und deren Protein-Produkte biochemisch charakterisiert werden.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen haben zu folgenden Publikationen beigetragen:

1. Engels, N., B. Wollscheid, and J. Wienands, *Association of SLP-65/BLNK with the B cell antigen receptor through a non-ITAM tyrosine of Ig-alpha*. Eur J Immunol, 2001. **31**(7): p. 2126-34.
2. Engels, N., et al., *Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A (LMP2A) employs the SLP-65 signaling module*. J Exp Med, 2001. **194**(3): p. 255-64.
3. Wienands, J. and N. Engels, *Multitasking of Ig-alpha and Ig-beta to regulate B cell antigen receptor function*. Int Rev Immunol, 2001. **20**(6): p. 679-96.
4. Brdicka, T., et al., *Non-T cell activation linker (NTAL): a transmembrane adaptor protein involved in immunoreceptor signaling*. J Exp Med, 2002. **196**(12): p. 1617-26.

MATERIALIEN UND METHODEN**MATERIALIEN*****Chemikalien******Hersteller***

Acrylamid/Bisacrylamid	Roth
Agarose	Gibco-BRL
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Ampicillin	AppliChem
Bacto-Agar	Gibco-BRL
Borsäure	Roth
5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	AppliChem
Bromphenolblau	LKB
Calciumchlorid	Merck
Commassie Violet R 150	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Essigsäure	Merck
Ethanol	Baker
Ethanolamin	Merck
Ethylendiammoniumtetraacetat (EDTA)	Roth
Geneticin-Sulfat (G418)	PAA
L-Glutamin	PAA
Gluthation	Sigma
Glycerol	Baker
Glycin	Baker
Hefe-Extrakt	Roth
4-Hydroxytamoxifen	Sigma
Hygromycin	Cayla
Isopropanol	Baker
Isopropyl- β -D-Thiogalactosid (IPTG)	Roth
Kaliumchlorid	Merck
β -Mercaptoethanol	Roth
Methanol	Baker
Natriumazid	Sigma
Natriumchlorid	Baker

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Biomol
Natriumorthovanadat	Sigma
Nonidet P40 (Igepal)	Sigma
Penicillin/Streptomycin	PAA
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Sigma
Protease-Inhibitoren	Sigma
Puromycin	Cayla
Rinderserumalbumin (BSA)	PAA
Salzsäure	Merck
Select Agar	GibcoBRL
Select Peptone 140	GibcoBRL
Select Yeast Extract	GibcoBRL
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Roth
Triethanolamin	Merck
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth
Triton-X-100	Sigma
Tween-20	Roth
Wasserstoffperoxid	Fluka

Alle Chemikalien wurden im höchsten Reinheitsgrad (p.A.) bezogen. Nicht aufgeführte Chemikalien stammen von den Firmen Sigma, Merck, Roth oder Fluka.

Antikörper

Kaninchen-anti-CrkL (C-20)	Santa Cruz Biotechnology
Kaninchen-anti-C3G (C-19)	Santa Cruz Biotechnology
Kaninchen-anti-PLC- γ 2	Santa Cruz Biotechnology
Maus-anti-c-Cbl	Transduction Laboratories
Maus-anti-CD79b (Ig- β)	Beckton Dickinson
Maus-anti-CrkL	Upstate Biotechnology
Maus-anti-Phosphotyrosin (4G10)	Upstate Biotechnology
Maus-anti-SLP-65	BAbCO
Maus-anti-SLP-65 (82-B1)	Eurogentec
Maus-anti-Syk (4D10)	Santa Cruz Biotechnology
Ziege-anti-human-IgMF(ab') ₂ -Fragmente	Jackson Laboratories/Dianova

Ziege-anti-Kaninchen-IgG/HRPO	Perbio
Ziege-anti-Maus-IgG/HRPO	Perbio
Ziege-anti-Maus-IgM	Southern Biotechnologies
Ziege-anti-Maus-IgM/FITC	Southern Biotechnologies

GST-Fusionsproteine

GST-Syk[SH2] ₂	Jürgen Wienands
GST-SLP-65	Jürgen Wienands/ Bernd Wollscheid
GST-SLP-65[RL]	Jürgen Wienands/ Bernd Wollscheid
GST-SKAP55	Burkhard Schraven/ Stefanie Kliche
GST-SKAP-HOM	Burkhard Schraven/ Stefanie Kliche
GST-SH3P7	Jürgen Wienands/ Oliver Larbolette

Kommerzielle Nachweis- und Reaktionssysteme zur:

Plasmidisolierung	Qiagen, Macherey-Nagel
Isolierung von DNA aus Agarose	Qiagen
Isolierung von RNA aus Zellen	Qiagen
Klonierung von PCR-Fragmenten	Invitrogen, Promega
Entwicklung von Western-Blots (ECL)	Amersham
Gewebe-Expressionsanalyse	Clontech
Transfektion eukaryotischer Zellen	Invitrogen, Roche

Enzyme

Alkalische Phosphatase	NEB
Pfu-Polymerase	Promega
Restriktionsenzyme	NEB
Reverse Transkriptase	Gibco, Finnzymes
T4 DNA-Ligase	Promega
Taq-Polymerase	Sigma, NEB
LA-Taq-Poymerase	Takara
Trypsin	PAA

Plasmide

pcDNA3	Invitrogen
pcDNA3/p120-HA	N. Engels
pcDNA3/p120-dSH3L-HA	N. Engels
pGEX-Syk[SH2] ₂	J. Wienands
pGEX-maus-SLP-65	B. Wollscheid, J. Wienands
pGEX-maus-SLP-65RL	B. Wollscheid, J. Wienands
pGEX-SKAP-55	S. Kliche, B. Schraven
pGEX-SKAP-HOM	S. Kliche, B. Schraven
pGEX-SH3P7	O. Larbolette, J. Wienands

Restriktionskarten und Sequenzen befinden sich im Anhang.

Peptide

Ig-α PepI.....	biot.NH ₂ -ENLYEGLNLDDCSMYEDISR -COOH
Ig-α p-PepI.....	biot.NH ₂ -ENL p YEGLNLDDCSM p YEDISR -COOH
Ig-α N-p-PepI.....	biot.NH ₂ -ENL p YEGLNLDDCSMYEDISR -COOH
Ig-α PepII.....	biot.NH ₂ -CSMYEDISRGLQGTYQDVGN -COOH
Ig-α p-PepII.....	biot.NH ₂ -CSM p YEDISRGLQGT p YQDVGN-COOH
Ig-α C-p-PepII.....	biot.NH ₂ -CSMYEDISRGLQGT p YQDVGN-COOH

Oligonukleotide

Oligonukleotide für zielgerichtete Mutagenesen

shPRAM-dSH3L-fwd:

5'-GAAGAATCAGAAAGTTTCTCTCCTGGATATGTGCTCATTGAACATCTA-3'

shPRAM-dSH3L-rev:

5'-TAGATGTTCAATGAGCACATATCCAGGAGAGAACTTTCTGATTCTTC-3'

shPRAM-CT-HA-fwd:

5'-CCTTATGACGTGCCTGACTATGCATCCCCTTAGAAAAATCAAGATCAAATGCTATG-3'

shPRAM-CT-HA-rev:

5'-TGCATAGTCAGGCACGTCATAAGGATATGACCAACTTTGATGCTTGAAATCTAG-3'

Oligonukleotide für Sequenzierungen

T7.....5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
SP6.....5'-CATTTAGGTGACACTATAG-3'
M13 fwd.....5'-TGTA AAAACGACGGCCAGT-3'
M13 rev.....5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'
orf64-fwd11.....5'-AGGCTCACGGACACTCTCCC-3'
orf64-fwd12.....5'-ACCAACTGCAACGGGGTAGAG-3'
orf64-fwd13.....5'-GTGGAACGCAGCACTGAGG-3'
orf64-rev10.....5'-AGATGCATATAGCTCTTGTCC-3'

Oligonukleotide für Klonierungen

shPRAM-fwd3.....5'-AGCGGATTGTTGGCCCCAGGACCC-3'
shPRAM-fwd4.....5'-GAGAGGCTGGGCTTGTTCCTGAC-3'
shPRAM-rev3.....5'-GTGCAGTCCATAGCATTTGATC-3'
shPRAM-rev5.....5'-CGCAGGACTAGGATCTTAGGACTAG-3'
smFyb-fwd4.....5'-ACAGCCCAGGTGGAGCAGGTGAGG-3'
smFyb-fwd5.....5'-GAGAGCATTGTTGGCCCCAGGATCC-3'
smFyb-rev6.....5'-GAAGGACAACTTTTATGGAGTAAAACC-3'
smFyb-rev7.....5'-AAAACCAACATTGACTTGTGAGGGG-3'
orf64-fwd1.....5'-ATAACCTGCTGCTGCCTGATG-3'
orf64-fwd2.....5'-TGACGATGTGGGGCCGGGTCC-3'
orf64-fwd3.....5'-GGATAGGGGGCCCATGCCTTC-3'
orf64-fwd4.....5'-GGTGACGCAGAAGTTCTCCCTG-3'
orf64-fwd5.....5'-TGGTGATTGTGCAGGGCCACC-3'
orf64-fwd7.....5'-CAGTGGCCAGACCTGGAGGAG-3'
orf64-fwd8.....5'-GGATGGATGAGGGAGATGCTGC-3'
orf64-fwd9.....5'-TCTGCACTCGGTCCTGACCAG-3'
orf64-fwd10.....5'-GCCATGTGTGACTTCCTGATGC-3'
orf64-rev1.....5'-GCCCTTCCTTGAGA ACTGTGG-3'
orf64-rev2.....5'-AGGCAGAGCTCAGGCCCCAGTC-3'
orf64-rev3.....5'-CATGGTACAACCGAGGCAGCAG-3'
orf64-rev4.....5'-CAGCCTCACCATGATGCACACG-3'
orf64-rev6.....5'-CAGGCTGGGTTGGAAAGAGCAG-3'
orf64-rev7.....5'-GCTTTTAAAGGCCTTACTCCGATC-3'

orf64-rev8.....5'-TCGATGGTTCAGGAGAGAGGCC-3'

orf64-rev9.....5'-CTTCTTCCTCAGGAGAAACGCC-3'

Oligonukleotide zur RT-PCR-Gewebeexpressionsanalyse

GAPDH-upstream.....5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3'

GAPDH-downstream.....5'-CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC-3'

orf64-fwd1.....5'-ATAACCTGCTGCTGCCTGATG-3'

orf64-rev1.....5'-GCCCTTCCTTGAGAACTGTGG-3'

shPRAM-fwd2.....5'-CAGATGACCAACGTCCACAC-3'

shPRAM-rev3.....5'-GTGCAGTCCATAGCATTGATC-3'

Puffer und Medien

Puffer für molekularbiologische Arbeiten

TBE-Puffer.....(90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 1 mM EDTA)

Puffer zur Elution &

Lagerung von DNA...(10 mM Tris-HCl pH 8,5)

Puffer für biochemische Arbeiten

Block-Puffer.....(PBST + 5% Magermilchpulver)

Transferpuffer.....(39 mM Glycin; 48 mM Tris; 0,0375% (w/v) SDS; 20% (v/v)
Methanol; 0,01% (w/v) Natriumazid)

Lysispuffer.....(150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,5 M EDTA; 10% Glycerol;
1% NP-40 oder 0,1% Triton X-100; 0,5% Protease Inhibitor-Cocktail
P2714 (Sigma))

PBS.....(140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH₂PO₄; 8,6 mM Na₂HPO₄)

PBST.....(PBS + 0,1% (v/v) Tween 20)

SDS-Probenpuffer.....(62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 2% (w/v) SDS; 2% (v/v) Glycerol; 0,05%
(v/v) β-Mercaptoethanol; 0,025% (w/v) Bromphenolblau)

Stripping-Puffer.....(62,5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 10 g SDS; 3,5 ml β-Mercaptoethanol;
ad 500 ml ddH₂O)

Sammelgelpuffer.....(500 mM Tris-HCl; 0,4% (w/v) SDS; pH 6,8)

Trenngelpuffer.....(1,5 M Tris-HCl; 0,4% (w/v) SDS; pH 8,8)

Medien und Nährböden für Bakterien

LB-Medium.....(10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, ad 1000 ml H₂O)

2 x YT-Medium.....(20 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, ad 1000 ml H₂O)

LB-Ampicillin-Agar...(20 g Bacto-Agar pro 1000 ml LB-Medium; autoklaviert und auf 55°C abgekühlt, dann mit 100 µg/ml sterilfiltriertem Ampicillin versetzt)

Medien für die Zellkultur

Kompl. RPMI 1640...(RPMI 1640 + 10% hitzeinaktiviertes FCS; 2 mM Glutamin; optional: 100 IU Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin)

Einfriermedium.....(90% hitzeinaktiviertes FCS; 10% Dimethylsulfoxid (DMSO))

Transformationskompetente Bakterien

Es wurden die Stämme XL1, TOP10F' und BL21 verwendet. Die Herstellung kompetenter Bakterien erfolgte nach Inoue *et al.*, 1990²³¹.

Sonstige Materialien

DNA-Längenstandards	Promega
Filterpapier 3M	Schleicher & Schüll
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA
Elektoporationsküvetten	Peqlab
Glutathion-Sepharose	Pharmacia
Magermilchpulver (Lasana)	Humana
Nitrocellulosemembran (Hybond)	Amersham
Plastikmaterialien für die Zellkultur	Greiner
Protease-Inhibitor-Cocktail (P2714)	Sigma
Protein-Größenstandard (SDS-7B)	Sigma
Protein-G-Sepharose	Pharmacia
RPMI 1640	PAA
Streptavidin-Agarose	Pierce/Perbio

METHODEN

Zellkultur

Allgemeines

FCS wurde zur Inaktivierung von Komplementfaktoren vor Gebrauch für 30 min bei 56°C inkubiert und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Das Zählen von Zellen erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Das Sedimentieren von Zellen erfolgte bei 300xg für 4 min bei 4°C.

Zellkulturbedingungen

Alle verwendeten Zelllinien wurden in RPMI 1640 mit 10% hitzeinaktiviertem FCS und 2 mM Glutamin bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten, 5% CO₂-enthaltenden Atmosphäre kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer Sterilbank (HeraSafe, Heraeus) durchgeführt.

Zelllinien

Ramos

Ramos ist eine humane Burkitt-Lymphom-Zelllinie. Die Zellen repräsentieren phänotypisch reife B-Zellen und exprimieren Oberflächen-IgM mit einer κ-leichten Kette. Die Zelllinie ist EBV-negativ (*American Type Culture Collection*).

Lymphoblastoide Zelllinien

Das Epstein-Barr Virus (EBV) ist in der Lage *in vitro*-infizierte humane B-Zellen zu immortalisieren. Solche immortalisierten B-Zellen wachsen in Kultur zu kontinuierlichen Zelllinien, sogenannten Lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs), aus. Die Zellen exprimieren Aktivierungsmarker (CD39, CD40, CD44) und Adhäsionsmoleküle (LFA-1, ICAM-1, LFA-3, CD44) und wachsen in charakteristischen Zellklumpen. Das Wachstum der Zellen ist abhängig von hohen Serumkonzentrationen (mind. 10 % FCS) und stark abhängig von einer ausreichend hohen Zelldichte, da sich die Zellen durch einen autokrinen Mechanismus stimulieren. Die in dieser Arbeit verwendeten LCLs wurden freundlicherweise von Prof. Dr. H.H. Peter (Abteilung für Rheumatologie/Klinische Immunologie, Universität Freiburg) bereitgestellt. Die Transformation der Zellen erfolgte mit dem EBV-Stamm B95-8.

HEK293T

HEK293T-Zellen sind adhären wachsende humane embryonale Nierenzellen (*human embryonic kidney*), die das „large-T“-Antigen des SV40 Virus exprimieren. Dies ermöglicht den Zellen die Replikation von Vektoren, die einen SV40 Replikationsursprung enthalten, was zur starken Expression von Transgenen führt.

Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen

Zur Langzeitlagerung eukaryotischer Zellen wurden diese in Einfriermedium (90 % hitzeinaktiviertes FCS; 10 % DMSO) aufgenommen, bei -80°C eingefroren und anschließend bei -150°C oder -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert. Das Auftauen der Zellen erfolgte möglichst rasch bei 37°C . Die aufgetauten Zellen wurden in RPMI gewaschen und anschließend in Kultur genommen.

Durchflußcytometrie

Zur Analyse der Expression von Zelloberflächenmolekülen wurden ca. $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ Zellen in FACS-Röhrchen überführt, sedimentiert und mit PBS gewaschen. Der Überstand wurde dekantiert und zu dem verbliebenen PBS (ca. 150 μl) 1 μg des gewünschten Antikörpers gegeben. Nach Resuspendierung wurden die Zellen 15 min auf Eis inkubiert. Bei Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern wurde im Dunkeln inkubiert. Die Analyse erfolgte mit einem FACS Calibur (Becton Dickinson) und *Cell Quest Pro* Software.

Transiente Transfektion adhärenter Zellen

Adhären wachsende Zellen wurden mit *Lipofectamine Plus* (Invitrogen) oder *Fugene 6* (Roche) gemäß den Anweisungen der Hersteller transfiziert. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde der DNA 1/5 der Expressionsvektormenge an pcDNA3/EGFP zugesetzt. Die Transfektionseffizienz wurde vor Verwendung der Zellen fluoreszenzmikroskopisch überprüft.

Molekularbiologische Methoden

Fragmentierung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur sequenzspezifischen Spaltung von DNA wurde diese mit Restriktionsenzymen unter den vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen inkubiert. Die DNA-Konzentration wurde auf maximal 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Reaktionsansatz eingestellt.

Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Die elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten erfolgte in 0,8 – 3 %igen Agarosegelen in TAE- oder TBE-Puffer.

Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem *QIAEX II Kit* (Qiagen) gemäß den Anweisungen des Herstellers.

Phenol-Chloroform-Fällung von Proteinen

Die in einer DNA-Lösung enthaltenen Proteine (z.B. Restriktionsenzyme, modifizierende Enzyme u.a.) wurden durch Zugabe einer des Lösungsvolumens entsprechenden Menge eines Gemisches aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol (25:24:1) denaturiert. Nach Trennung der Phasen durch kurzes anzentrifugieren ($> 10.000 \times g$) wurde die DNA-enhaltende wäßrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA anschließend durch Ethanol-fällung präzipitiert.

Ethanol-Fällung von DNA

Zur Fällung von DNA aus einer wäßrigen Lösung wurde deren Na^+ -Gehalt durch Zugabe eines zehntel Volumens 5 M NaCl auf 0,5 M eingestellt. Danach wurde das 2,5-fache Volumen absoluten Ethanols (-20°C) hinzugegeben und für mindestens 20 min bei -80°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA für 15 min mit $16000 \times g$ bei 4°C abzentrifugiert. Der Ethanol wurde abgesaugt, das DNA-Sediment luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen 10 mM Tris/HCl pH 8,5 aufgenommen.

Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration doppelsträngiger DNA wurde photometrisch bestimmt und berechnet sich wie folgt:

$$1 \text{ OD}_{260} \cong 50 \mu\text{g/ml Doppelstrang-DNA}$$

Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation zweier DNA-Fragmente wurden beide Komponenten so gemischt, daß die Anzahl der Insertmoleküle in etwa fünfmal größer war, als die des Vektors. Die Ligationsreaktion wurde mit 1 Unit T4-DNA-Ligase pro 20 μl Reaktionsansatz in

Ligasepuffer bei Raumtemperatur für ≥ 1 h inkubiert. Ca. 3 μl des Reaktionsansatzes wurden zur Transformation kompetenter Bakterien eingesetzt.

Transformation kompetenter Bakterien

Es wurden ausschließlich chemokompetente Bakterien verwendet, die mittels Hitzeschock (42°C, 42 s) transformiert wurden.

Plasmidisolierung

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden kommerzielle Systeme der Firma Macherey-Nagel gemäß den Anweisungen des Hersteller verwendet. Die hochreine DNA wurde in 10 mM Tris/HCl pH 8,5 eluiert und bei 4°C gelagert.

Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen erfolgte mit Hilfe des *RNeasy® Mini Kits* der Firma Qiagen gemäß den Anweisungen des Herstellers.

Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Folgende Standardbedingungen wurden bei allen PCR-Reaktionen gewählt (wenn nicht anders angegeben):

Konzentration der Ausgangs-DNA:	~1 ng/ μl
Konzentration der dNTPs:	200 μM
MgCl ₂ -Konzentration:	2,5 mM
Konzentration der Primer:	200 nM
Konzentration der Taq-Polymerase:	1U/40 μl

Die *Annealing*-Temperatur von Oligonukleotidprimern wurde mit folgender empirischen Formel errechnet:

$$\textit{Annealing-Temperatur} = (\text{Anzahl der G- und C-Basen} \times 4^{\circ}\text{C} + \text{Anzahl der A- und T-Basen} \times 2^{\circ}\text{C}) - 5^{\circ}\text{C}$$

Zielgerichtete Mutagenese

Zielgerichtete Mutagenesen wurden mittels PCR-Amplifikation doppelsträngiger Plasmide durchgeführt. Die gewünschte Mutation befindet sich in zwei zueinander komplementären ~30meren Oligonukleotiden. Die Verwendung von Pfu-Polymerase gewährleistet

höchstmögliche Genauigkeit für die *in vitro*-Replikation der Ausgangsplasmide. Diese wurden mit DpnI degradiert und die *in vitro* replizierten mutanten Plasmide in kompetente TOP10F'-Zellen transformiert.

Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR)

Erststrang-Reaktionen zur Herstellung von cDNA wurden mit MMLV-Reverser Transskriptase (Gibco) oder dem *Robust 1 RT-PCR Kit* (Finnzymes) mit thermostabiler AMV-Reverser Transskriptase auf Gesamt-RNA durchgeführt. cDNAs wurden, wenn nicht anders angegeben, mit oligo-dT-Primern hergestellt. Die anschließenden PCR-Reaktionen wurden mit Taq-Polymerase (Sigma, NEB), LA-Taq-Polymerase (Takara) oder Pfu-Polymerase (Promega) durchgeführt.

RT-PCR-Expressionsanalyse

Als Ausgangsmaterial für RT-PCR-Gewebeexpressionsanalysen wurden humane cDNAs der Firma Clontech (*Multiple Tissue cDNA (MTC) panels I & II* und *human Immune System (IS) panel*) gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet. Die cDNAs wurden aus poly-Adenylierter Gewebe-RNA von Gruppen mehrerer Spender hergestellt und sind auf drei unterschiedliche *housekeeping*-Gene normalisiert. Die Rückwärtsprimer wurden komplementär zur 3'-UTR gewählt, um die Amplifikation homologer Sequenzen auszuschließen. Ferner lagen die Primer innerhalb verschiedener Exons, um eine Amplifikation von genomischer DNA auszuschließen, bzw. erkennen zu können.

Klonierung von PCR-Fragmenten

Die Klonierung von PCR-Fragmenten erfolgte mit dem *TOPO TA Cloning® Kit* (Invitrogen) oder dem *pGEM-T Cloning Kit* (Promega) gemäß den Anweisungen der Hersteller. Zur Klonierung von Pfu-Polymerase generierten DNA-Fragmenten wurden diese für ≥ 20 min mit Taq-Polymerase und 50 μ M dATPs bei 72°C inkubiert um die für eine TA-Klonierungsreaktion benötigten überhängenden Adeninbasen anzufügen.

Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte durch die Firma MWG Biotech AG (Ebersberg).

Klonierung der humanen und murinen p120-cDNAs

Die Klonierung der p120 cDNA des Menschen erfolgte mittels RT-PCR auf Gesamt-RNA einer lymphoblastoiden Zelllinie. Die Erststrangsynthese erfolgte mit 1 µg RNA, 50 ng oligo-dT-Primern und Robust RT-Transkriptase (Finnzymes) für 1 h bei 56°C. Vorherige Versuche mit MMLV-RT bei 37°C schlugen allesamt fehl. Anschließend wurde eine nested-PCR mit Taq-Polymerase und den Primerkombinationen shPRAM-fwd3 und shPRAM-rev3, sowie shPRAM-fwd4 und shPRAM-rev5 durchgeführt. Taq-Polymerase zeigte die größte Sensitivität und amplifizierte als einziges der verwendeten Enzyme Fragmente in der erwarteten Größe. Polymerasen mit Fehlerlesekorrektur (z.B. Pfu, Promega) amplifizierten keine Fragmente in der erwarteten Größe. Die murine cDNA wurde nach der gleichen Methode aus der Gesamt-RNA der Milz einer BL/6-Maus amplifiziert. Die Primerkombinationen waren: smFyb-fwd4 und smFyb-rev6, sowie smFyb-fwd5 und smFyb-rev7. Die PCR-Produkte wurden in pCRII-TOPO (Invitrogen) ligiert und sequenziert.

Klonierung der humanen NBP64-cDNA

Die komplette NBP64 cDNA wurde ausgehend von humaner Lymphknoten-cDNA (Clontech) in vier überlappenden Fragmenten á ~2,5 kb per *nested*-PCR amplifiziert und in Klonierungsvektoren ligiert. Das am weitesten 5' gelegene Fragment, welches das vermutliche Start-Codon enthält wurde mit den Primerkombinationen orf64-fwd2 und orf64-rev3, bzw. orf64-fwd3 und orf64-rev4 mit LA-Taq (Takara) amplifiziert und in das Plasmid pCRII-TOPO (Invitrogen) ligiert. Entsprechendes gilt für die darauffolgenden Fragmente, die mit den Primerkombinationen fwd7 und rev8, bzw. fwd8 und rev9, bzw. mit den Primerkombinationen fwd9 und rev6, bzw. fwd10 und rev7 amplifiziert wurden. Das am weitesten 3' gelegene Fragment, welches das Stop-Codon enthält, wurde mit den Primerkombinationen fwd4 und rev1, bzw. fwd5 und rev2 mit Pfu-Polymerase (Promega) amplifiziert und in den Vektor pGEM-T (Promega) ligiert. Die Integrität der amplifizierten Fragmente wurde durch Sequenzierung und Vergleich mit Datenbanksequenzen überprüft. Aufgrund von singulären Schnittstellen in den überlappenden Bereichen lassen sich die Fragmente zu einer vollständigen cDNA zusammenligieren.

Biochemische Methoden

Stimulation von B-Zellen über den BCR

Zellen wurden der Kultur entnommen und mit PBS gewaschen. Zur Reduzierung durch FCS-Bestandteile ausgelöster Tyrosinphosphorylierungen wurden die Zellen anschließend für ca. 1

h in RPMI 1640 ohne Zusätze bei 37°C inkubiert. Zur Stimulation wurde die Zellzahl mit RPMI ohne Zusätze je nach Experiment auf 1×10^7 bis 3×10^7 pro ml eingestellt, 10-12 µg eines anti-Immunglobulin-Antikörpers hinzugegeben und bei 37°C inkubiert. Ca. 20 s vor Ablauf der Stimulationszeit wurden die Zellen in einer Mikrozentrifuge sedimentiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 200 µl Lysispuffer pro 1×10^7 Zellen für 15 min auf Eis lysiert. Unlösliches Material, i.e. v.a. Zellkerne, wurde im Anschluß durch Zentrifugation mit $16000 \times g$ bei 4°C sedimentiert. Das geklärte Lysat wurde entweder mit $\frac{1}{2}$ Volumen SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min auf 95°C erhitzt oder für Affinitätsreinigungen eingesetzt.

Stimulation von Zellen mit Pervanadat/H₂O₂

Die Stimulation erfolgte wie oben beschrieben, jedoch mit 40 µM Pervanadat/H₂O₂. Pervanadat/H₂O₂ wurde wie folgt hergestellt: 100 µl 50 mM Natrium-Orthovanadat wurden mit 30 µl 30%igem H₂O₂ gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Es ist eine sofortige Gelbfärbung der Lösung zu beobachten. Anschließend wurde die Lösung durch Zugabe von 520 µl ddH₂O 1:5 verdünnt. Zur Stimulation wurden 5 µl dieser 1:5-Verdünnung pro ml Zellsuspension eingesetzt.

Affinitätsreinigungen mit Antikörpern, GST-Fusionsproteinen oder Peptiden

Für Affinitätsreinigungen mit Antikörpern (Immunpräzipitationen) wurden Lysaten von stimulierten (s.o.) oder unstimulierten Zellen zwischen 1 und 4 µg des präzipitierenden Antikörpers sowie 15 µl Protein-G-Sepharose (*4 Fast Flow*, Amersham) zugesetzt. Alternativ wurden 10 µg/ml an Glutathion-Sepharose (*4 Fast Flow*, Amersham) gebundene GST-Fusionproteine verwendet. Für Affinitätsreinigungen mit N-terminal biotinylierten Ig-α-Peptiden wurden diese in einer Konzentration von 2 µM eingesetzt und den Lysaten 15 µl Streptavidin-Agarose zugesetzt. Nach Inkubation für ≥ 1 h bei 4°C unter sanftem Invertieren wurde das Sorbens dreimal mit je 1 ml Lysispuffer gewaschen, mit 30 µl SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 min auf 95°C erhitzt und anschließend durch Immuno-Blotting analysiert.

Kompetitionsexperimente mit Peptiden

Für Kompetitionsexperimente wurden N-terminal biotinylierte Ig-α-Peptide den Lysaten in einer Konzentration von 2 µM zugesetzt.

Expression und Isolierung von GST-Fusionsproteinen

GST-Fusionsproteine wurden mit Vektoren der pGEX-Serie (Amersham) in *E.coli*-BL21-Zellen in 2 x YT-Medium mit 100 μ M IPTG bei 37°C oder Raumtemperatur (PH-Domänenhaltige Proteine (!)) exprimiert. Der Zellaufschluß erfolgte mittels Ultraschall (Branson Sonifier), die Affinitätsreinigung mit Glutathion-Sepharose (GSH-Sepharose, 4 Fast Flow, Amersham).

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Diskontinuierliche SDS-PAGE wurde mit dem System der Firma BioRad durchgeführt. Standardmäßig wurden 9%ige Acrylamidgele verwendet. Der Gel-Lauf wurde bei konstanter Stromstärke durchgeführt (Minigele: 25 mA/Gel, ~1-1,5 h; große Gele: 10-14 mA/Gel, ~12-15 h).

Western-Blot-Analyse

Der Transfer der durch SDS-PAGE getrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte mittels *Semi-Dry-Blotting* (BioRad) bei konstanten 16 V in 45 min. Anschließend wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in PBST + 5% Magermilchpulver inkubiert. Die Immundetektion spezifischer Proteine erfolgte durch Inkubation der Membran mit einem spezifischen Antikörper in geeigneter Verdünnung in PBST + 5% BSA & 0,01% Natriumazid. HRPO-gekoppelte Zweitantikörper (Perbio) wurden in einer 1:10.000-Verdünnung verwendet. Die Entwicklung der Membran erfolgte mit dem ECL-System (Amersham).

Herstellung von Antiseren in Kaninchen

Die Produktion von Kaninchen-Antiseren gegen KLH-gekoppelte Peptide aus Maus-p120 wurde von der Firma Eurogentec (Belgien) durchgeführt. Es wurden je zwei N-terminal gelegene Epitope (Peptide 1 und 2, Kaninchen 42 und 43), sowie zwei C-terminal gelegene Epitope (Peptide 3 und 4, Kaninchen 76 und 77) zur Immunisierung von jeweils zwei Kaninchen eingesetzt. Folgende Epitope wurden ausgewählt:

1. NH₂-CWESEPLEPRKELHPSRPPK-CONH₂
2. NH₂-VHEDRRSVPAGNQEAM-CONH₂
3. NH₂-DLGPRSQDDSQDGIYDDVD-CONH₂
4. NH₂-EKNRMEKEEKLFRERF-CONH₂

Die vier erhaltenen Antiseren erhielten die Bezeichnungen 42, 43, 76 und 77 -I1 (Immunisierung 1), -B1 (*Boost* 1) und -B2 (*Boost* 2). (PI: Prä-Immunsrum)

DATENBANKEN UND SOFTWARE

Ausgewählte Internet-Adressen von Datenbanken und Plattformen mit Links zu Software für die Molekularbiologie

www.ncbi.nlm.nih.gov

www.expasy.org

www.ebi.ac.uk/Tools/

www.sanger.ac.uk/Software/Pfam

www.smart.embl-heidelberg.de

Sequenzanalyse-Software

Clone Manager 7

pDRAW 3.1

Jellyfish 3.0

www.expasy.org

ERGEBNISSE

IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON INTERAKTIONSPARTNERN DES ADAPTERPROTEINS SLP-65

SLP-65 bindet unabhängig von phosphorylierten ITAM-Tyrosinresten an Ig- α /Ig- β

Zur Identifikation von Bindepartnern des Adapterproteins SLP-65 wurden Affinitätsreinigungen mit einem Fusionsprotein aus der Glutathion-S-Transferase und SLP-65 (GST-SLP-65) aus Lysaten der humanen B-Zelllinie Ramos durchgeführt. Anti-Phosphotyrosin Western-Blot-Analyse der affinitätsgereinigten SLP-65-Bindepartner zeigt Phosphoproteine mit relativen molekularen Massen von $\sim 40 - 50$ kDa aus BCR-stimulierten Zellen (Abb. 9, oberer Ausschnitt, Spur 8). Die gleichen Phosphoprotein-Banden werden durch Affinitätsreinigung mit anti-Ig- β Antikörpern oder der Tandem-SH2-Domäne der PTK Syk (GST-Syk[SH2]₂) isoliert, die spezifisch an phosphoryliertes Ig- α /Ig- β bindet^{92,97,98} (Spuren 2 und 4). Immunoblotting derselben Membran mit anti-Ig- β Antikörpern ergab, daß es sich bei der stimulationsabhängig auftretenden 40 kD-Phospho-Bande um Ig- β handelt (Abb. 9, unterer Ausschnitt). Das diffuse Erscheinungsbild der Phosphobanden ist auf die starke Glykosylierung von Ig- α und Ig- β in humanen B-Zellen zurückzuführen, die das Laufverhalten in der SDS-PAGE stark beeinflusst²⁷. Die ITAM-Tyrosinreste von Ig- α und Ig- β sind gut charakterisierte Bindestellen für SH2-Domänen von Syk-PTKs. Um zu überprüfen, ob die Assoziation von SLP-65 an Ig- α /Ig- β ebenfalls über das phosphorylierte ITAM erfolgt, wurden phosphorylierte ITAM-Peptide aus Ig- α (Abb. 10 b) zur Konkurrenz der Bindung eingesetzt. Erwartungsgemäß kann die Bindung von Syk-SH2-Domänen an Ig- α /Ig- β durch Zugabe des doppelt phosphorylierten (p-PepI), nicht jedoch des unphosphorylierten ITAM-Peptids (PepI) blockiert werden (Abb. 9, Spuren 5 und 6). Die Bindung von SLP-65 an BCR-Komponenten wird durch Zugabe dieser Peptide jedoch nicht beeinflusst (Spuren 9 und 10). Dies führte zu der Überlegung, daß diese Assoziation über Bindestellen außerhalb des ITAMs vermittelt wird.

Die Interaktion zwischen GST-SLP-65 und Ig- α /Ig- β erfolgt über das außerhalb des Ig- α -ITAMs gelegene Tyrosin an Position 204

Um zu überprüfen, ob die SLP-65 SH2-Domäne für die Bindung an Ig- α /Ig- β verantwortlich ist, wurde eine punktmutierte Variante von GST-SLP-65, in der die SH2-Domäne durch Austausch eines Arginins durch Leucin inaktiviert wurde (GST-SLP-65RL), für

Affinitätsreinigungen aus Ramos-Lysaten eingesetzt. Die Inaktivierung der SLP-65 SH2-Domäne führt zu einem vollständigen Verlust der stimulationsabhängigen Interaktion mit Ig- α /Ig- β (Abb. 10 a, oberer und mittlerer Ausschnitt, Spuren 3 und 4) wogegen die Bindung anderer Phosphoproteine, wie PLC- γ 2 unbeeinflusst ist (Abb. 10 a, oberer und unterer Aus-

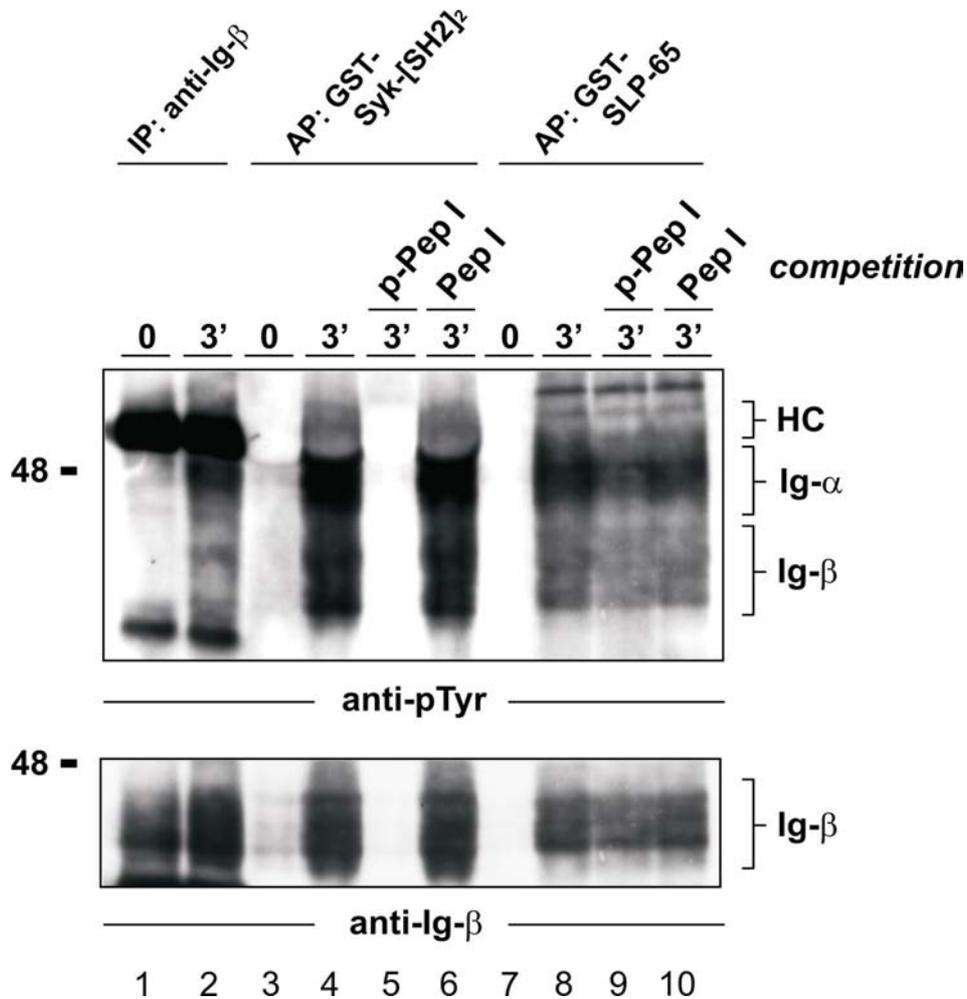


Abb. 9: Aus Lysaten unstimulierter (Spuren 1, 3 und 7) oder für 3 min BCR-stimulierter Ramos B-Zellen (Spuren 2, 4-6 und 8-10) wurden Affinitätsreinigungen mit anti-Ig- β Antikörpern (Spuren 1 und 2) oder GST-Fusionsproteinen mit den Tandem-SH2-Domänen der PTK Syk (GST-Syk[SH2]₂) (Spuren 3-6) oder komplettem Maus-SLP-65 (GST-SLP-65) (Spuren 7-10) durchgeführt. Die Bindung zellulärer Proteine wurde durch Zugabe von 2 μ M doppelt phosphoryliertem (p-PepI) oder unphosphoryliertem Ig- α -ITAM-Peptid (PepI) kompetitiert. Die isolierten Proteine wurden mittels anti-Phosphotyrosin-Immunoblot analysiert (oberer Ausschnitt). Nach Entfernung gebundener Antikörper wurde die Membran mit Antikörpern gegen Ig- β inkubiert und entwickelt (unterer Ausschnitt). Die relativen molekularen Massen eines Molekulargewicht-Standards sind in kDa angegeben.

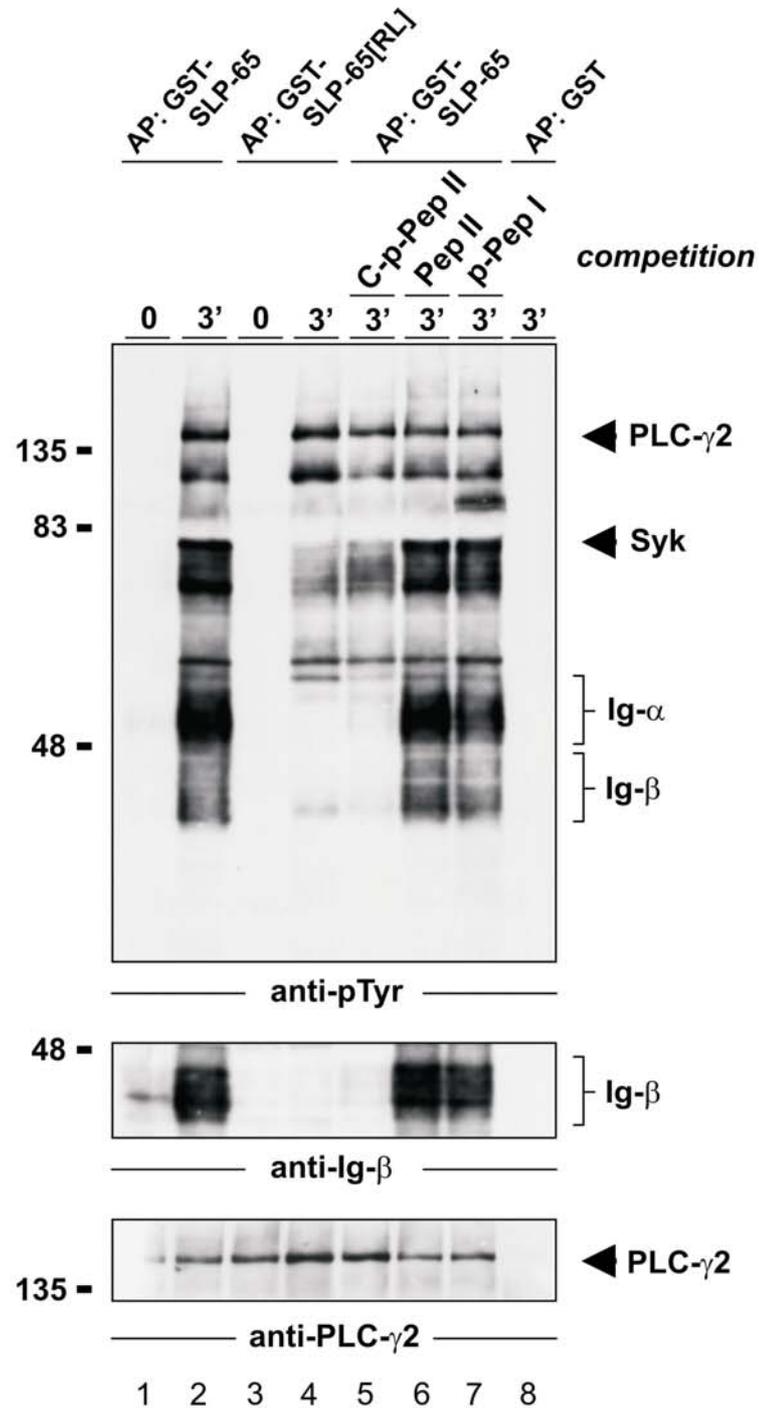
schnitt). Die Bindung von PLC- γ 2 an (unphosphoryliertes (!)) GST-SLP-65 ist stimulationsunabhängig und verläuft daher vermutlich über die PLC- γ SH3-Domäne. Um eine mögliche Rolle anderer Tyrosinreste in Ig- α /Ig- β bei der Interaktion mit SLP-65 zu untersuchen wurden Phosphopeptide hergestellt, die das Ig- α Tyrosin an Position 204 (Y₂₀₄) beinhalten (PepII) (Abb. 10 b). Y₂₀₄ ist in allen bisher daraufhin untersuchten Spezies konserviert, auch der Abstand zu den ITAM-Tyrosinen ist konserviert²³². Konkurrenz mit an Y₂₀₄ mono-phosphoryliertem PepII (C-p-PepII) führt zur Inhibition der Bindung von SLP-65 an Ig- α /Ig- β , wogegen weder unphosphoryliertes PepII noch doppelt phosphoryliertes ITAM-Peptid (pPepI) Einfluß auf die Bindung haben (Abb. 10 a, vgl. Spuren 5-7). Das Phosphobandenmuster, das man nach Konkurrenz mit C-p-PepII erhält, gleicht in auffälliger Weise demjenigen nach Affinitätsreinigung mit GST-SLP-65RL (vgl. Spuren 4 und 5), was demonstriert, daß dieses Peptid die SLP-65-SH2-Domäne effizient blockiert. Um die direkte Interaktion von phospho-Y₂₀₄ mit SLP-65 zu überprüfen, wurden verschiedene biotinylierte Ig- α -Phosphopeptide für eine Affinitätsreinigung aus Ramos-Lysaten eingesetzt. SLP-65 kann sowohl mit dem mono-phosphorylierten C-p-PepII als auch mit doppelt phosphoryliertem p-PepII isoliert werden (Abb. 11, oberer Blot, Spuren 4 und 5), während das nicht-phosphorylierte PepII oder ITAM-Peptide nicht oder nur marginal mit SLP-65 assoziieren (Spuren 1 bis 3 und Spur 6). Die PTK Syk hingegen assoziiert spezifisch mit dem doppelt phosphorylierten ITAM-Peptid (Abb. 11, unterer Blot, Spur 1), nicht jedoch mit den anderen verwendeten Phosphopeptiden, auch nicht mit dem doppelt phosphorylierten p-PepII, obwohl der Abstand der beiden Phosphotyrosinreste mit demjenigen der ITAM-Tyrosine identisch ist.

Diese Experimente zeigen, daß SLP-65 mittels seiner SH2-Domäne direkt mit dem aktivierten BCR interagieren kann, und daß diese Interaktion über eine bis dato unbekannte Phosphorylierungsstelle in Ig- α , Y₂₀₄, verläuft. Ferner zeigen sie, daß die Ig- α Tyrosinreste Y₁₉₃ und Y₂₀₄ kein alternatives ITAM darstellen.

SLP-65 assoziiert mit Ig- α /Ig- β in vivo

Um die *in vitro*-Beobachtungen *in vivo* zu überprüfen wurde aus Lysaten unstimulierter und BCR-stimulierter Ramos-B-Zellen eine Affinitätsreinigung mit anti-Ig- β Antikörpern durchgeführt und die co-präzipitierten Proteine mit Antikörpern gegen SLP-65 untersucht. In ruhenden Zellen ist nur eine schwache Interaktion zwischen dem Ig- α /Ig- β -Heterodimer und SLP-65 zu sehen, nach BCR-Aktivierung hingegen ist ein starker Anstieg dieser Assoziation zu beobachten (Abb. 12, vgl. Spuren 1 und 2).

A



B

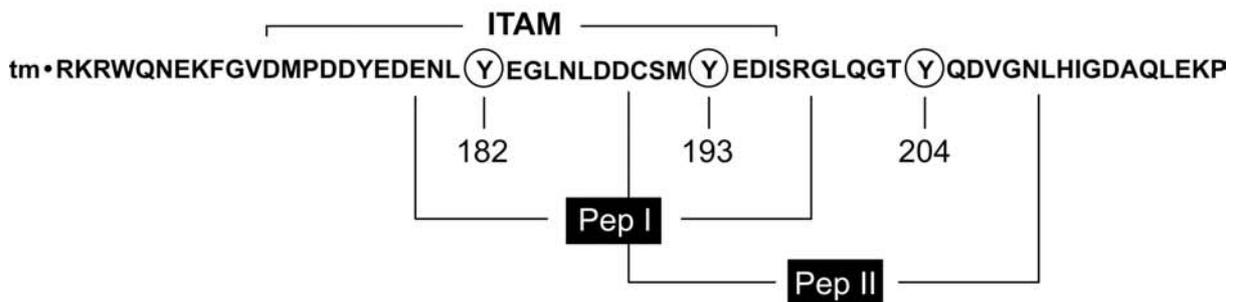


Abb. 10: (a) Aus Lysaten unstimulierter (Spuren 1 und 3) oder für 3 min BCR-stimulierter Ramos B-Zellen (Spuren 2 und 4-8) wurden Affinitätsreinigungen mit GST-Fusionsproteinen mit entweder wildtypischem SLP-65 (GST-SLP-65) (Spuren 1 und 2, sowie 5-7) oder einer Mutante von SLP-65, in der die SH2-Domäne durch den Austausch eines Argininrest gegen Leucin inaktiviert wurde (GST-SLP-65[RL]) (Spuren 3 und 4) durchgeführt. Die Bindung zellulärer Proteine wurde durch Zugabe von 2 μ M Ig- α -Peptiden kompetitiert. Isolierte SLP-65 Bindepartner wurden durch anti-Phosphotyrosin Immuno-Blotting untersucht (oberer Ausschnitt). Nach Entfernung gebundener Antikörper wurde die Membran mit Antikörpern gegen Ig- β oder PLC- γ 2 entwickelt (mittlerer, bzw. unterer Ausschnitt). Die relativen molekularen Massen eines Molekulargewicht-Standards sind in kDa angegeben. (b) Lokalisierung der Peptide PepI und PepII innerhalb der cytoplasmatischen Sequenz von Maus-Ig- α . tm: Transmembranregion.

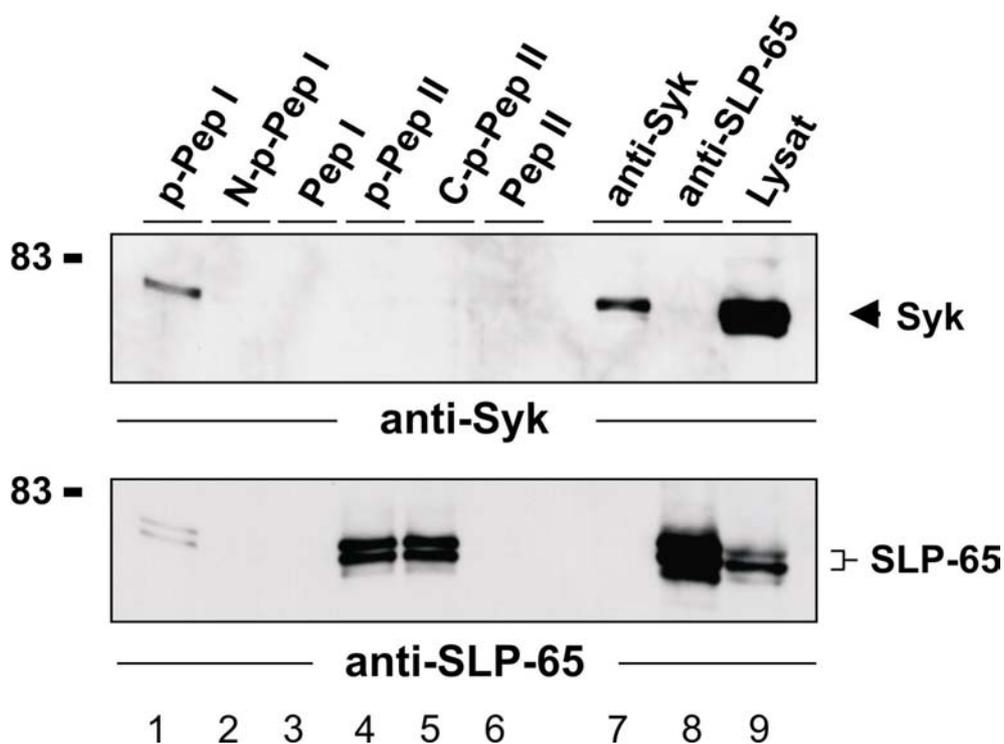
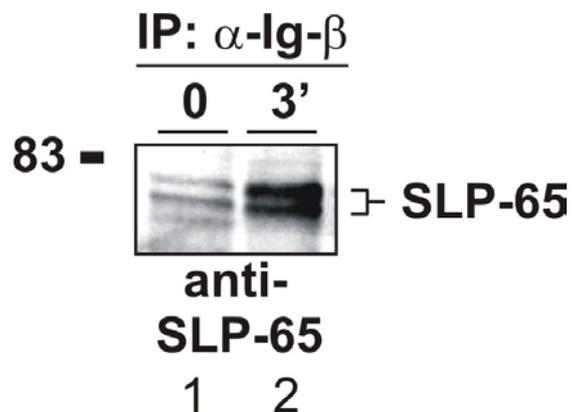


Abb. 11: Proteine aus Lysaten unstimulierter Ramos B-Zellen wurden mit den N-terminal biotinylierten Ig- α -Peptiden p-PepI, N-p-PepI, PepI, p-PepII, C-p-PepII und PepII (Spuren 1-6) oder Antikörpern gegen Syk (Spur 7), bzw. gegen SLP-65 (Spur 8) affinitätsgereinigt. Die isolierten Proteine und Zellysate (Spur 9) wurden mittels Immuno-Blotting mit Antikörpern gegen Syk (oberer Blot) bzw. SLP-65 (unterer Blot) analysiert. Die relativen molekularen Massen eines Molekulargewicht-Standards sind in kDa angegeben.

Abb. 12: *Ig- α /Ig- β* Heterodimere wurden aus Lysaten unstimulierter (Spur 1) oder 3 min BCR-stimulierter Ramos B-Zellen (Spur 2) mit Antikörpern gegen humanes Ig- β affinitätsgereinigt. Die isolierten Proteine wurden anschließend mit anti-SLP-65-Antikörpern im Western-Blot analysiert. Die relativen molekularen Massen eines Molekulargewicht-Standards sind in kDa angegeben.



Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden 2001 unter dem Titel „Association of SLP-65/BLNK with the B cell antigen receptor through a non-ITAM tyrosine of Ig- α “ veröffentlicht¹⁵⁵.

UNTERSUCHUNG DER ROLLE VON SLP-65 FÜR LMP2A-VERMITTELTE SIGNALLEITUNGSEREIGNISSE

LMP2A induziert die konstitutive Tyrosinphosphorylierung von SLP-65, nicht jedoch von PLC- γ 2

Zur Untersuchung einer möglichen Funktion von SLP-65 an LMP2A-vermittelten Signalleitungsmechanismen wurden SLP-65-organisierte Proteinkomplexe in LMP2A-positiven, EBV-transformierten B-Zellen (lymphoblastoide Zelllinien, LCLs) untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß SLP-65 in unstimulierten LCLs konstitutiv Tyrosinphosphoryliert vorliegt und diese Phosphorylierung durch BCR-Stimulation nicht verstärkt werden kann²³⁰. Im Gegensatz dazu ist eine Tyrosin-Phosphorylierung der PLC- γ 2 sowohl in ruhenden, als auch in BCR-stimulierten LCLs nicht detektierbar (Abb. 13, oberer Ausschnitt, Spuren 1-6). Obwohl SLP-65 in LCLs konstitutiv Tyrosin-phosphoryliert vorliegt, assoziiert es nicht, oder nur in geringem Maße, mit PLC- γ 2 (Abb. 13, mittlerer Ausschnitt, Spuren 1 bis 6). In EBV-negativen Ramos-B-Zellen hingegen erfolgt eine starke durch BCR-Stimulation induzierte Assoziation von SLP-65 mit PLC- γ 2 (Abb. 13, Spuren 7 und 8).

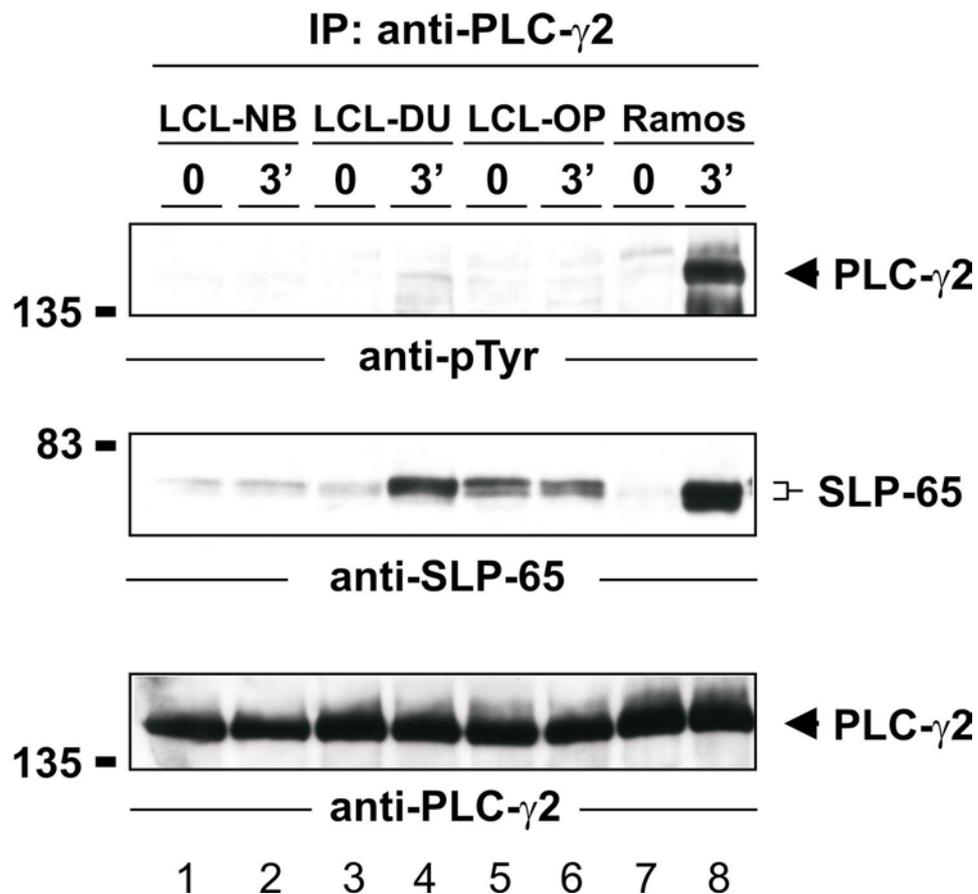


Abb. 13: Aus Lysaten unstimulierter LCLs (Spuren 1, 3 und 5) und Ramos B-Zellen (Spur 7) sowie 3 min BCR-stimulierter Zellen (Spuren 2, 4, 6 und 8) wurden Affinitätsreinigungen mit anti-PLC- γ 2-Antikörpern durchgeführt. Die isolierten Proteine wurden mit anti-Phosphotyrosinantikörpern (oberer Ausschnitt) und nach Entfernung gebundener Antikörper mit Antikörpern gegen SLP-65 (mittlerer Ausschnitt), bzw. PLC- γ 2 (unterer Ausschnitt) analysiert. Die relativen molekularen Massen eines Molekulargewicht-Standards sind in kDa angegeben.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden 2001 unter dem Titel „*Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 2A (LMP2A) Employs the SLP-65 Signaling Module*“ veröffentlicht²³⁰.

IDENTIFIZIERUNG NEUER SIGNALLEITENDER ELEMENTE IN LYMPHOCYTEN*p120 ist ein neues Adapterproteinen mit Homologie zu ADAP und PRAM-1*

Neben dem biochemischen Ansatz, neue Bindepartner für die SLP-65-SH2-Domäne zu identifizieren, der zur Entdeckung der Interaktion mit phosphoryliertem Ig- α führte, wurden in einem „*in silico*“-Ansatz mittels Suche in Sequenzdatenbanken nach Proteinen mit Konsensus-Bindestellen für SLP-SH2-Domänen gesucht. Mit dieser Methode konnte ein *expressed sequence tag* (EST) mit Sequenzhomologie zur cDNA des Adapterproteins ADAP (SLAP-130, Fyb) identifiziert werden, das einen gut charakterisierten Bindepartner der SLP-76-SH2-Domäne darstellt. Ausgehend von diesem EST, der das offene Leseraster für den C-Terminus eines unbekanntes Proteins enthielt, welches große Sequenzhomologie zu den C-terminalen SH3-Domänen von ADAP und PRAM-1 aufwies, konnten weitere überlappende ESTs identifiziert werden. Die Assemblierung vieler ESTs anhand von Sequenzüberlappungen ermöglichte das Erstellen eines durchgängigen offenen Leserasters von ~ 2,3 kb. Die davon abgeleitete Primärsequenz des humanen Proteins mit einer Länge von 729 Aminosäuren weist Merkmale eines klassischen Adapterproteins auf. Das Protein mit einer theoretischen molekularen Masse von ca. 120 kDa (im folgenden als p120 bezeichnet) besitzt keine bekannte katalytische Domäne, aber eine SH3-ähnliche Domäne am C-Terminus. Desweiteren sind Prolin-reiche Sequenzen, sowie drei Konsensusstyrosinphosphorylierungsstellen mit der Sequenz YDDV, bzw. YEDV enthalten (Abb. 14). Diese Motive sind konserviert zwischen Maus, Mensch und Ratte (Daten nicht gezeigt) und stellen eine Bindestelle für die SH2-Domänen von SLP-Adapterproteinen dar. Die ausgeprägteste Sequenzhomologie zu ADAP und PRAM-1 besteht im Bereich der C-terminalen SH3-ähnlichen Domäne. Ferner sind die YDDV-, bzw. YEDV-Motive auch in ADAP und PRAM-1 vorhanden, teilweise an identischer Position (Abb. 15).

	1	11	21	31	41	51	61	71																			
ADAP human	MAKYNTGGMPTEDVSVNSRPPFRVTGPNSSSGIQARKNLFMNQGNASIPAGPSNVKPKFGSEKPPVAVKPSSEKPDKEPKP																										
PRAM-1 human	-----MAHLLAAMESHQDFRSIKAKFQASQPEPSDLPKPKPKP																										
p120 human	-----MEGEGVRNFKELRAKFNQLDAPLPLFGRIKFFAGVSEKGDIGGTQSTQILANGKQ---																										
Consensus		a	p	agps	p	spk	a	ps	lp	k	pkp																
	81	91	101	111	121	131	141	151																			
ADAP human	PFLKPTGAGQRFGTASLTTDEAKVGFLLVGGKPIMLPKEDSKITFPWPPGMPKSLHSVNDQDHLKLLGPKSGPTTP																										
PRAM-1 human	ETGKLLKFFSQPELSEHPQKAPLPEFGAVSLKHPQSQFTDLPKKPPPVEVTDLPKKPPPEVTDLPKKPPP-----																										
p120 human	-----LSSNHKQRTYCSSESQQLQPKTKLAQKSEIKCSNSPGPLGKSTVCSATSSQKAS-----																										
Consensus	f	k	q		k	r	pe		l	kp	qq	i	lp	kk	p		pg	p	v		kp						
	161	171	181	191	201	211	221	231																			
ADAP human	TSENEQKQAFPKLTGVKGGKFMASQDEPKPLFFKPAFGQRPPLSTENSHEDESPMMKNVSSSKGSPALVGRVSKSPLKP																										
PRAM-1 human	-----EVIDLPKPPPEATDLPKKEPPPEVTDLPKKPPPPEVTDLPKKPPPPEVTDLPKKPPP																										
p120 human	-----LLEVTSQSNVEIITKEKVMVANSFRNKLVNWEKVVSSQKSEMSSALLLANYSKAI																										
Consensus				dl	kp	p		kkp	e		p	vss	k	p		g	k										
	241	251	261	271	281	291	301	311																			
ADAP human	ARDSEKNDHAGISSLPFGVWLKFAASRGGPGVSKNGEKKEDRKIDAAKNTFQSKINQDELASGTFPARFPKAPSKL																										
PRAM-1 human	KLLLDLKKKFFQLGATFPFRKPLQPEVGEAPLKASLPEPGAPARKPLQPDLSHPARPPSEPKSGAFFRKLQPEAGEA																										
p120 human	HLLGQKGMGLTPEPRKKLETGGAQLTLPQKHVVAPKILLHNVEDPSFVSIQHIRKSWENPPERSPASSPCQPIYECLEL																										
Consensus	le	s	pe	p	fp	k	l	q	p	s	ask	ed	s	n	ep	s	p	p	el								
	321	331	341	351	361	371	381	391																			
ADAP human	TYGGWQSQEKEKGDKNSATPKQKPLPLFTLGPPEPPNRPNNWDLTKHKTSSGNSTSKGQTSYSTTSLPPPFSHP																										
PRAM-1 human	TPRSQPELSTFPKPAQPEFNVYPKKPQPOVQGLKKSVPQEFSEAAQTPLWKQSEPKRDSAFPKKASQPLPSD																										
p120 human	ASQA-----EKQPDVRHHHLRKTPLPSIDSLGPPPPSRPPIVNLQAFQRQPAAVPKTQGEVTVEEGSLPERLFMA																										
Consensus	t	p	ek	k		pk	kl	pp	lg	pp	pp	kp	r	pp	v	l	af		s	g	s	sl	p	pp			
	401	411	421	431	441	451	461	471																			
ADAP human	ASQPLPASHPSQPPVPLPPRNKPPFDLKSFVNDQMGVTHSDGAGNLDEEQDSEGETYEDIAEKEREKREKEEK																										
PRAM-1 human	FPKKPQPELGDLTRTSEPEVSVLKRPRPAEFKALSKKPPPELGLLERTSEPEFNSLPRKLLQFERRGPRKFSQP																										
p120 human	EFEEHNYEATISYLRHGNSINLCTAKEIADFTYEVGIEELKPGKNFPYPEPSAKHEDKRMKEKQPCELKPKNTEKEP																										
Consensus	p	e		s	p	n	p		p	e	q	g	p	e		k	qp	er	pk	r	ep						
	481	491	501	511	521	531	541	551																			
ADAP human	KPLELEKEQKEKKEQEIK-----KKFKLTGPIQWHLAKACCDVKGKNE-LSFRQGGQIIRIRIDNPEGKW																										
PRAM-1 human	EPSAVLKRHPQPEFFGDLPRK-----PPLPSSASESSLPAAVAGFSRHLSPGFGAAGTPRWRSGGLVHSGGARP																										
p120 human	YSNHVFDVACGTPKIQMNVHTGRNMLAGQEAAMDIIQTNPCEGPKLARHSQGHCHLVEVLESTKEIPDLGVSK																										
Consensus	v	k	e	k		k	a	i	a	a	k		e	es	t	g											
	561	571	581	591	601	611	621	631																			
ADAP human	LGRTARGSYGIYKTTAVEIDYDSLKLEKDSLGAQSRPIEDDQEVYDDVAEQDDISSHSQSGSGGIFPPPPD-----DIYD																										
PRAM-1 human	GLPSPHPPRRRPLPPASSLGHPAPKPLPPGPDVMDQSFRRPSAASIDLRRTRSAAAGLHFQDRQPEDIQVPP-----EIYE																										
p120 human	TSSISEEIIDVVEYSRKEVPKLNYSLSLASSSEENRELYEDVYKTKMNYPKIDLQKEALKRLQQFFKKEKRFKIKKTK																										
Consensus	r	s	y		a	e	k	l	s	r	d	d	d	g	r	f	p	d	iy								
	641	651	661	671	681	691	701	711																			
ADAP human	GIEEDADDGFPAPKQLDMGDEVYDDVITSDFPV-----SSAEMSQGTNFGKARTEEGLRK																										
PRAM-1 human	LYDDVEPRDDSSSPKGRDEAPVQQAARFPQDP-----ALFKKDPQPPQLPMDPILLKQ																										
p120 human	SKENLSAFSILLDLELKSQEVIIYDDVDLSEKESKDEDKLMWPKFLTPKKEKKNCAEESSEFSRPNFFKTKQNLE																										
Consensus	e	a	d	p	pk	d	vy	dd	v	s		ae	es		k	lk											
	721	731	741	751	761	771	781	791																			
ADAP human	LKQKEKEDPKKFKYDGEIRQLYSTKYVTTITSKKMTRDQVKGESLEVQITDDTKVLCNEEKGYGVVLSYLA																										
PRAM-1 human	LRKAEKARETRKFFFECEYVHTKMMIDPNAKTRPGGKHGIRRGEEILEVIEFSMEEHLCDPKKRYGVVPTAIL																										
p120 human	KWRMKREKLETRFKYDKIINTAVACS--NNSRMIFDPISPGEELEVDTIQNLVICRNSKGYGVVLEHID																										
Consensus	l	k	e	kek	fr	kk	f	ky	d	gei	v		r	g	dl	i	p	ge	levi	tt	vl	cn	kg	ky	gv	lr	l
	801	811	821	831	841	851	861	871																			
ADAP human	DNDGEIYDDIADGCIYDND-----																										
PRAM-1 human	PLETEVYDDVDFCDPLENQPLPLGR																										
p120 human	FKHQSWSP-----																										
Consensus	e	y	dd		n																						

Abb. 15: Vergleich der humanen Aminosäuresequenzen der Adapterproteine ADAP, PRAM-1 und p120. Konservierte Aminosäuren sind rot, vorherrschende Aminosäuren orange hinterlegt. Ähnliche Aminosäuren sind gelb, unähnliche grün hinterlegt. Die Konsensussequenz ist angegeben. Der Sequenzvergleich wurden mit Jellyfish 3.0 Software und BLOSUM-Matrix durchgeführt.

Analyse der Gewebeexpression von p120

Die Gewebeexpression von p120 wurde mittels PCR auf cDNAs verschiedener humaner Gewebe (*human Multiple Tissue cDNA (MTC) panels I & II* und *human Immune System (IS) panel*, Clontech) analysiert. Eine verhältnismäßig starke p120-Expression ist im Herzen, in der Leber sowie im Testis detektierbar. Etwas schwächer ist die Expression in der Niere, im Pankreas, im Thymus und in der Prostata (Abb. 16 a). Eine detailliertere Untersuchung der p120-Expression im hämatopoetischen System zeigt, daß p120 außer der relativ schwachen Expression im Thymus und in der fötalen Leber in keinem der untersuchten Organe exprimiert wird (Abb. 16 b). Da jedoch auch in der adulten Leber ein starkes Signal erhalten wird, läßt sich die Expression in der fötalen Leber nicht dem hämatopoetischen System zuschreiben. Die Verwendung gleicher Mengen an cDNA wurde durch Amplifikation von Transkripten der Glycerin-Aldehyd-3'-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) überprüft. Die Untersuchung der Gewebeexpression auf Proteinebene mittels Western-Blot-Analyse verschiedener Gewebelysate mit anti-p120-Antisera führte leider zu keinem Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

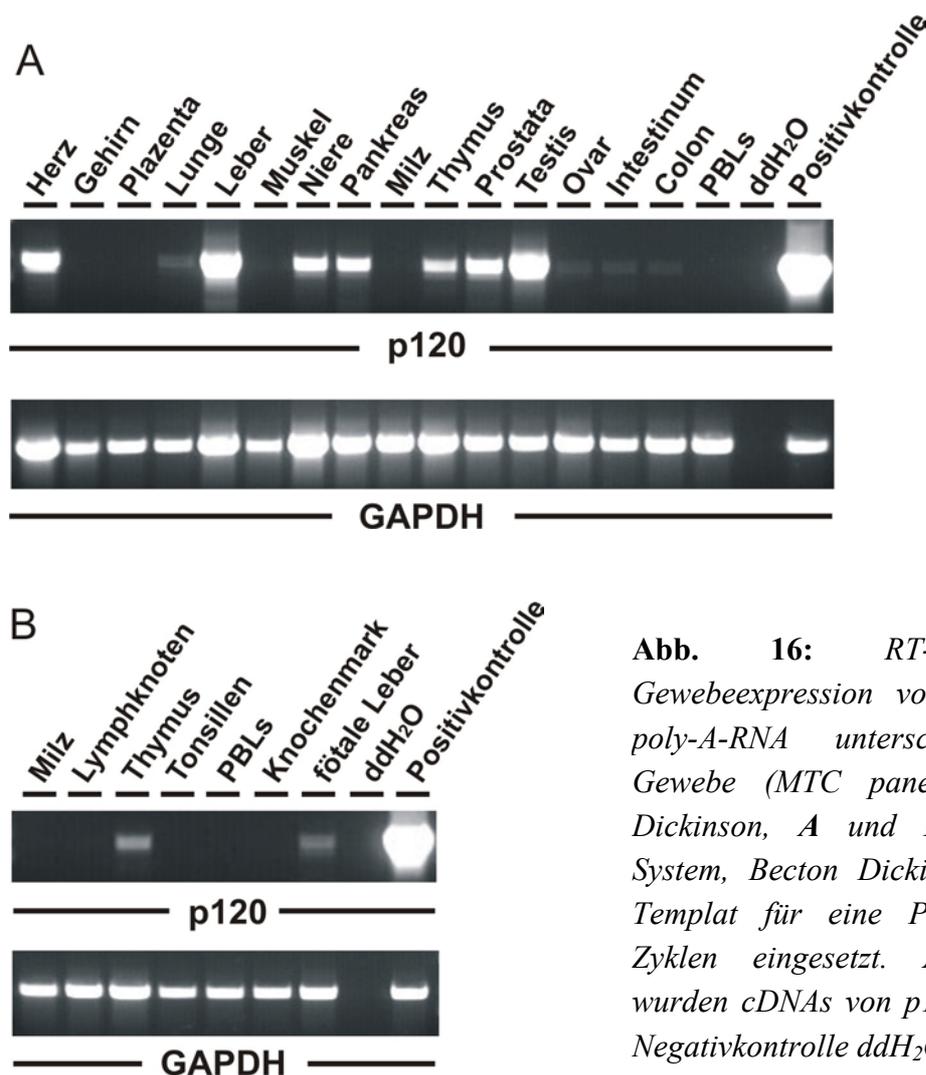


Abb. 16: RT-PCR-Analyse der Gewebeexpression von p120. cDNAs von poly-A-RNA unterschiedlicher humaner Gewebe (*MTC panels I & II*, Becton Dickinson, **A** und *MTC panel Immune System*, Becton Dickinson, **B**) wurden als Templat für eine PCR-Reaktion mit 35 Zyklen eingesetzt. Als Positivkontrollen wurden cDNAs von p120 oder GAPDH, als Negativkontrolle ddH₂O verwendet.

Klonierung der p120 cDNA aus humanen und murinen Zellen

Die humane p120 cDNA wurde mittels RT-PCR aus der Gesamt-RNA einer lymphoblastoiden Zelllinie amplifiziert. Die Erststrang-Synthese wurde mit einer temperaturstabilen reversen Transkriptase des *Avian Myeloma Virus* (AMV) (Robust RT, Finnzymes) bei 56°C durchgeführt, da konventionelle Protokolle nicht zum Erfolg führten. Anschließend wurde eine *nested*-PCR mit Taq-Polymerase durchgeführt (für experimentelle Details siehe Materialien und Methoden). Die murine cDNA wurde mit der gleichen Methode aus der Gesamt-RNA einer Milz erhalten. Die Integrität der Amplifikate wurde durch Sequenzierung überprüft. Die humane cDNA wurde vor ihrer Expression mittels zielgerichteter Mutagenese am 3'-Ende mit einer HA-Epitop-codierenden Sequenz versehen.

Transfektion von p120-HA in Fibroblasten führt zur Expression eines 120 kDa Proteins

Trotz intensiver Versuche konnte HA-markiertes p120 mit konventionellen Methoden in Lymphocyten-Zelllinien nicht exprimiert werden. Die transiente Transfektion der Fibroblasten-Zelllinie HEK293-T mit HA-Epitop-markiertem p120 führt hingegen zur Expression eines Proteins mit einer molekularen Masse von ~ 120 kDa (Abb. 17, Spur 2). Die Deletion der C-terminalen SH3-ähnlichen Domäne (p120-dSH3L) führt zu einem starken Anstieg der Expression von p120 in Fibroblasten (Abb. 17, Spur 3). Dieses Phänomen wurde in allen Experimenten beobachtet.

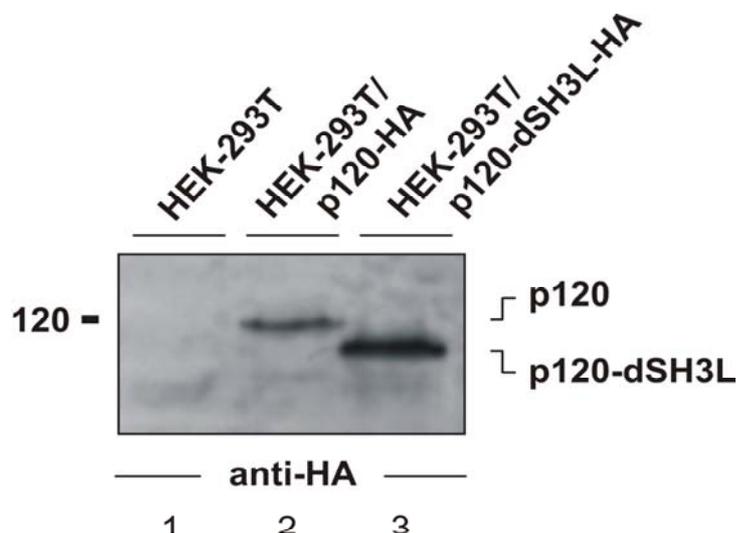


Abb. 17: Transiente Expression von HA-Epitop-markiertem p120 (p120-HA) in HEK293T-Zellen (Spur 2). Die Deletion der C-terminalen SH3-ähnlichen Domäne (p120-dSH3L-HA) führt zu einer stärkeren Expression des Proteins (Spur 3). Zell-Lysate wurden einer SDS-PAGE unterzogen und die Membran mit anti-HA-Epitop-Antikörpern entwickelt. Die relative molekulare Masse eines Molekulargewicht-Standards ist in kDa angegeben.

p120 assoziiert mit SKAP-Proteinen in vitro

Da die Expression von p120-HA in Lymphocyten-Zelllinien mit konventionellen Methoden im Rahmen dieser Arbeit nicht gelang, wurden biochemische Experimente mit transient transfizierten HEK293-T-Zellen durchgeführt. Von ADAP und PRAM-1 ist bekannt, daß beide mit Proteinen der SKAP-Familie assoziieren, und daß diese Assoziation über die SH3-Domänen der SKAP-Proteine vermittelt wird^{164,175}. Um zu überprüfen, ob auch p120 in der Lage ist mit SKAP-Proteinen zu interagieren, wurden Affinitätsreinigungen mit Fusionsproteinen aus GST und SKAP55, bzw. SKAP-HOM aus Lysaten transient transfizierter Fibroblasten durchgeführt. SKAP55 und SKAP-HOM sind beide in der Lage *in vitro* an p120 zu binden (Abb. 18, Spuren 1 und 3). Die SH3-ähnliche Domäne von p120 scheint an dieser Interaktion nicht maßgeblich beteiligt zu sein, da die Deletion dieser Domäne diese Interaktion nicht beeinträchtigt (Abb. 18, Spuren 2 und 4). Die scheinbar stärkere Bindung der Deletionsmutante ist vermutlich auf deren stärkere Expression zurückzuführen (Vgl. Abb. 18, Spuren 8 und 9, sowie Abb. 17, Spuren 2 und 3). Um die Spezifität dieser Interaktion zu demonstrieren wurde aus den selben Lysaten eine Affinitätsreinigung mit dem an GST gekoppelten Adapterprotein SH3P7 durchgeführt. SH3P7 enthält ebenfalls eine SH3-Domäne, die aber nicht oder nur mit sehr geringer Affinität an p120 bindet (Abb. 18, Spuren 5 und 6).

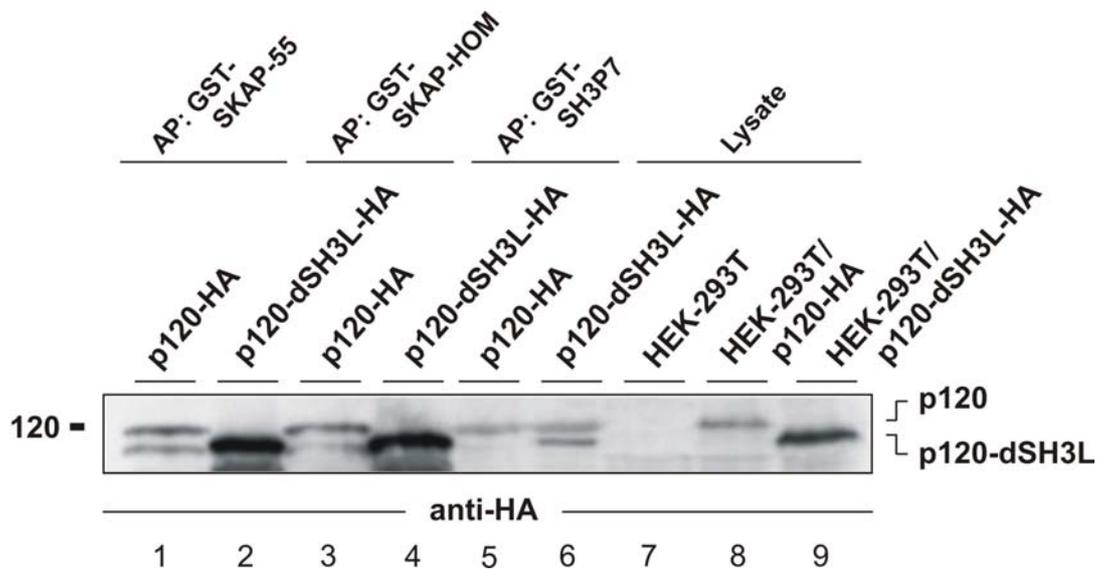


Abb. 18: Aus Lysaten transient transfizierter HEK-293T-Zellen wurden Affinitätsreinigungen mit Fusionsproteinen aus GST und SKAP55 (Spuren 1 und 2), SKAP-HOM (Spuren 3 und 4), sowie SH3P7 (Spuren 5 und 6) durchgeführt. Aufgereinigte Proteine wurden mit anti-HA-Antikörpern detektiert. Die relative molekulare Masse eines Molekulargewicht-Standards ist in kDa angegeben.

Die hier beschriebenen Arbeiten führten zur Identifikation des ersten Bindepartners der SH2-Domäne des Adapterproteins SLP-65. Dieser Bindepartner ist Ig- α , das an einem außerhalb des ITAMs gelegenen Tyrosinrest, Y₂₀₄, phosphoryliert wird. Diese Phosphorylierungsstelle mit der Sequenz YQDV bildet ein Konsensuserkennungsmotiv für die SH2-Domänen der SLP-Proteine. Die Suche in Sequenzdatenbanken nach Proteinen mit solchen SLP-SH2-Bindemotiven führte zur Identifizierung eines neuen Adapterproteins, p120, das drei YDDV bzw. YEDV-Motive enthält. p120 weist Homologie zu den bekannten SLP-76-SH2-Bindepartnern ADAP und PRAM-1 auf, scheint jedoch nicht konstitutiv in Lymphocyten exprimiert zu werden. Wie ADAP und PRAM-1 kann es *in vitro* mit Proteinen der SKAP-Familie interagieren.

Identifizierung und Klonierung der cDNA eines neuen BEACH-Domänen Proteins, NBP64

Ausgehend von der mRNA-Sequenz eines hypothetischen Gens aus B-Lymphocyten (*GenBank-Accession-No.:* AL833669) wurden mehrere ESTs identifiziert, von denen >60 % aus lymphatischem Gewebe, davon rund 80 % aus B-Lymphocyten, stammen (Daten nicht gezeigt). Anhand von Sequenzüberlappungen wurden die identifizierten ESTs zu einer „hypothetischen“ cDNA mit einem durchgehenden offenen Leseraster von ~ 9 kb zusammengefügt. Das abgeleitete Protein weist Struktur- und Sequenzhomologie mit bekannten BEACH-Domänen enthaltenden Proteinen auf. Neben einer C-terminalen BEACH-Domäne, der fünf WD-40-repeats folgen, enthält das Protein zahlreiche Konsensusstyrosinphosphorylierungsstellen (Abb. 19). Der N-terminale Bereich enthält keine Domänen bekannter Funktion, ein Abgleich mit der *Pfam* Protein-Familien Datenbank ergibt jedoch einige Bereiche, die Sequenzhomologie zu uncharakterisierten Proteinen aufweisen (Daten nicht gezeigt). Das abgeleitete Protein wird im folgenden als NBP64 (*novel BEACH domain containing protein, orf 64*) bezeichnet. Das zugehörige Gen liegt beim Menschen auf Chromosom 10 (10q23.2). Teile des Gens sind bereits als hypothetisches offenes Leseraster (Chr. 10, *open reading frame (orf) 64*) in der Datenbank deponiert. Dieses befindet sich interessanterweise in direkter „genomischer Nachbarschaft“ mit SLP-65, das ebenfalls in der Region 10q23.2 lokalisiert ist²³³.

Zur Klonierung der NBP64-cDNA wurden vier ~2,5 kb große überlappende Fragmente mittels *nested* PCR-Reaktionen aus der cDNA humaner Lymphknoten (*human Immune System cDNA-panel*, Becton Dickinson) amplifiziert (s. Materialien & Methoden). Sequenzierung der erhaltenen Fragmente ergab eine komplette Übereinstimmung mit der „*in silico*“ generierten cDNA-Sequenz (Abb. 19).


```

6931 cgctactgcttatccaacatcagcgatccggttcattttcaacctgtgcagcaagacaggtccactgaccattactcgtgccagtgccac
2311 R H C L S N I S D P F I F N L C S K D R S T D H Y S C Q C H
7021 agctacgctgacatgctgggagctacggcaggctcgcttctcctcgcaggacatcgccctggagatcttctccacaatggatattccaag
2341 S Y A D M R E L R Q A R F L L Q D I A L E I F F H N G Y S K
7111 ttcttctgtcttctacaacaatgctcgagtaagcctttaaagcttctgcttcttccaaccagcctgaaagggaagccacctcggag
2371 F L V F Y N N D R S K A F K S F C S F Q P S L K G K A T S E
7201 gacaccctcaatctaaggagataccctggctctgacaggatcatgctgcagaagtgccagaaaagggaacatcagcaattttgagtatctc
2401 D T L N L R R Y P G S D R I M L Q K W Q K R D I S N F E Y L
7291 atgtacctcaaccggctgggagacctgaacatgactacatgcagtagccactggttcccctgggtcctcgcagactacacctcagag
2431 M Y L N T A A G R T C N D Y M Q Y P V F P W V L A D Y T S E
7381 acattgaacttggcaaatccgaagattttccgggatctttcaagcccatgggggctcagaccaaggaaggaagctgaatttatccag
2461 T L N L A N P K I F R D L S K P M G A Q T K E R K L K F I Q
7471 aggtttaaagaagttgagaaaactgaaggagacatgctgctcagtagccactactacaccactactcctcgggcaatcatcgtggcctcc
2491 R F K E V E K T E G D M T V Q C H Y Y T H Y S S A I I V A S
7561 tacctggtccggatgccacccttccaccaggccttctcgctctgcagggcggagcttcgacgtggcagacagaatgttccacagtgtg
2521 Y L V R M P P F T Q A A F C A L Q G G G S F D V A D R M F H S V
7651 aagagcacgtgggactcggcctcagagactgagtgacatgcaggtcagggcagctgaccagagttcttctcactgctgagtttctaacc
2551 K S T W E T S A S R E N M S D V R E L T P E F F Y L P E F L T
7741 aactgcaacgggtagagttcggctgcatgcagggcggactgtgctagtagacgtgcagctcctcctcctgggctgatggggaccctcgg
2581 N C N G V E C F G C M Q D G T V L G D V Q L P P W A D G D P R
7831 aaattcatcagcctgcacagaaggcctggaagtgactttgtcagtgccaacctccaccattggatagaccttattttgggtacaag
2611 K F I S L H R K A L E S D F V S A N L H H W I D L I F G Y K
7921 cagcaggggcccagccgactggatgctgtaatatcttccaccctacttctcaggtgacagaatggacctcagcagcatcactgacccc
2641 Q Q C G P A A V D A V N I F H P Y F Y G D R M D L S S I T D P
8011 ctcatcaaaagcaccactcctgggtttgtcagcaactttggcaggtgcccacaacagctctttaccacaacctcaccagcaggactgca
2671 L I K S T I L G F V S N F G Q V P K Q L F T K P H P A R T A
8101 gcagggaaagcctctgctggaaggatgtctccacccccgtgagcctgctggccaccacagccctttttctacagcctgcagctcgctg
2701 A G K P L P G K D V S T P V S L P G H P Q P F F Y S L Q S L
8191 aggcctcccaggtcaggtcaaagatatgtaccttcttcttaggctcagagtcccccaaaggggcccattggccacattgtctctact
2731 R P S Q V T V K D M Y L F S L G S E S P K G A I G H I V S T
8281 gagaagaccattctggctgtagagaggaacaaagtgtgctgctcctcctctggaacaggaccttcagctggggctttgatgacttcagc
2761 E K T I L A V E R N K V L L P P L W N R T F S W G F D D F S
8371 tgctgcttggggagctacggctccgacaaggctcctgatgacattcagagaacctggctgctggggccgctgctgtgctgcccgtgtgccca
2791 C C L G S Y G S D K V L M T F G E N L A A W G R C L A V T C P
8461 tccccacaacagattgtcacctctgggaccagcactgtggtgtgtgtgtgggagctcagcatgaccaaaggcccccaggggcttgccg
2821 S P T T I V T S G T S T V V C V W E L S M T K G R P R G L R
8551 ctccggcaggccttgtatggacacacaggtgtcactgctggcagcgtcagtcaccttcagcctcctggtgagcggctcccaggac
2851 L R Q A L Y G H T Q A V T C L A A S V T F S L L V S G S Q D
8641 tgcacctgtatcctgtgggatctggaccacctcaccacgtgacccgctgcccggccatcggaaggcatctcagccatcaccatcagt
2881 C T C I L W D L D H L T H V T R L P A H R E G I S A I T I S
8731 gacgtctcaggcaccattgtctcctgtgctggggagcacactgtccctgtggaatgtcaatggacagccctggccagcatcaccacagcc
2911 D V S G T I V S C A G A H L S L W N V N G Q P L A S I T T A
8821 tggggcccagaaggagccataacctgctgctgctgctgagggggccagcatgggacacaagccagatcatcatcaccgggagtaagac
2941 W G P E G A I T C C C L M E G P A W D T S Q I I I T G S Q D
8911 ggcatggtccgggtttggaagactgaggatgtgaagatgtctgttctggacggccagcaggagaggagccccgggctcagcctccaagc
2971 G M V R V K T E D V K S V P A G E P P A Q P S
9001 ccaagaaggccacaagtgaggagaagaacctggccttgagtcgagagctggacgttagcattgctttgacaggggaagcccagcaaaaccagc
3001 P R G H K W E K N L A L S R E L D V S I A L T G K P S K T S
9091 cccgcagtgactgctctggccgtgtccagaaaccacacaaacctcctggttggtgatgagagggggagaatattctgctggtctgcagat
3031 P A V T A L A V S R N H T K L L V G D E R G R I F C W S A D
9181 gggtag
3061 G -
    
```



Abb. 19: cDNA-Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von NBP64. Die cDNA-Sequenz wurde anhand von überlappenden ESTs zusammengesetzt und durch Sequenzierung der amplifizierten cDNA bestätigt. Die BEACH-Domäne ist durchgehend unterstrichen, WD40-repeats sind gestrichelt unterstrichen. Die vermutliche Lage einer neuartigen PH-Domäne ist durch eine gepunktete Linie dargestellt. Mögliche Tyrosinphosphorylierungsstellen, denen negativ geladene Aminosäurereste vorausgehen, sind durch Fettdruck angegeben. Die Domänenstruktur des abgeleiteten Proteins ist graphisch dargestellt. Die Identifizierung bekannter Domänen erfolgte durch Abgleich mit der Pfam-Datenbank.

Sequenzvergleich verschiedener BEACH-Domänen

Die dreidimensionale Struktur zweier BEACH-Domänen konnte kürzlich röntgenkristallographisch gelöst werden und ergab, daß sie sich in enger Assoziation mit einer N-terminal gelegenen unkonventionellen PH-Domäne befinden^{190,234}. Die mit Hilfe der Strukturaufklärung entdeckten PH-Domänen nehmen die gleiche Faltung wie konventionelle PH-Domänen ein, weisen jedoch keine Sequenzhomologie mit ihnen auf. Ferner scheinen sie nicht an Phospholipide binden zu können^{190,234}. Ein Sequenzvergleich der PH/BEACH-Domänen verschiedener bekannter Proteine mit der von NBP64 zeigt eine starke Konservierung der BEACH-Domäne und eine schwache Konservierung der ihr vermutlich vorangehenden PH-Domäne (Abb. 20).

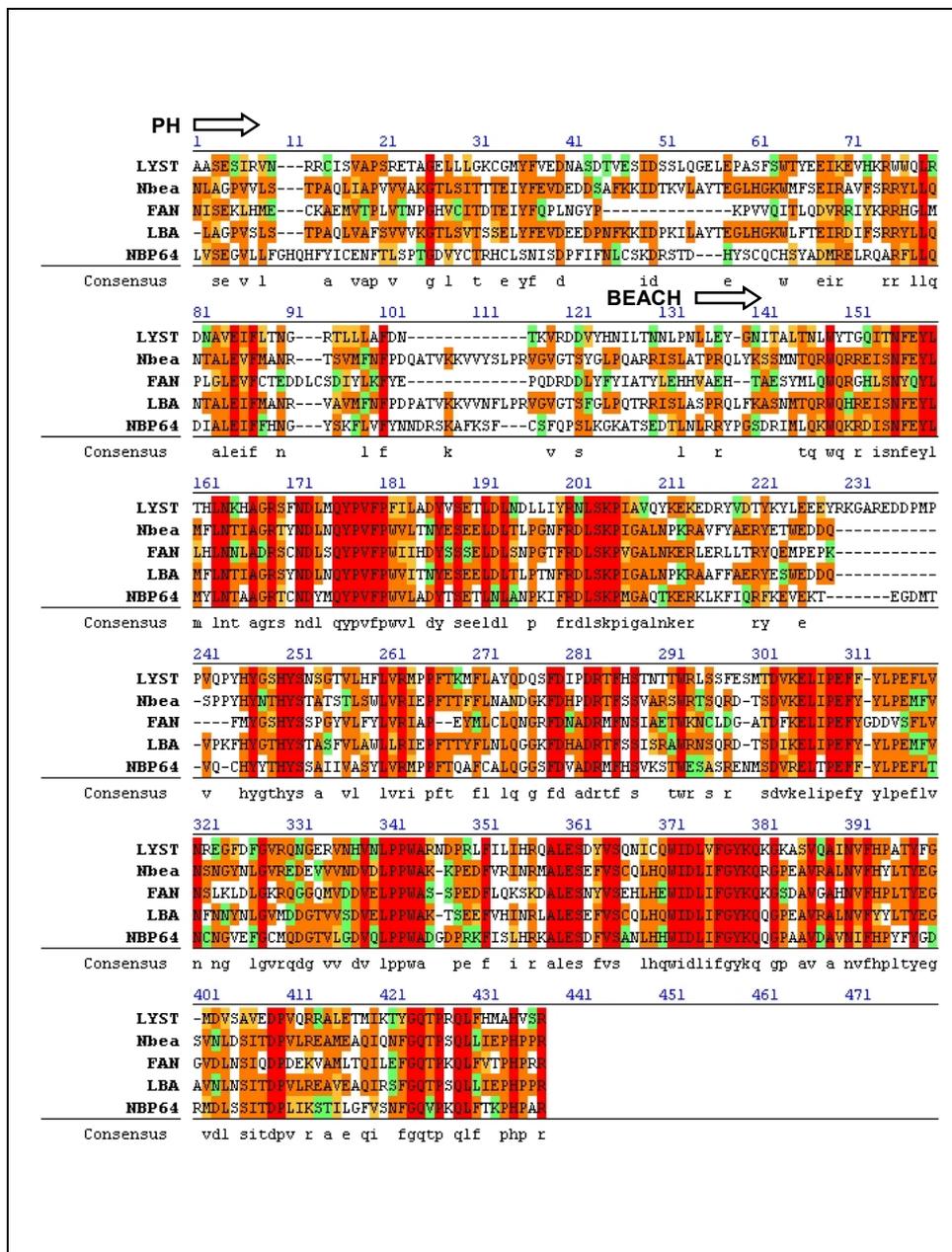


Abb. 20: Sequenzvergleich der PH- und BEACH-Domänen von *LYST* (lysosomal trafficking regulator), *Nbea* (Neurobeachin), *FAN* (factor associated with neutral sphingomyelinase activation), *LBA* (LPS-responsive, beige-like anchor gene) und *NBP64* (novel BEACH-domain containing protein, orf64). Identische Aminosäuren sind rot, vorherrschende Aminosäuren orange hinterlegt. Ähnliche Aminosäuren sind gelb, unähnliche grün hinterlegt. Der Beginn der *Nbea*-PH-Domäne sowie der BEACH-Domänen ist durch einen Pfeil markiert. Die Konsensussequenz ist angegeben. Der Sequenzvergleich wurde mit Jellyfish-Software unter Verwendung von BLOSUM-Matrix durchgeführt.

Einige einzelne Aminosäurereste sowie ein zentrales Motiv mit der Konsensussequenz RRxLLQxxALEIFxxN sind allerdings konserviert. Dieses Motiv bildet zwei β -Faltblatt-Strukturen in der *Nbea*-PH-Domäne, die die physische Interaktion mit der angrenzenden BEACH-Domäne vermitteln¹⁹⁰. Die Konservierung dieses Motivs in verschiedenen BEACH-Domänen-Proteinen, u.a. in dem hier beschriebenen *NBP64* läßt vermuten, daß auch deren BEACH-Domänen N-terminal eine PH-Domäne vorangeht. Desweiteren liegt die Vermutung nahe, daß die physische Interaktion der beiden Domänen wichtig für ihre Funktion ist, bzw. daß beide Domänen möglicherweise als funktionelle Einheit fungieren.

NBP64 wird präferentiell in lymphatischem Gewebe exprimiert

Die Gewebeexpression von *NBP64* wurde mittels PCR auf cDNAs humaner Gewebe (*human MTC-panels I & II*, Clontech) analysiert. Die stärkste Expression liegt in der Milz und im Thymus vor (Abb. 21 a). Etwas schwächer ist die Expression in peripheren Blut-Leukocyten (PBLs) sowie im Testis. Andere Organe weisen unter den gewählten PCR-Bedingungen keine oder nur eine sehr schwache Expression auf. Die Verwendung gleicher Mengen an cDNA wurde durch eine Amplifikation der Glycerin-Aldehyd-3'-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) bestätigt. Die Expression von *NBP64* in lymphatischem Gewebe wurde durch Verwendung weiterer Gewebe-cDNAs (*human IS-panel*, Clontech) detaillierter analysiert. Dabei zeigte sich eine besonders starke *NBP64*-Expression in Lymphknoten und etwas schwächere Expressionen in der Milz und im Thymus (Abb. 21 b). Andere lymphatische Gewebe weisen im Vergleich zu Lymphknoten eine nur sehr schwache Expression auf. Diese Ergebnisse decken sich mit der Beobachtung, daß ca. 50 % aller identifizierten *NBP64*-ESTs aus Keimzentrums-B-Zellen stammen (Daten nicht gezeigt).

Das im Rahmen dieser Arbeit identifizierte Protein *NBP64* enthält als auffälligstes Merkmal eine C-terminale BEACH-Domäne. Dieser geht vermutlich eine neuartige PH-ähnliche

Domäne voran, was auch auf andere BEACH-Domänen-Proteine zutreffen dürfte. Die Expression dieses Proteins scheint eine Präferenz für das hämatopoetische System aufzuweisen und in Lymphknoten und Milz am stärksten zu sein. Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß die Mehrheit der identifizierten NBP64-ESTs aus B-Zellen stammen, deuten die Daten an, daß dieses Protein seine Funktion hauptsächlich in B-Zellen erfüllen dürfte. Zukünftige Untersuchungen zur Funktion von NBP64 könnten neue Aspekte der B-Zell-Biologie ans Licht bringen.

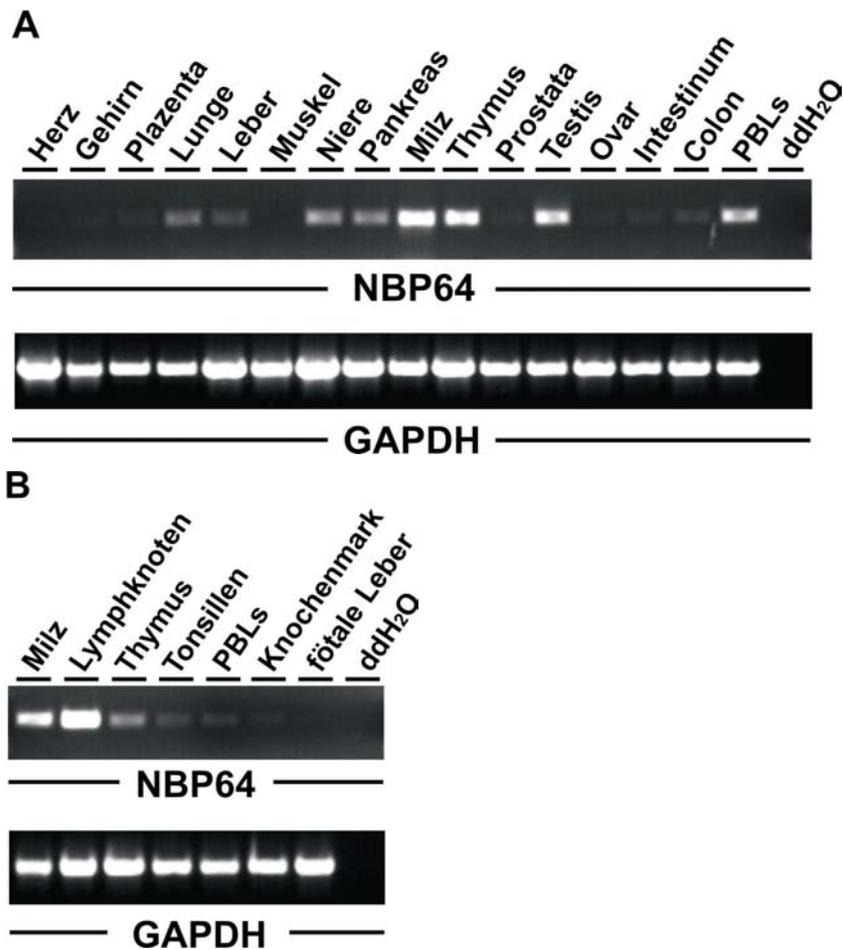


Abb. 21: RT-PCR-Analyse der NBP64-Expression. Die Analyse wurde mit den Multiple Tissue cDNA (MTC) Panels I & II (**A**) und dem Immune System (IS) Panel (**B**) der Firma Becton Dickinson gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Amplifikation von NBP64-Transkripten wurden 30 Zyklen, zur Amplifikation von GAPDH-Transkripten 22 Zyklen mit Taq-Polymerase (Promega) durchgeführt.

DISKUSSION

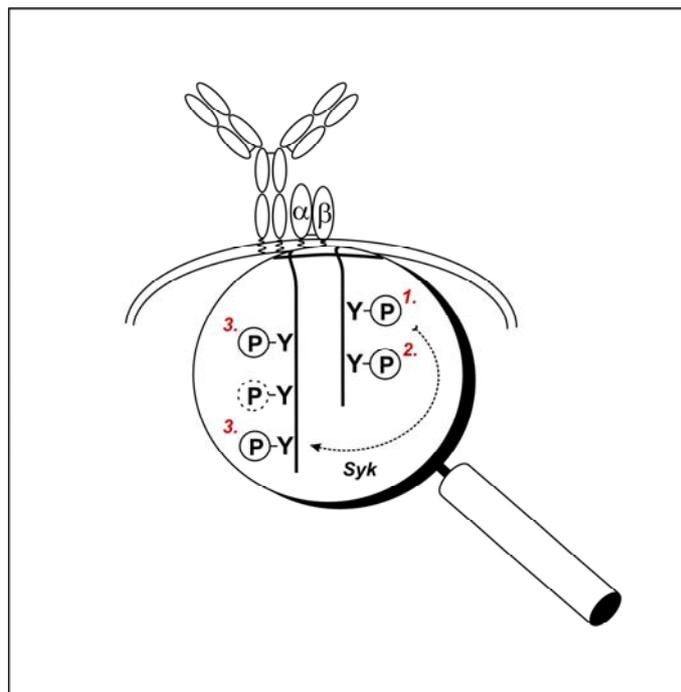
IG- α : MEHR ALS NUR EIN ITAM

Asymmetrische Tyrosinphosphorylierung des Ig- α /Ig- β Heterodimers

Die Signalleitung des BCRs wird initiiert durch die ITAMs von Ig- α und Ig- β . ITAMs binden und aktivieren cytoplasmatische PTKs, die wiederum nachgeschaltete Signalleitungskaskaden aktivieren. Ig- α besitzt ein unter allen ITAM-haltigen Immunrezeptor-Signalleitungskomponenten einzigartiges strukturelles Element. Neben den ITAM-Tyrosinresten besitzt es einen Tyrosinrest an Position 204 (Y₂₀₄) der Mausproteinsequenz. Dieser Tyrosinrest ist, im Gegensatz zu einem Tyrosinrest an Position 176 (Y₁₇₆), konserviert in allen Spezies, deren Ig- α -Sequenz bekannt ist²³². In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Y₂₀₄ ein Substrat für aktivierte PTKs darstellt. Desweiteren konnte demonstriert werden, daß Y₂₀₄ im phosphorylierten Zustand als Bindestelle für das Adapterprotein SLP-65 *in vitro* und *in vivo* fungiert. Diese Assoziation wird von der SLP-65-SH2-Domäne vermittelt, die selektiv an Peptidmotive der Sequenz YQDV bzw. YDDV bindet^{155,156,235,236}. Y₂₀₄ gehen keine negativ geladenen Aminosäurereste voran, die in der Regel notwendig für die Substraterkennung von PTKs sind, und deshalb in konventionellen Tyrosinphosphorylierungsstellen vorhanden sind²³⁷⁻²³⁹. Stattdessen scheint die Phosphorylierung von Y₂₀₄ abhängig von der vorangehenden Phosphorylierung der ITAM-Tyrosinreste von Ig- α und/oder Ig- β zu sein. In Experimenten mit chimären Rezeptoren, die den intrazellulären Teil von Ig- α enthalten, ist die Anwesenheit beider ITAM-Tyrosinreste Voraussetzung für die Phosphorylierung von Y₂₀₄¹⁵⁶. Ebenso konnte in einer B-Zelllinie, die mutantes Ig- α exprimiert, dessen ITAM-Tyrosinreste durch Phenylalanine ersetzt sind, keine Phosphorylierung des mutanten Ig- α mittels anti-Phosphotyrosin Western-Blot-Analyse von Zellysaten beobachtet werden⁶³. Gleiches gilt für die selbe Ig- α -Mutante aus B-Zellen genetisch veränderter Mäuse. Eine Untersuchung von aufgereinigtem Ig- α ergab dort jedoch eine schwache BCR-induzierte Tyrosin-Phosphorylierung von Ig- α ²⁴⁰. Da Y₁₇₆ evolutionär nicht konserviert ist und in unseren und anderen Studien nicht als PTK-Substrat identifiziert werden konnte^{63,155,156}, ist davon auszugehen, daß die dort beobachtete Phosphorylierung an Y₂₀₄ erfolgte. Ob in diesem Fall die ITAM-Tyrosinreste von Ig- β für die Phosphorylierung von Y₂₀₄ notwendig sind wurde nicht untersucht. Die Anwesenheit des Ig- β -ITAMs scheint jedoch generell notwendig zu sein für die Tyrosin-Phosphorylierung von Ig- α . In genetisch manipulierten Mäusen, bei denen der cytoplasmatische Teil von Ig- β durch denjenigen von

Ig- α ersetzt ist und die somit ausschließlich Ig- α -ITAMs als Teil des BCRs exprimieren, ist die Phosphorylierung von Ig- α (sowie anderer PTK-Substrate) nahezu eliminiert²⁴¹. Dies könnte auf eine hierarchische Phosphorylierung der Tyrosinreste innerhalb des Ig- α /Ig- β -Heterodimers hindeuten, beginnend mit denen von Ig- β und möglicherweise endend mit Y₂₀₄. Der Frage, welche Kinase Y₂₀₄ phosphoryliert, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht nachgegangen. Allerdings waren PTKs der Src-Familie in *in vitro*-Kinase-Experimenten nicht in der Lage Y₂₀₄ zu phosphorylieren⁶³. Dies legt die Vermutung nahe, daß Y₂₀₄ ein Substrat für aktiviertes Syk darstellt, das nur über doppelt phosphorylierte ITAMs an den Rezeptor rekrutiert wird. Experimente mit chimären Transmembranproteinen ergaben, daß nur eine Minderheit der ITAMs von Ig- α und Ig- β doppelt phosphoryliert vorliegt und damit in der Lage ist Syk zu rekrutieren²⁴². Eine große Mehrheit der Ig- α - und Ig- β -ITAMs liegt diesen Experimenten zufolge am N-terminalen ITAM-Tyrosin monophosphoryliert vor. Zum selben Ergebnis führte die Analyse phosphorylierter Peptidfragmente aus endogenem, wildtypischem Ig- α ¹⁵⁶. Desweiteren ergaben biochemische Experimente, daß im Kontext eines wildtypischen BCRs die SH2-Domänen von Syk bevorzugt an Ig- β und nur in sehr geringem Maße an Ig- α binden⁹⁷. Diese Ergebnisse unterstützen die Idee, daß der Phosphorylierung von Ig- α -Y₂₀₄ (und evtl. der Ig- α -ITAM-Tyrosinreste) die Rekrutierung von Syk an Ig- β vorausgeht. Die Klärung dieser Hypothese bedarf neuer experimenteller Systeme, da die mit chimären Transmembranproteinen erhaltenen Daten offensichtlich nicht mit denen im Kontext des gesamten BCRs gewonnenen Resultaten übereinstimmen.

Abb. 22: Hierarchisches Phosphorylierungsmodell der cytoplasmatischen Tyrosinreste im Ig- α /Ig- β Heterodimer. Nach Phosphorylierung der ITAM-Tyrosinreste von Ig- β , an der vermutlich Src-PTKs beteiligt sind (1. und 2.), kann Syk an Ig- β binden. Diese Bindung aktiviert die katalytische Aktivität von Syk, die dann das Y₂₀₄ (3.) und evtl. das N-terminale Ig- α ITAM-Tyrosin (3.) phosphorylieren kann. Das C-terminale ITAM-Tyrosin wird vermutlich nur in geringem Maße phosphoryliert.



Funktionelle Unterschiede zwischen Ig- α und Ig- β

Viele vorangegangene Studien beschäftigten sich mit der Frage, ob die ITAMs, bzw. die cytoplasmatischen Anteile von Ig- α und Ig- β exklusive oder redundante Funktionen erfüllen. In den 1990er Jahren wurden dazu ausschließlich Experimente mit verschiedenen chimären Transmembranproteinen vorgenommen und je nach experimentellem System wiesen die intrazellulären Teile von Ig- α und Ig- β unterschiedliche^{62,65,242-244} oder identische^{64,245,246} funktionelle Eigenschaften auf. In den letzten Jahren wurde durch eine Serie von „knock-in“-Experimenten im Mausmodell in den Labors von Michel Nussenzweig und Klaus Rajewsky die Rolle der ITAM-Tyrosine, bzw. der cytoplasmatischen Teile von Ig- α und Ig- β im Kontext des BCRs *in vivo* untersucht^{240,241,247}. Dabei traten klare funktionelle Unterschiede zwischen den cytoplasmatischen Anteilen von Ig- α und Ig- β auf. Diese Unterschiede machen sich besonders in der Fähigkeit bemerkbar, die B-Zell-Entwicklung im Knochenmark zu ermöglichen. Die hier beschriebene Entdeckung eines außerhalb des ITAMs gelegenen phosphorylierten Tyrosinrests in Ig- α , Y₂₀₄, sowie die Identifizierung eines spezifischen Bindepartners, SLP-65, bietet eine Erklärungsmöglichkeit für die beobachteten funktionellen Unterschiede. Ein weiterer Unterschied zwischen Ig- α und Ig- β , der funktionelle Auswirkungen haben könnte, ist die Anzahl und Position von phosphorylierten Serin- und Threoninresten, die negativ-regulatorische Eigenschaften aufzuweisen scheinen²⁴⁸.

Funktionelle Relevanz der Interaktion von SLP-65 und Ig- α

Die in dieser Arbeit beschriebene Interaktion zwischen Ig- α und SLP-65 identifizierte zugleich den ersten Liganden für die SH2-Domäne des Adapterproteins SLP-65. SLP-65 ist ein essentieller Faktor für die Initiation von BCR-regulierten Signalkaskaden. Es organisiert aktivierte PTKs wie Btk und nachgeschaltete Effektormoleküle wie die PLC- γ 2 in einem multimolekularen Signalleitungskomplex. Ohne diese Organisation verläuft die Aktivierung nachgeschalteter Signalwege ineffizient oder bleibt gänzlich aus. Der Mechanismus über den das „Signalosom“ aus SLP-65, Btk und PLC- γ 2 zur Plasmamembran, bzw. zum aktivierten Rezeptor rekrutiert wird ist nicht bekannt. Neben der Möglichkeit, daß der Komplex über die PH-Domänen von Btk und PLC- γ mit der Plasmamembran interagiert, stellt die Assoziation von SLP-65 mit Ig- α möglicherweise einen weiteren (Teil-) Mechanismus für die Membranrekrutierung dar. Unter Verwendung von chimären Transmembranproteinen beschrieb das Labor von Marcus Clark eine synergistische Beteiligung von Y₁₇₆ und Y₂₀₄ an der Initiation von SLP-65-regulierten Signalwegen, u.a. der Mobilisierung von intrazellulärem

Ca²⁺¹⁵⁶. Die in unserem Labor durchgeführte Expression von mutantern SLP-65, dessen SH2-Domäne inaktiviert wurde, in einer SLP-65-defizienten B-Zelllinie hatte allerdings keinen Effekt auf die Mobilisierung von intrazellulärem Ca²⁺ (Kai Dittmann, unveröffentlicht). Eine andere mögliche Funktion der Ig- α -SLP-65-Interaktion könnte darin bestehen, den internalisierten BCR und somit gebundenes Antigen zum Ort der Beladung der MHC-II-Komplexe, dem sog. *MHC class II loading compartment* (MIIC), zu dirigieren²⁴⁹. In diesem Fall würde Ig- α -assoziiertes SLP-65 gewissermaßen als Markierung für die intrazelluläre Sortierung BCR-enthaltender Vesikel fungieren. Die Verifizierung dieser Daten im Mausmodell wird gegenwärtig durchgeführt (Klaus Rajewsky, persönliche Kommunikation). Die Untersuchungen verschiedener anderer Labors ergaben, daß die SLP-65-SH2-Domäne auch an ein phosphoryliertes YDDV-Motiv der Serin-/Threoninkinase HPK-1 binden kann^{235,236}. Die Interaktion von SLP-65 mit HPK1 trägt möglicherweise zu deren vollständiger Aktivierung bei, eine Auswirkung dieser Interaktion auf nachfolgende Signalleitungsereignisse konnte allerdings nicht beobachtet werden^{235,236}.

SLP-65 IN EBV-INFIZIERTEN B-ZELLEN

Das LMP2A-vermittelte „maintenance-“ Signal verläuft über SLP-65

Das Überleben von peripheren zirkulierenden B-Lymphocyten ist abhängig von der Expression eines funktionellen BCRs auf der Zelloberfläche, der überlebenswichtige Signale ins Zellinnere vermittelt^{109,110}. Die Natur dieses *maintenance*-Signals ist unklar, möglicherweise handelt es sich aber um ein konstantes, basales „Hintergrund“-Signal, das allein durch die Expression eines funktionellen BCRs auf der Zelloberfläche, ohne externen Stimulus, ausgelöst wird. Sich entwickelnde B-Zellen im Knochenmark sind ebenfalls auf die Expression eines funktionellen (prä-) BCRs angewiesen. Diese Signale sind abhängig von ITAM-Tyrosinresten^{222,240,241,250}, und können durch LMP2A substituiert werden^{222,250}. In Kollaboration mit dem Labor von Richard Longnecker in Chicago demonstriert die vorliegende Arbeit eine essentielle Rolle von SLP-65 für die LMP2A-vermittelte Entwicklung von B-Zellen sowie das *maintenance*-Signal²³⁰. In Mäusen, die LMP2A B-zell-spezifisch exprimieren, akkumulieren BCR-negative Zellen in der Peripherie²²². In Abwesenheit von SLP-65 hingegen können diese Zellen sich nicht entwickeln. Diese genetischen Daten werden unterstützt durch die hier beschriebenen biochemischen Untersuchungen an immortalisierten, LMP2A-exprimierenden reifen humanen B-Zellen. Diese ergaben, daß SLP-65 dort, im Gegensatz zu LMP2A-negativen Zellen, konstitutiv phosphoryliert vorliegt. Die Expression von LMP2A führt ebenfalls zu einer konstitutiven Aktivierung der PTKs Lyn, Syk und

Btk^{211,212,227,251}. Hingegen konnte hier demonstriert werden, daß PLC- γ 2 in LMP2A-exprimierenden B-Zellen nicht als Substrat dieser PTKs fungiert. In wildtypischen B-Zellen bindet PLC- γ über ihre SH2-Domänen an phospho-SLP-65¹⁴⁵. In LMP2A-positiven B-Zellen ist dies nicht der Fall. Dies erklärt auf der einen Seite, warum die Mobilisierung von intrazellulärem Ca²⁺ durch die Expression von LMP2A blockiert wird, wirft aber andererseits die Frage auf, wie PLC- γ 2 vom „Signalosom“ ausgeschlossen wird. Möglicherweise erfolgt die LMP2A-vermittelte Phosphorylierung von SLP-65 nicht an den für die PLC- γ -Bindung notwendigen Stellen. Eventuell ist der Anteil an phosphoryliertem SLP-65 in LMP2A-exprimierenden Zellen auch nur sehr gering, möglicherweise zu gering um die Aktivierung von PLC- γ zu ermöglichen. Aufreinigungsexperimente mit isolierten PLC- γ 2-SH2-Domänen führten zu keinem eindeutigen Ergebnis (Thorsten Krause & Annika Grabbe, unveröffentlicht). Seit kurzem verfügbare Phospho-spezifische anti-SLP-65 Antikörper²⁵² sollten zur Klärung dieser Frage beitragen.

IDENTIFIZIERUNG NEUER SIGNALLEITENDER ELEMENTE IN LYMPHOCYTEN

p120: ein neues Adapterprotein mit Homologie zu ADAP und PRAM-1

Die im hämatopoetischen System exprimierte Adapterproteine ADAP und PRAM-1 besitzen nicht nur Sequenz- und strukturelle Homologie, sondern erfüllen in unterschiedlichen Zelltypen offenbar auch ähnliche Funktionen. ADAP fungiert als Relais zwischen TCR-induzierten Signalen und der Aktivierung von Integrinen auf der Zelloberfläche^{168,169,253}. PRAM-1 ist an der Weiterleitung von Integrin-vermittelten Signalen in neutrophilen Granulocyten beteiligt¹⁷⁶. Das in dieser Arbeit vorgestellte neue Protein p120 ähnelt in seinem Aufbau ADAP und PRAM-1, obgleich die Sequenzhomologie relativ gering ist. Wie ADAP und PRAM-1 weist es klassische Merkmale eines Adapterproteins auf. Katalytische Domänen fehlen, dafür finden sich Prolin-reiche Bereiche, drei zwischen Mensch und Maus konservierte Tyrosinphosphorylierungsmotive der Konsensussequenz YDDV, sowie eine C-terminale SH3-ähnliche Domäne. Die Tyrosinphosphorylierungsstellen besitzen nicht nur die gleiche Konsensussequenz wie diejenigen in ADAP und PRAM-1, sie befinden sich z.T. auch an identischer Position im Protein. Tyrosinphosphorylierungsmotive der Sequenz YDDV sind Konsensusbindestellen für die SH2-Domänen der Adapterproteine der SLP-Familie, SLP-76, SLP-65 und CLNK^{236,254}. Diese sind die einzigen bisher beschriebenen Bindepartner für die relativ seltenen YDDV-Motive. Deshalb ist davon auszugehen, daß auch p120 eine Funktion in Zellen erfüllt, die Vertreter der SLP-Adapterproteine exprimieren, i.e. Zellen des hämatopoetischen Systems. Die mittels RT-PCR erhaltenen Expressionsdaten deuten

allerdings nicht auf eine starke Expression von p120 in lymphatischem Gewebe hin. Bestenfalls läßt sich auf eine moderate Expression im Thymus zurückschließen. Dies konnte auf Proteinebene bisher jedoch nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Daher muß die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß p120 in hämatopoetischen Zellen nicht konstitutiv, sondern durch externe Stimuli induziert exprimiert wird. Eine induzierbare Expression wurde u.a. auch für PRAM-1 und CLNK beschrieben^{175,255}.

Die größte Sequenzhomologie unter den Proteinen der ADAP-Familie besteht innerhalb eines Bereichs von ca. 90 Aminosäuren am C-Terminus. Dieser Bereich weist Homologie zu SH3-Domänen auf, obgleich einige in SH3-Domänen konservierte Reste fehlen. Die dreidimensionale Struktur der C-terminalen SH3-ähnlichen Domäne von ADAP konnte kürzlich gelöst werden¹⁶³. Die Struktur zeigt, daß es sich um die abgewandelte Form einer klassischen SH3-Domäne handelt. Eine N-terminal gelegene amphipathische Helix bildet großflächige Kontakte mit der SH3-Faltungsstruktur, wodurch diese helikal erweiterte SH3-Domäne (hSH3) vermutlich nicht in der Lage ist an konventionelle Prolin-reiche Peptide zu binden¹⁶³. Diese unerwartete Besonderheit erklärt möglicherweise die Beobachtung, daß die ADAP-hSH3-Domäne an das unorthodoxe Peptidmotiv RKxxYxxY in SKAP-55 bindet¹⁶². Allerdings sind auch andere, konventionelle SH3-Domänen, wie die der Src-PTKs Fyn und Lck, in der Lage mit diesem Peptidmotiv zu assoziieren¹⁶², weshalb man die Bindung der ADAP-hSH3-Domäne an diese untypische Sequenz nicht unbedingt auf deren strukturelle Besonderheiten zurückführen kann. Der Bereich der ADAP-hSH3-Domäne weist große Homologie zu der vermeintlichen SH3-Domäne von p120 auf. Einige für die Funktion klassischer SH3-Domänen notwendige Aminosäuren, so z.B. ein zentrales Tryptophan fehlen. Die N-terminale Helix scheint hingegen konserviert zu sein. Man kann daher vermuten, daß auch p120 eine hSH3-Domäne, ähnlich derjenigen von ADAP, besitzt. Die hSH3-Domäne von ADAP kann, zumindest *in vitro*, an SKAP-55 binden. SKAP-Proteine binden allerdings auch mittels ihrer eigenen SH3-Domänen an ADAP^{164,165} und vermutlich PRAM-1¹⁷⁵. Eine Interaktion von SKAP-Proteinen mit p120 *in vitro* konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Um eine Beteiligung der p120 hSH3-Domäne an dieser Interaktion zu überprüfen, wurde eine p120-Deletionsmutante, der die hSH3-Domäne fehlt (delta-hSH3), eingesetzt. Dabei stellte sich zum einen heraus, daß der Verlust der hSH3-Domäne die Bindung der SKAP-Proteine nicht beeinträchtigt, und zum anderen, daß die delta-hSH3-Mutante deutlich stärker exprimiert wird als wildtypisches HA-markiertes p120. Eine plausible Erklärung für dieses Phänomen läßt sich schwerlich erbringen, möglicherweise wirkt sich die hSH3-Domäne (evtl. in Abwesenheit eines Liganden) nachteilig auf die Stabilität des Proteins aus. Generell läßt

sich feststellen, daß die Expression von p120 in verschiedenen Zellsystemen, vor allem in lymphocytären Zelllinien (!) äußerst ineffizient ist. Daher wird gegenwärtig versucht ein induzierbares Expressionssystem zu etablieren. Ein solches Expressionssystem und eine forcierte Expressionsanalyse sollten zukünftig zur Klärung der Funktion von p120 beitragen.

NBP64: ein neuartiges BEACH-Domänen-Protein in Lymphocyten

Patienten mit Chediak-Higashi-Syndrom (CHS) leiden u.a. an ausgeprägten immunologischen Fehlfunktionen¹⁸¹. Mit der Identifizierung des betroffenen Gens wurde erstmals offenkundig, daß ein BEACH-Domänen enthaltendes Protein immunologische Funktionen reguliert. Neben dem CHS-Protein, LYST, wurden weitere BEACH-Domänen-Proteine identifiziert, die in Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert werden. LBA wird in B-Zellen und nach LPS-Exposition in Makrophagen exprimiert¹⁸⁸, ALFY wird in verschiedenen Organen, u.a. auch in der Milz exprimiert. Allen Proteinen dieser Familie gemeinsam ist ihr Aufbau mit einer C-terminalen BEACH-Domäne, die von mehreren WD40-*repeats* gefolgt wird. Die Strukturaufklärung der BEACH-Domänen der Proteine Nbea und LBA zeigte, daß diesen unkonventionelle PH-Domänen vorangehen, die zwar kaum Sequenzhomologie mit konventionellen PH-Domänen, aber eine sehr ähnliche 3D-Struktur aufweisen^{190,234}. Diese PH-Domänen liegen in enger physischer Assoziation mit den angrenzenden BEACH-Domänen vor und sind dadurch nicht in der Lage an Phospholipide zu binden. Da die Funktion der BEACH-Domänen unbekannt ist, kann nur darüber spekuliert werden, ob die PH-/ BEACH-Domäne möglicherweise eine funktionelle Einheit darstellt. Ein Sequenzvergleich verschiedener BEACH-Domänen zeigt, daß einige Bereiche innerhalb der PH-Domänen von Nbea und LBA auch in anderen BEACH-Domänen-Proteinen konserviert wird, u.a. in dem hier vorgestellten NBP64. Diese konservierten Peptidmotive bilden in den bekannten Strukturen die Interaktionsstellen mit den angrenzenden BEACH-Domänen. Die evolutionäre Konservierung dieser Bereiche läßt erstens vermuten, daß vielen BEACH-Domänen eine PH-Domänenstruktur vorangeht, und zweitens, daß die Interaktion dieser PH-Domänen mit den angrenzenden BEACH-Domänen nicht ganz unerheblich für deren Funktion ist. Alle bekannten Mutationen des LYST-Gens, die im Menschen und in der Maus in CHS resultieren, führen zur Expression partieller Proteine, denen die C-terminalen BEACH-Domänen und/oder WD40-*repeats* fehlen²⁵⁶. Daraus wird offensichtlich, daß diese Domänen für die Funktion des LYST-Proteins, und vermutlich auch anderer BEACH-Domänen Proteine unerlässlich ist. In einer Studie wurde die subzelluläre Lokalisation einer isolierten BEACH-Domäne inklusive nachfolgender WD40-*repeats* untersucht. Die Daten

legen nahe, daß diese Domänen in einer Makrophagen-Zelllinie nach Exposition mit LPS mit intrazellulären Vesikeln assoziieren¹⁸⁸. BEACH-Domänen und/oder WD40-*repeats* könnten also eine stimulationsabhängige, induzierbare Assoziation mit Komponenten des intrazellulären Vesikelsystem vermitteln.

Neben den C-terminalen, bekannten Domänen, enthält NBP64 noch mehrere Abschnitte, die Homologie zu wenigen uncharakterisierten Proteinen verschiedener Spezies aufweisen (Daten nicht gezeigt). Darüber, ob es sich bei diesen Sequenzabschnitten um unbekannte Proteindomänen handelt, oder um Bereiche, die in homologen Proteinen evolutionär konserviert sind, kann derzeit nur spekuliert werden. Teilweise innerhalb dieser Bereiche finden sich zahlreiche Tyrosinreste, denen negativ geladene Aminosäurereste vorangehen. Diese Tyrosinreste, die sich häufig in der Sequenzumgebung YxxI, YxxL, YxxV und YxxA befinden, könnten Substrate für PTKs darstellen. Im phosphorylierten Zustand stellen solche Peptidmotive Bindestellen für die SH2-Domänen zahlreicher Proteine dar^{54,58,59}. Daher lassen sich schwerlich voraussagen über mögliche Bindepartner machen. Zwar werden BEACH-Domänen-Proteine regelmäßig mit der Regulation von Signalleitungsprozessen in Verbindung gebracht, Tyrosinphosphorylierungen sind bisher allerdings noch nicht beschrieben worden. Die bisher durchgeführten Untersuchungen zur Gewebeexpression von NBP64 zeigen eine gewisse Spezifität für lymphatische Gewebe. Den höchsten mRNA-Level findet man in Lymphknoten, gefolgt von Milz und Thymus. Zudem entstammen über 50% aller identifizierten ESTs Keimzentrums-B-Zellen. In anderen lymphatischen Geweben, wie Knochenmark und fötaler Leber, sowie reifen peripheren Blut-Leukocyten (PBLs) hingegen finden sich kaum NBP64-Transskripte. Dies deutet darauf hin, daß die NBP64-Expression in ruhenden Lymphocyten eher gering ist, und nach deren Aktivierung in Keimzentren der Lymphknoten oder der Milz stark zunimmt. Zukünftige detaillierte Expressionsanalysen und biochemische Untersuchungen an lymphocytären Zellen sollten die Klärung der Funktion von NBP64 bei immunologischen Prozessen vorantreiben. Die beiden einzigen derzeit verfügbaren Mauslinien, bei denen die Funktion von BEACH-Domänen Proteinen betroffen sind, sind die sog. *beige*-Maus, bei der das LYST-Gen betroffen ist, sowie Nbea-defiziente Mäuse. Beide weisen relativ drastische Phänotypen auf, weshalb die Generierung und Untersuchung von NBP64-defizienten Mäusen vielversprechend erscheint. Interessant erscheint auch die Tatsache, daß der NBP64-Locus sich in unmittelbarer genomischer Nachbarschaft zu demjenigen von SLP-65 befindet. Dies könnte möglicherweise ein Indiz für eine Anhäufung von Genen sein, deren Produkte in funktioneller Beziehung zueinander stehen, wie z.B. im MHC-Locus oder im Th2-Cytokin-Locus.

KONKLUSIONEN

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Funktion des Adapterproteins SLP-65 führten zur Entdeckung von Ig- α als dem ersten Bindepartners der SLP-65-SH2-Domäne. Ferner wurde das außerhalb des Ig- α -ITAMs gelegene Y₂₀₄, über 10 Jahre nach der Beschreibung von Ig- α , als Substrat für cytoplasmatische PTKs identifiziert. Die Interaktion von SLP-65 mit Ig- α -Y₂₀₄ stellt einen möglichen Mechanismus der Membranrekrutierung von SLP-65 dar. Dieser scheint jedoch nicht notwendig für die Initiation von BCR-vermittelten Ca²⁺-Signalen zu sein, sondern stellt möglicherweise eine Markierung für die intrazelluläre Sortierung endocytierter BCR-enhaltender Vesikel dar. Untersuchungen in EBV-positiven B-Zellen erbrachten eine zentrale Funktion von SLP-65 für die Signalleitung des viralen Proteins LMP2A. Die Ergebnisse dieser biochemischen Untersuchungen wurden in Kollaboration mit dem Labor von Richard Longnecker in einem genetischen Mausmodell bestätigt.

Desweiteren werden in dieser Arbeit zwei neue Proteine, p120 und NBP64, vorgestellt, bei denen es sich wahrscheinlich um Adapterproteine ohne katalytische Aktivität handelt. Deren komplette cDNAs wurden kloniert und sequenziert, sowie die Gewebeexpression mittels RT-PCR untersucht. Beide Proteine werden möglicherweise induzierbar im hämatopoetischen System, i.e. nach Aktivierung von Leukocyten durch exogene Stimuli, exprimiert. p120 weist Homologie zu den bekannten Adapterproteinen ADAP und PRAM-1 auf und assoziiert wie diese *in vitro* mit Proteinen der SKAP-Familie. NBP64 stellt ein neues Mitglied der bisher nur wenig beschriebenen Familie der BEACH-Domänen-Proteine dar, und wird präferentiell in lymphatischem Gewebe exprimiert. Diese Entdeckungen legen eine Rolle dieser Proteine bei Signalleitungsprozessen in Leukocyten, bzw. Lymphocyten nahe. Die hier präsentierten Arbeiten liefern die Grundlage für zukünftige Untersuchungen, die hoffentlich zum Verständnis der Regulation immunologischer Prozesse beitragen werden.

REFERENZEN

1. von Behring, E. & Kitasato, S. Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunitaet und der Tetanus-Immunitaet bei Thieren. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* **16**, 1113-1114 (1890).
2. Ehrlich, P. Die Wertbemessung des Diphtherieheilserums. *Klinisches Jahrbuch* **60**, 299 (1897).
3. Tiselius, A. & Kabat, E. A. An Electrophoretic Study of Immune Sera and Purified Antibody Preparations. *J Exp Med* **69**, 119-131 (1939).
4. Edelman, G. M. & Poulik, M. D. Studies on Structural Units of the gamma-Globulins. *J Exp Med* **113**, 861-884 (1961).
5. Porter, R. R. Chemical Structure of Gamma-Globulin and Antibodies. *Brit Med Bull* **19**, 197-201 (1963).
6. Ehrlich, P. The Croonian Lecture: On Immunity. *Proc R Soc Lond* **66**, 424 (1900).
7. Amzel, L. M., Poljak, R. J., Saul, F., Varga, J. M. & Richards, F. F. The Three Dimensional Structure of a Combining Region Ligand Complex of Immunoglobulin NEW at 3,5 A Resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 1427-1430 (1974).
8. Edelman, G. M. *Biochemistry* **9**, 3197 (1970).
9. Burnet, F. M. The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity. *Cambridge University Press, London* (1959).
10. Talmage, D. W. Immunological Specificity, unique combinations of selected natural globulins provide an alternative to the classical concept. *Science* **129**, 1643-1648 (1959).
11. Lederberg, J. Genes and antibodies. *Science* **129**, 1649-1653 (1959).
12. Warner, N. L., Szenberg, A. & Burnet, F. M. The immunological role of different lymphoid organs in the chicken. I. Dissociation of immunological responsiveness. *Aust J Exp Biol* **40**, 373 (1962).
13. Parrot, D. M. V., de Sousa, M. A. B. & East, J. Thymus-dependent areas in lymphoid organs of neonatally thymectomized mice. *J Exp Med* **123**, 191 (1966).
14. Davies, A. J. S., Leuchars, E., Wallis, V., Marchant, R. & Elliot, E. V. The failure of thymus-derived cells to produce antibody. *Transplantation* **5**, 222 (1967).
15. Roitt, I. M., Greaves, M. F., Torrigiani, G., Brostoff, J. & Playfair, J. H. L. The cellular basis of immunological responses. *Lancet* **II**, 367 (1969).
16. Miller, J. F. A. P. & Mitchell, G. F. *Transplant Rev* **1**, 3 (1969).
17. Miller, J. F. A. P. *Int Rev Cytol* **33**, 77 (1972).
18. Greaves, M. F. Biological Effects of Anti-Immunoglobulins: Evidence for Immunoglobulin Receptors on 'T' and 'B' Lymphocytes. *Transplant Rev* **5**, 45-75 (1970).
19. Mitchinson, N. A. Recognition of Antigen. *Symp Int Soc Cell Biol* **7**, 29 (1968).
20. Reth, M. Antigen receptors on B lymphocytes. *Annu Rev Immunol* **10**, 97-121 (1992).
21. Samelson, L. E., Harford, J. B. & Klausner, R. D. Identification of the components of the murine T cell antigen receptor complex. *Cell* **43**, 223-31 (1985).
22. Weissman, A. M., Samelson, L. E. & Klausner, R. D. A new subunit of the human T-cell antigen receptor complex. *Nature* **324**, 480-2 (1986).
23. Campbell, K. S. & Cambier, J. C. B lymphocyte antigen receptors (mIg) are non-covalently associated with a disulfide linked, inducibly phosphorylated glycoprotein complex. *Embo J* **9**, 441-8 (1990).
24. Hombach, J., Tsubata, T., Leclercq, L., Stappert, H. & Reth, M. Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class. *Nature* **343**, 760-2 (1990).

25. Hombach, J., Lottspeich, F. & Reth, M. Identification of the genes encoding the IgM-alpha and Ig-beta components of the IgM antigen receptor complex by amino-terminal sequencing. *Eur J Immunol* **20**, 2795-9 (1990).
26. Campbell, K. S., Hager, E. J. & Cambier, J. C. Alpha-chains of IgM and IgD antigen receptor complexes are differentially N-glycosylated MB-1-related molecules. *J Immunol* **147**, 1575-80 (1991).
27. Reth, M. et al. The B-cell antigen receptor complex. *Immunol Today* **12**, 196-201 (1991).
28. Wienands, J., Hombach, J., Radbruch, A., Riesterer, C. & Reth, M. Molecular components of the B cell antigen receptor complex of class IgD differ partly from those of IgM. *Embo J* **9**, 449-55 (1990).
29. Schamel, W. W. & Reth, M. Monomeric and oligomeric complexes of the B cell antigen receptor. *Immunity* **13**, 5-14 (2000).
30. Tsubata, T. & Reth, M. The products of pre-B cell-specific genes (lambda 5 and VpreB) and the immunoglobulin mu chain form a complex that is transported onto the cell surface. *J Exp Med* **172**, 973-6 (1990).
31. Reth, M. Regulation of B-cell development by pre-B-cell receptors. *Curr Biol* **1**, 198-9 (1991).
32. Melchers, F. et al. The surrogate light chain in B-cell development. *Immunol Today* **14**, 60-68 (1993).
33. Rolink, A. & Melchers, F. B-lymphopoiesis in the mouse. *Adv Immunol* **53**, 123-156 (1993).
34. Rolink, A., Schaniel, C., Andersson, J. & Melchers, F. Selection events operating at various stages B cell development. *Curr Opin Immunol* **13**, 202-207 (2001).
35. Su, Y. W. et al. Identification of a pre-BCR lacking surrogate light chain. *J Exp Med* **198**, 1699-706 (2003).
36. Kenny, J. J., Martinez-Maza, O., Fehniger, T. & Ashman, R. F. Lipid synthesis: an indicator of antigen-induced signal transduction in antigen-binding cells. *J Immunol* **122**, 1278-84 (1979).
37. Young-Karlan, B. R. & Ashman, R. F. Order of events leading to surface immunoglobulin capping: analysis of a transmembrane signal. *J Immunol* **127**, 1177-81 (1981).
38. Cambier, J. C. & Monroe, J. G. B cell activation. V. Differentiation signaling of B cell membrane depolarization, increased I-A expression, G0 to G1 transition, and thymidine uptake by anti-IgM and anti-IgD antibodies. *J Immunol* **133**, 576-81 (1984).
39. Coggeshall, K. M. & Cambier, J. C. B cell activation. VIII. Membrane immunoglobulins transduce signals via activation of phosphatidylinositol hydrolysis. *J Immunol* **133**, 3382-6 (1984).
40. Coggeshall, K. M. & Cambier, J. C. B cell activation. VI. Effects of exogenous diglyceride and modulators of phospholipid metabolism suggest a central role for diacylglycerol generation in transmembrane signaling by mIg. *J Immunol* **134**, 101-7 (1985).
41. Chen, Z. Z., Coggeshall, K. M. & Cambier, J. C. Translocation of protein kinase C during membrane immunoglobulin-mediated transmembrane signaling in B lymphocytes. *J Immunol* **136**, 2300-4 (1986).
42. Ransom, J. T., DiGiusto, D. L. & Cambier, J. C. Single cell analysis of calcium mobilization in anti-immunoglobulin-stimulated B lymphocytes. *J Immunol* **136**, 54-7 (1986).
43. Ransom, J. T. & Cambier, J. C. B cell activation. VII. Independent and synergistic effects of mobilized calcium and diacylglycerol on membrane potential and I-A expression. *J Immunol* **136**, 66-72 (1986).

44. Ransom, J. T., Harris, L. K. & Cambier, J. C. Anti-Ig induces release of inositol 1,4,5-trisphosphate, which mediates mobilization of intracellular Ca^{++} stores in B lymphocytes. *J Immunol* **137**, 708-14 (1986).
45. Samelson, L. E., Patel, M. D., Weissman, A. M., Harford, J. B. & Klausner, R. D. Antigen activation of murine T cells induces tyrosine phosphorylation of a polypeptide associated with the T cell antigen receptor. *Cell* **46**, 1083-90 (1986).
46. Weiss, A. et al. The role of the T3/antigen receptor complex in T-cell activation. *Annu Rev Immunol* **4**, 593-619 (1986).
47. Cambier, J. C. & Ransom, J. T. Molecular mechanisms of transmembrane signaling in B lymphocytes. *Annu Rev Immunol* **5**, 175-99 (1987).
48. Ullman, K. S., Northrop, J. P., Verweij, C. L. & Crabtree, G. R. Transmission Of Signals From The T Lymphocyte Antigen Receptor To The Genes Responsible For Cell Proliferation And Immune Function: The Missing Link. *Annu Rev Immunol* **8**, 421-452 (1990).
49. Reth, M. Antigen receptor tail clue. *Nature* **338**, 383-4 (1989).
50. Cambier, J. C. New nomenclature for the Reth motif (or ARH1/TAM/ARAM/YXXL). *Immunol Today* **16**, 110 (1995).
51. Irving, B. A. & Weiss, A. The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell* **64**, 891-901 (1991).
52. Sadowski, I., Stone, J. C. & Pawson, T. A noncatalytic domain conserved among cytoplasmic protein-tyrosine kinases modifies the kinase function and transforming activity of Fujinami sarcoma virus P130gag-fps. *Mol Cell Biol* **6**, 4396-4408 (1986).
53. Anderson, D. et al. Binding of SH2 domains of phospholipase C gamma 1, GAP, and Src to activated growth factor receptors. *Science* **250**, 979-82 (1990).
54. Songyang, Z. et al. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* **72**, 767-78 (1993).
55. Margolis, B. et al. The tyrosine phosphorylated carboxyterminus of the EGF receptor is a binding site for GAP and PLC-gamma. *Embo J* **9**, 4375-80 (1990).
56. Moran, M. F. et al. Src homology region 2 domains direct protein-protein interactions in signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 8622-6 (1990).
57. Koch, C. A., Anderson, D., Moran, M. F., Ellis, C. & Pawson, T. SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* **252**, 668-74 (1991).
58. Songyang, Z. & Cantley, L. C. SH2 domain specificity determination using oriented phosphopeptide library. *Methods Enzymol* **254**, 523-35 (1995).
59. Songyang, Z. et al. Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav. *Mol Cell Biol* **14**, 2777-85 (1994).
60. Marengere, L. E. et al. SH2 domain specificity and activity modified by a single residue. *Nature* **369**, 502-5 (1994).
61. Mayer, B. J. & Gupta, R. Functions of SH2 and SH3 domains. *Curr Top Microbiol Immunol* **228**, 1-22 (1998).
62. Kim, K. M., Alber, G., Weiser, P. & Reth, M. Differential signaling through the Ig-alpha and Ig-beta components of the B cell antigen receptor. *Eur J Immunol* **23**, 911-6 (1993).
63. Flaswinkel, H. & Reth, M. Dual role of the tyrosine activation motif of the Ig-alpha protein during signal transduction via the B cell antigen receptor. *Embo J* **13**, 83-9 (1994).
64. Williams, G. T., Peaker, C. J., Patel, K. J. & Neuberger, M. S. The alpha/beta sheath and its cytoplasmic tyrosines are required for signaling by the B-cell antigen receptor

- but not for capping of for serine/threonine-kinase recruitment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 474-478 (1994).
65. Sanchez, M. et al. Signal transduction by immunoglobulin is mediated through Ig-a and Ig-b. *J Exp Med* **178**, 1049-1055 (1993).
 66. Harnett, M. & Rigley, K. The role of G-proteins versus protein tyrosine kinases in the regulation of lymphocyte activation. *Immunol Today* **13**, 482-6 (1992).
 67. Klausner, R. D. & Samelson, L. E. T cell antigen receptor activation pathways: the tyrosine kinase connection. *Cell* **64**, 875-8 (1991).
 68. Veillette, A., Bookman, M. A., Horak, E. M., Samelson, L. E. & Bolen, J. B. Signal transduction through the CD4 receptor involves the activation of the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Nature* **338**, 257-9 (1989).
 69. Barber, E. K., Dasgupta, J. D., Schlossman, S. F., Trevillyan, J. M. & Rudd, C. E. The CD4 and CD8 antigens are coupled to a protein-tyrosine kinase (p56lck) that phosphorylates the CD3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 3277-81 (1989).
 70. Rudd, C. E., Trevillyan, J. M., Dasgupta, J. D., Wong, L. L. & Schlossman, S. F. The CD4 receptor is complexed in detergent lysates to a protein-tyrosine kinase (pp58) from human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 5190-4 (1988).
 71. Samelson, L. E., Phillips, A. F., Luong, E. T. & Klausner, R. D. Association of the fyn protein-tyrosine kinase with the T-cell antigen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4358-62 (1990).
 72. Eiseman, E. & Bolen, J. B. src-related tyrosine protein kinases as signaling components in hematopoietic cells. *Cancer Cells* **2**, 303-10 (1990).
 73. Burg, D. L., Furlong, M. T., Harrison, M. L. & Geahlen, R. L. Interactions of Lyn with the antigen receptor during B cell activation. *J Biol Chem* **269**, 28136-42 (1994).
 74. Rudd, C. E. CD4, CD8 and the TCR-CD3 complex: a novel class of protein-tyrosine kinase receptor. *Immunol Today* **11**, 400-6 (1990).
 75. Rudd, C. E. et al. Two-step TCR zeta/CD3-CD4 and CD28 signaling in T cells: SH2/SH3 domains, protein-tyrosine and lipid kinases. *Immunol Today* **15**, 225-34 (1994).
 76. Bolen, J. B., Thompson, P. A., Eiseman, E. & Horak, I. D. Expression and interactions of the Src family of tyrosine protein kinases in T lymphocytes. *Adv Cancer Res* **57**, 103-49 (1991).
 77. Yamanashi, Y. et al. Selective expression of a protein-tyrosine kinase, p56lyn, in hematopoietic cells and association with production of human T-cell lymphotropic virus type I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 6538-42 (1989).
 78. Pleiman, C. M. et al. Distinct p53/56lyn and p59fyn domains associate with nonphosphorylated and phosphorylated Ig-alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4268-72 (1994).
 79. Timson Gauen, L. K., Kong, A. N., Samelson, L. E. & Shaw, A. S. p59fyn tyrosine kinase associates with multiple T-cell receptor subunits through its unique amino-terminal domain. *Mol Cell Biol* **12**, 5438-46 (1992).
 80. Yamamoto, T., Yamanashi, Y. & Toyoshima, K. Association of Src-family kinase Lyn with B-cell antigen receptor. *Immunol Rev* **132**, 187-206 (1993).
 81. Clark, M. R., Johnson, S. A. & Cambier, J. C. Analysis of Ig-a - tyrosine kinase interaction reveals two levels of binding specificity and tyrosine phosphorylated Ig-a stimulation of Fyn activity. *Embo J* **13**, 1911-1914 (1994).
 82. Straus, D. B. & Weiss, A. Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell* **70**, 585-93 (1992).
 83. Takata, M. et al. Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor-coupled Ca²⁺ mobilization through distinct pathways. *Embo J* **13**, 1341-9 (1994).

84. Kurosaki, T. Genetic analysis of B cell antigen receptor signaling. *Annu Rev Immunol* **17**, 555-92 (1999).
85. Bolen, J. B., Rowley, R. B., Spana, C. & Tsygankov, A. Y. The Src family of tyrosine protein kinases in hemopoietic signal transduction. *Faseb J* **6**, 3403-9 (1992).
86. Kobayashi, T., Nakamura, S., Taniguchi, T. & Yamamura, H. Purification and characterization of a cytosolic protein-tyrosine kinase from porcine spleen. *Eur J Biochem* **188**, 535-40 (1990).
87. Taniguchi, T. et al. Molecular cloning of a porcine gene syk that encodes a 72-kDa protein-tyrosine kinase showing high susceptibility to proteolysis. *J Biol Chem* **266**, 15790-6 (1991).
88. Hutchcroft, J. E., Harrison, M. L. & Geahlen, R. L. B lymphocyte activation is accompanied by phosphorylation of a 72-kDa protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* **266**, 14846-9 (1991).
89. Chan, A. C., Irving, B. A., Fraser, J. D. & Weiss, A. The zeta chain is associated with a tyrosine kinase and upon T-cell antigen receptor stimulation associates with ZAP-70, a 70-kDa tyrosine phosphoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9166-70 (1991).
90. Chan, A. C., Iwashima, M., Turck, C. W. & Weiss, A. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* **71**, 649-62 (1992).
91. Wange, R. L., Malek, S. N., Desiderio, S. & Samelson, L. E. Tandem SH2 domains of ZAP-70 bind to T cell antigen receptor zeta and CD3 epsilon from activated Jurkat T cells. *J Biol Chem* **268**, 19797-801 (1993).
92. Cambier, J. C. & Johnson, S. A. Differential binding activity of ARH1/TAM motifs. *Immunol Lett* **44**, 77-80 (1995).
93. Isakov, N. et al. ZAP-70 binding specificity to T cell receptor tyrosine-based activation motifs: the tandem SH2 domains of ZAP-70 bind distinct tyrosine-based activation motifs with varying affinity. *J Exp Med* **181**, 375-80 (1995).
94. Hatada, M. H. et al. Molecular Basis for interaction of the protein tyrosine kinase ZAP-70 with the T-cell receptor. *Nature* **377**, 32-38 (1995).
95. Yamada, T. et al. Association with B-cell-antigen receptor with protein-tyrosine kinase p72syk and activation by engagement of membrane IgM. *Eur J Biochem* **213**, 455-9 (1993).
96. Kurosaki, T. et al. Role of the Syk autophosphorylation site and SH2 domains in B cell antigen receptor signaling. *J Exp Med* **182**, 1815-23 (1995).
97. Wienands, J., Freuler, F. & Baumann, G. Tyrosine-phosphorylated forms of Ig beta, CD22, TCR zeta and HOSS are major ligands for tandem SH2 domains of Syk. *Int Immunol* **7**, 1701-8 (1995).
98. Futterer, K., Wong, J., Grucza, R. A., Chan, A. C. & Waksman, G. Structural basis for Syk tyrosine kinase ubiquity in signal transduction pathways revealed by the crystal structure of its regulatory SH2 domains bound to a dually phosphorylated ITAM peptide. *J Mol Biol* **281**, 523-37 (1998).
99. Neumeister, E. N. et al. Binding of ZAP-70 to phosphorylated T-cell receptor zeta and eta enhances its autophosphorylation and generates specific binding sites for SH2 domain-containing proteins. *Mol Cell Biol* **15**, 3171-8 (1995).
100. Johnson, S. A. et al. Phosphorylated immunoreceptor signaling motifs (ITAMs) exhibit unique abilities to bind and activate Lyn and Syk tyrosine kinases. *J Immunol* **155**, 4596-603 (1995).
101. Rowley, R. B., Burkhardt, A. L., Chao, H. G., Matsueda, G. R. & Bolen, J. B. Syk protein-tyrosine kinase is regulated by tyrosine-phosphorylated Ig alpha/Ig beta immunoreceptor tyrosine activation motif binding and autophosphorylation. *J Biol Chem* **270**, 11590-4 (1995).

102. Rolli, V. et al. Amplification of B cell antigen receptor signaling by a Syk/ITAM positive feedback loop. *Mol Cell* **10**, 1057-69 (2002).
103. Grazioli, L., Germain, V., Weiss, A. & Acuto, O. Anti-peptide Antibodies Detect Conformational Changes of the Inter-SH2 Domain of ZAP-70 Due to Binding to the zeta Chain and to Intramolecular Interactions. *J Biol Chem* **273**, 8916-8921 (1998).
104. Visco, C. et al. Activation of ZAP-70 Tyrosine Kinase Due to a Structural Rearrangement Induced by Tyrosine Phosphorylation and/or ITAM Binding. *Biochemistry* **39**, 2784-2791 (2000).
105. Shiue, L., Zoller, M. J. & Brugge, J. S. Syk Is Activated by Phosphotyrosine-containing Peptides Representing the Tyrosine-based Activation Motifs of the High Affinity Receptor for IgE. *J Biol Chem* **270**, 10498-10502 (1995).
106. Kimura, T., Sakamoto, H., Appella, E. & Siraganian, R. P. Conformational Changes Induced in the Protein Tyrosine Kinase p72syk by Tyrosine Phosphorylation or by Binding or Phosphorylated Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif Peptides. *Mol Cell Biol* **16**, 1471-1478 (1996).
107. Wienands, J., Larbolette, O. & Reth, M. Evidence for a preformed transducer complex organized by the B cell antigen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7865-70 (1996).
108. Bannish, G., Fuentes-Panana, E. M., Cambier, J. C., Pear, W. S. & Monroe, J. G. Ligand-independent signaling functions for the B lymphocyte antigen receptor and their role in positive selection during B lymphopoiesis. *J Exp Med* **194**, 1583-96 (2001).
109. Lam, K. P., Kuhn, R. & Rajewsky, K. In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature b cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* **90**, 1073-1083 (1997).
110. Neuberger, M. S. Antigen receptor signaling gives lymphocytes a long life. *Cell* **90**, 971-973 (1997).
111. Bruton, O. C. Agammaglobulinemia. *Pediatrics* **9**, 722-727 (1952).
112. Vetrie, D. et al. The gene involved in X-linked agammaglobulinemia is a member of the src family of the protein tyrosine kinases. *Nature* **361**, 226-233 (1993).
113. Tsukada, S. et al. Deficient of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell* **72** (1993).
114. Tanaka, N., Asao, H., Ohtani, K., Nakamura, M. & Sugamura, K. A novel human tyrosine kinase gene inducible in T cells by interleukin 2. *FEBS Lett* **324**, 1-5 (1993).
115. Gibson, S. et al. Identification, cloning, and characterization of a novel human T-cell-specific tyrosine kinase located at the hematopoietin complex on chromosome 5q. *Blood* **82**, 1561-72 (1993).
116. Winslow, M. M., Neilson, J. R. & Crabtree, G. R. Calcium signalling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* **15**, 299-307 (2003).
117. Margolis, B. et al. EGF induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II: a potential mechanism for EGF receptor signaling. *Cell* **57**, 1101-7 (1989).
118. Nishibe, S., Wahl, M. I., Rhee, S. G. & Carpenter, G. Tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II in vitro by the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* **264**, 10335-8 (1989).
119. Wahl, M. I., Nishibe, S., Suh, P. G., Rhee, S. G. & Carpenter, G. Epidermal growth factor stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II independently of receptor internalization and extracellular calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 1568-72 (1989).
120. Nishibe, S. et al. Increase of the catalytic activity of phospholipase C-gamma 1 by tyrosine phosphorylation. *Science* **250**, 1253-6 (1990).

121. Wahl, M. I. et al. Identification of two epidermal growth factor-sensitive tyrosine phosphorylation sites of phospholipase C-gamma in intact HSC-1 cells. *J Biol Chem* **265**, 3944-8 (1990).
122. Meisenhelder, J., Suh, P. G., Rhee, S. G. & Hunter, T. Phospholipase C-gamma is a substrate for the PDGF and EGF receptor protein-tyrosine kinases in vivo and in vitro. *Cell* **57**, 1109-22 (1989).
123. Wahl, M. I. et al. Platelet-derived growth factor induces rapid and sustained tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma in quiescent BALB/c 3T3 cells. *Mol Cell Biol* **9**, 2934-43 (1989).
124. Kim, H. K. et al. PDGF stimulation of inositol phospholipid hydrolysis requires PLC-gamma 1 phosphorylation on tyrosine residues 783 and 1254. *Cell* **65**, 435-41 (1991).
125. Coggeshall, K. M., McHugh, J. C. & Altman, A. Predominant expression and activation-induced tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 2 in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5660-4 (1992).
126. Takata, M., Homma, Y. & Kurosaki, T. Requirement of phospholipase C-gamma 2 activation in surface immunoglobulin M-induced B cell apoptosis. *J Exp Med* **182**, 907-14 (1995).
127. Mayer, B. J., Hamaguchi, M. & Hanafusa, H. A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C. *Nature* **332**, 272-5 (1988).
128. Jackman, J. K. et al. Molecular cloning of SLP-76, a 76-kDa tyrosine phosphoprotein associated with Grb2 in T cells. *J Biol Chem* **270**, 7029-32 (1995).
129. Clements, J. L., Ross-Barta, S. E., Tygrett, L. T., Waldschmidt, T. J. & Koretzky, G. A. SLP-76 expression is restricted to hemopoietic cells of monocyte, granulocyte, and T lymphocyte lineage and is regulated during T cell maturation and activation. *J Immunol* **161**, 3880-9 (1998).
130. Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R. P. & Samelson, L. E. LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* **92**, 83-92 (1998).
131. Finco, T. S., Kadlecsek, T., Zhang, W., Samelson, L. E. & Weiss, A. LAT is required for TCR-mediated activation of PLCgamma1 and the Ras pathway. *Immunity* **9**, 617-26 (1998).
132. Zhang, W. et al. Essential role of LAT in T cell development. *Immunity* **10**, 323-32 (1999).
133. Clements, J. L. et al. Requirement for the leukocyte-specific adapter protein SLP-76 for normal T cell development. *Science* **281**, 416-9 (1998).
134. Yablonski, D., Kuhne, M. R., Kadlecsek, T. & Weiss, A. Uncoupling of nonreceptor tyrosine kinases from PLC-gamma1 in an SLP-76-deficient T cell. *Science* **281**, 413-6 (1998).
135. Liu, S. K., Fang, N., Koretzky, G. A. & McGlade, C. J. The hematopoietic-specific adaptor protein gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors. *Curr Biol* **9**, 67-75 (1999).
136. Singer, A. L. et al. Roles of the proline-rich domain in SLP-76 subcellular localization and T cell function. *J Biol Chem* **279**, 15481-90 (2004).
137. Boerth, N. J. et al. Recruitment of SLP-76 to the membrane and glycolipid-enriched membrane microdomains replaces the requirement for linker for activation of T cells in T cell receptor signaling. *J Exp Med* **192**, 1047-58 (2000).
138. Ishiai, M. et al. Involvement of LAT, Gads, and Grb2 in compartmentation of SLP-76 to the plasma membrane. *J Exp Med* **192**, 847-56 (2000).
139. Wienands, J. et al. SLP-65: a new signaling component in B lymphocytes which requires expression of the antigen receptor for phosphorylation. *J Exp Med* **188**, 791-5 (1998).

140. Fu, C., Turck, C. W., Kurosaki, T. & Chan, A. C. BLNK: a central linker protein in B cell activation. *Immunity* **9**, 93-103 (1998).
141. Goitsuka, R. et al. BASH, a novel signaling molecule preferentially expressed in B cells of the bursa of Fabricius. *J Immunol* **161**, 5804-8 (1998).
142. Bonilla, F. A., Fujita, R. M., Pivniouk, V. I., Chan, A. C. & Geha, R. S. Adapter proteins SLP-76 and BLNK both are expressed by murine macrophages and are linked to signaling via Fcγ receptors I and II/III. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1725-30 (2000).
143. Su, Y. W. et al. Interaction of SLP adaptors with the SH2 domain of Tec family kinases. *Eur J Immunol* **29**, 3702-11 (1999).
144. Hashimoto, S. et al. Identification of the SH2 domain binding protein of Bruton's tyrosine kinase as BLNK--functional significance of Btk-SH2 domain in B-cell antigen receptor-coupled calcium signaling. *Blood* **94**, 2357-64 (1999).
145. Ishiai, M., Sugawara, H., Kurosaki, M. & Kurosaki, T. Cutting edge: association of phospholipase C-γ2 Src homology 2 domains with BLNK is critical for B cell antigen receptor signaling. *J Immunol* **163**, 1746-9 (1999).
146. Ishiai, M. et al. BLNK required for coupling Syk to PLC γ2 and Rac1-JNK in B cells. *Immunity* **10**, 117-25 (1999).
147. Kurosaki, T. & Tsukada, S. BLNK: connecting Syk and Btk to calcium signals. *Immunity* **12**, 1-5 (2000).
148. Brdicka, T. et al. Non-T cell activation linker (NTAL): a transmembrane adaptor protein involved in immunoreceptor signaling. *J Exp Med* **196**, 1617-26 (2002).
149. Janssen, E., Zhu, M., Zhang, W., Koonpaew, S. & Zhang, W. LAB: a new membrane-associated adaptor molecule in B cell activation. *Nat Immunol* **4**, 117-123 (2003).
150. Stork, B. et al. Grb2 and the Non-T Cell Activation Linker NTAL Constitute a Ca²⁺-Regulating Signal Circuit in B Lymphocytes. *Immunity* **21**, 681-91 (2004).
151. Flemming, A., Brummer, T., Reth, M. & Jumaa, H. The adaptor protein SLP-65 acts as a tumor suppressor that limits pre-B cell expansion. *Nat Immunol* **4**, 38-43 (2003).
152. Kersseboom, R. et al. Bruton's tyrosine kinase cooperates with the B cell linker protein SLP-65 as a tumor suppressor in Pre-B cells. *J Exp Med* **198**, 91-8 (2003).
153. Jumaa, H. et al. Deficiency of the adaptor SLP-65 in pre-B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **423**, 452-6 (2003).
154. Middendorp, S. et al. Tumor suppressor function of Bruton's tyrosine kinase is independent of its catalytic activity. *Blood* **105**, 259-265 (2005).
155. Engels, N., Wollscheid, B. & Wienands, J. Association of SLP-65/BLNK with the B cell antigen receptor through a non-ITAM tyrosine of Ig-α. *Eur J Immunol* **31**, 2126-34 (2001).
156. Kabak, S. et al. The direct recruitment of BLNK to immunoglobulin α couples the B-cell antigen receptor to distal signaling pathways. *Mol Cell Biol* **22**, 2524-35 (2002).
157. Wienands, J. & Engels, N. Multitasking of Ig-α and Ig-β to regulate B cell antigen receptor function. *Int Rev Immunol* **20**, 679-96 (2001).
158. Musci, M. A. et al. Molecular cloning of SLAP-130, an SLP-76-associated substrate of the T cell antigen receptor-stimulated protein tyrosine kinases. *J Biol Chem* **272**, 11674-7 (1997).
159. da Silva, A. J. et al. Cloning of a novel T-cell protein FYB that binds FYN and SH2-domain-containing leukocyte protein 76 and modulates interleukin 2 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7493-8 (1997).
160. Wu, J. N., Jordan, M. S., Silverman, M. A., Peterson, E. J. & Koretzky, G. A. Differential requirement for adapter proteins Src homology 2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kDa and adhesion- and degranulation-promoting

- adapter protein in FcepsilonRI signaling and mast cell function. *J Immunol* **172**, 6768-74 (2004).
161. Veale, M. et al. Novel isoform of lymphoid adaptor FYN-T-binding protein (FYB-130) interacts with SLP-76 and up-regulates interleukin 2 production. *J Biol Chem* **274**, 28427-35 (1999).
162. Kang, H. et al. SH3 domain recognition of a proline-independent tyrosine-based RKxxYxxY motif in immune cell adaptor SKAP55. *Embo J* **19**, 2889-99 (2000).
163. Heuer, K., Kofler, M., Langdon, G., Thiemke, K. & Freund, C. Structure of a helically extended SH3 domain of the T cell adapter protein ADAP. *Structure (Camb)* **12**, 603-10 (2004).
164. Marie-Cardine, A. et al. Molecular interaction between the Fyn-associated protein SKAP55 and the SLP-76-associated phosphoprotein SLAP-130. *J Biol Chem* **273**, 25789-95 (1998).
165. Liu, J. et al. FYB (FYN binding protein) serves as a binding partner for lymphoid protein and FYN kinase substrate SKAP55 and a SKAP55-related protein in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8779-84 (1998).
166. Krause, M. et al. Fyn-binding protein (Fyb)/SLP-76-associated protein (SLAP), Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) proteins and the Arp2/3 complex link T cell receptor (TCR) signaling to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* **149**, 181-194 (2000).
167. Boerth, N. J., Judd, B. A. & Koretzky, G. A. Functional association between SLAP-130 and SLP-76 in Jurkat T cells. *J Biol Chem* **275**, 5143-52 (2000).
168. Peterson, E. J. et al. Coupling of the TCR to integrin activation by Slap-130/Fyb. *Science* **293**, 2263-5 (2001).
169. Griffiths, E. K. et al. Positive regulation of T cell activation and integrin adhesion by the adapter Fyb/Slap. *Science* **293**, 2260-3 (2001).
170. Woodside, D. G., Shattil, S. J. & Ginsberg, M. H. The T Cell Receptor SLAPs Integrins Together. *Nat Immunol* **2**, 904-905 (2001).
171. Abraham, R. T. Antigen receptors rap to integrin receptors. *Nat Immunol* **3**, 212-213 (2002).
172. Obergefell, A. et al. The molecular adapter SLP-76 relays signals from platelet integrin alphaIIb beta3 to the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* **276**, 5916-23 (2001).
173. Wang, H. et al. SKAP-55 regulates integrin adhesion and formation of T cell-APC conjugates. *Nat Immunol* **4**, 366-74 (2003).
174. Spaargaren, M. et al. The B cell antigen receptor controls integrin activity through Btk and PLCgamma2. *J Exp Med* **198**, 1539-50 (2003).
175. Moog-Lutz, C. et al. PRAM-1 is a novel adaptor protein regulated by retinoic acid (RA) and promyelocytic leukemia (PML)-RA receptor alpha in acute promyelocytic leukemia cells. *J Biol Chem* **276**, 22375-81 (2001).
176. Clemens, R. A. et al. PRAM-1 is required for optimal integrin-dependent neutrophil function. *Mol Cell Biol* **24**, 10923-10932 (2004).
177. Nagle, D. L. et al. Identification and mutation analysis of the complete gene for Chediak-Higashi syndrome. *Nat Genet* **14**, 307-11 (1996).
178. Peron, C. M. et al. Identification of the murine beige gene by YAC complementation and positional cloning. *Nat Genet* **13**, 303-308 (1996).
179. Barbosa, M. D. et al. Identification of the homologous beige and Chediak-Higashi syndrome genes. *Nature* **382**, 262--265 (1996).
180. Haddad, E. et al. Treatment of Chediak-Higashi syndrome by allogenic bone marrow transplantation: report of 10 cases. *Blood* **85**, 3328-33 (1995).
181. Ward, D. M., Shiflett, S. L. & Kaplan, J. Chediak-Higashi syndrome: a clinical and molecular view of a rare lysosomal storage disorder. *Curr Mol Med* **2**, 469-77 (2002).

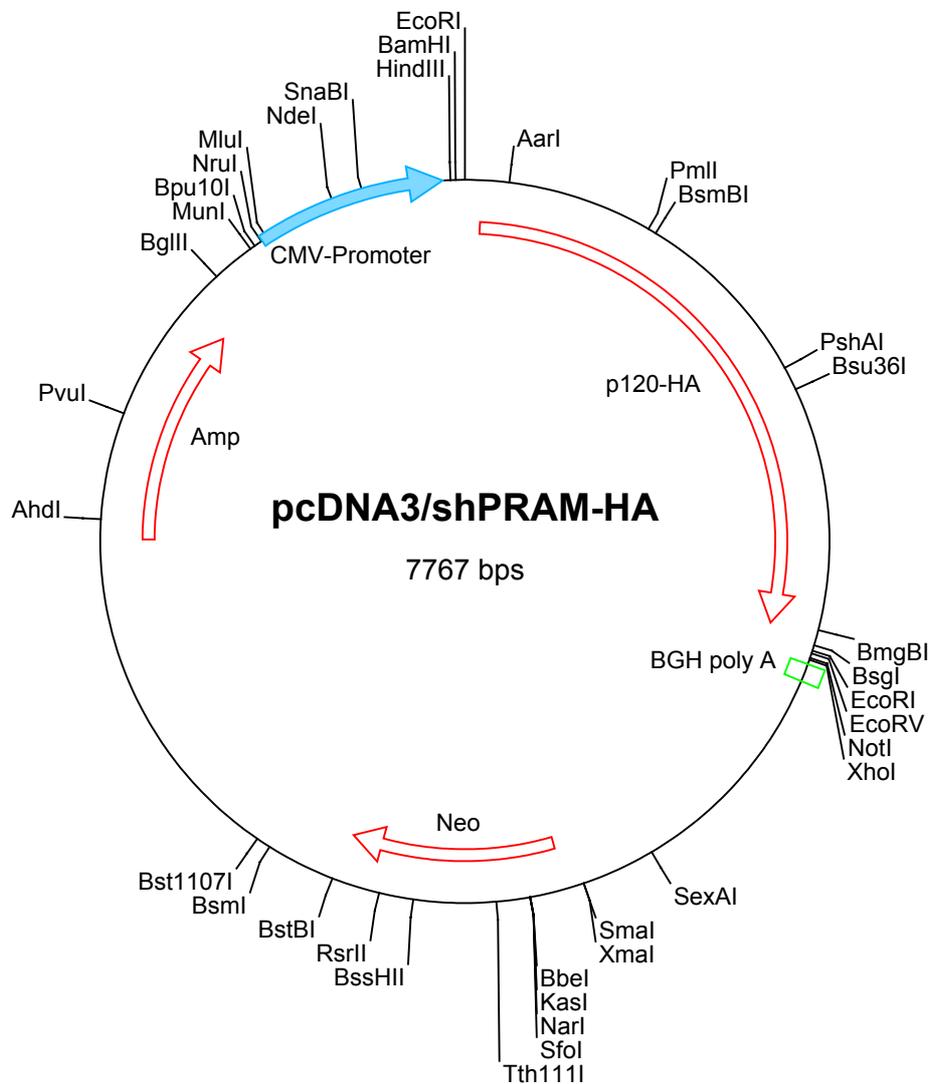
182. Spritz, R. A. Genetic defects in Chediak-Higashi syndrome and the beige mouse. *J Clin Immunol* **18**, 97-105 (1998).
183. Ward, D. M., Griffiths, G. M., Stinchcombe, J. C. & Kaplan, J. Analysis of the lysosomal storage disease Chediak-Higashi syndrome. *Traffic* **1**, 816-22 (2000).
184. Shiflett, S. L., Kaplan, J. & Ward, D. M. Chediak-Higashi Syndrome: a rare disorder of lysosomes and lysosome related organelles. *Pigment Cell Res* **15**, 251-7 (2002).
185. Wang, X. et al. Neurobeachin: A protein kinase A-anchoring, beige/Chediak-higashi protein homolog implicated in neuronal membrane traffic. *J Neurosci* **20**, 8551-65 (2000).
186. Chen, G. Y., Muramatsu, H., Ichihara-Tanaka, K. & Muramatsu, T. Expression profile of mouse BWF1, a protein with a BEACH domain, WD40 domain and FYVE domain. *Cell Struct Funct* **29**, 35-42 (2004).
187. Simonsen, A. et al. Alfy, a novel FYVE-domain-containing protein associated with protein granules and autophagic membranes. *J Cell Sci* **117**, 4239-4251 (2004).
188. Wang, J. W., Howson, J., Haller, E. & Kerr, W. G. Identification of a Novel Lipopolysaccharide-Inducible Gene with Key Features of Both a Kinase Anchor Proteins and chs1/beige Proteins. *J Immunol* **166**, 4586-4595 (2001).
189. Wang, N., Wu, W. I. & De Lozanne, A. BEACH family of proteins: phylogenetic and functional analysis of six Dictyostelium BEACH proteins. *J Cell Biochem* **86**, 561-70 (2002).
190. Jogl, G. et al. Crystal structure of the BEACH domain reveals an unusual fold and extensive association with a novel PH domain. *Embo J* **21**, 4785-95 (2002).
191. Su, Y. et al. Neurobeachin Is Essential for Neuromuscular Synaptic Transmission. *J Neurosci* **24**, 3627-3636 (2004).
192. Simons, K. & Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572 (1997).
193. Field, K. A., Holowka, D. & Baird, B. Fc epsilon RI-mediated recruitment of p53/56lyn to detergent resistant membrane domains accompanies cellular signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9201-9205 (1995).
194. Stauffer, T. P. & Meyer, T. Compartmentalized IgE receptor-mediated signal transduction in living cells. *J Cell Biol* **139**, 1447-1454 (1997).
195. Draberova, L. & Draber, P. Thy-1 glycoprotein and src-like protein-tyrosine kinase p53/p56lyn are associated in large detergent-resistant complexes in rat basophilic leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3611-3615 (1993).
196. Aman, M. J. & Ravichandran, K. S. A requirement for lipid rafts in B cell receptor induced Ca²⁺ flux. *Curr Biol* **10**, 393-396 (2000).
197. Petrie, R. J., Schnetkamp, P. P. M., Patel, K. D., Awasthi-Kalia, M. & Deans, J. P. Transient Translocation of the B Cell Receptor and Src Homology 2 Domain-Containing Inositol Phosphatase to Lipid Rafts: Evidence Toward a Role in Calcium Regulation. *J Immunol* **165**, 1220-1227 (2000).
198. Cheng, P. C., Dykstra, M. L., Mitchell, R. N. & Pierce, S. K. A Role for Lipid Rafts in B Cell Antigen Receptor Signaling and Antigen Targeting. *J Exp Med* **190**, 1549-1560 (1999).
199. Xavier, R., Brennan, R., Li, Q., McCormack, C. & Seed, B. Membrane Compartmentation Is Required for Efficient T Cell Activation. *Immunity* **8**, 723-732 (1998).
200. Janes, P. W., Ley, S. C. & Magee, A. I. Aggregation of Lipid Rafts Accompanies Signaling Via the T Cell Antigen Receptor. *J Cell Biol* **147**, 447-461 (1999).
201. Pizzo, P. & Viola, A. Lymphocyte lipid rafts: structure and function. *Curr Opin Immunol* **15**, 255-260 (2003).

202. Dykstra, M. L., Cherukuri, A., Sohn, H. W., Tzeng, S. J. & Pierce, S. K. Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling. *Annu Rev Immunol* **21**, 457-481 (2003).
203. Zhang, W., Tribble, R. P. & Samelson, L. E. LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity* **9**, 239-46 (1998).
204. Longnecker, R. & Kieff, E. A second Epstein-Barr virus membrane protein (LMP2) is expressed in latent infection and colocalizes with LMP1. *J Virol* **64**, 2319-26 (1990).
205. Rickinson, A. B. & Kieff, E. Epstein-Barr virus. *Field's Virology*, Lippincott Raven Publishers, Philadelphia, PA, 2397-2446 (1996).
206. Thierney, R. J., Steven, N., Young, L. S. & Rickinson, A. B. Epstein-Barr virus latency in blood monocuclear cells: analysis of viral gene transcription during primary infection and in the carrier state. *J Virol* **68**, 7374-7385 (1994).
207. Qu, L. & Rowe, D. T. Epstein-Barr virus latent gene expression in uncultured peripheral blood lymphocytes. *J Virol* **66**, 3715-3724 (1992).
208. Qu, L. et al. Epstein-Barr virus gene expression in the peripheral blood of transplant recipients with persistent circulating virus loads. *J Infect Dis* **182**, 1013-1021 (2000).
209. Babcock, G. J. & Thorley-Lawson, D. A. Tonsillar memory B cells, latently infected with Epstein-Barr virus, express the restricted pattern of latent genes previously found only in Epstein-Barr virus-associated tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12250-12255 (2000).
210. Alber, G. et al. Molecular mimicry of the antigen receptor signalling motif by transmembrane proteins of the Epstein-Barr virus and the bovine leukaemia virus. *Curr Biol* **3**, 333-9 (1993).
211. Fruehling, S. & Longnecker, R. The immunoreceptor tyrosine-based activation motif of Epstein-Barr virus LMP2A is essential for blocking BCR-mediated signal transduction. *Virology* **235**, 241-51 (1997).
212. Fruehling, S., Swart, R., Dolwick, K. M., Kremmer, E. & Longnecker, R. Tyrosine 112 of latent membrane protein 2A is essential for protein tyrosine kinase loading and regulation of Epstein-Barr virus latency. *J Virol* **72**, 7796-806 (1998).
213. Ikeda, M., Ikeda, A., Longan, L. C. & Longnecker, R. The Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A PY motif recruits WW domain-containing ubiquitin-protein ligases. *Virology* **268**, 178-91 (2000).
214. Panousis, C. G. & Rowe, D. T. Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 2 Associates with and Is a Substrate for Mitogen-Activated Protein Kinase. *J Virol* **71**, 4752-4760 (1997).
215. Dykstra, M. L., Longnecker, R. & Pierce, S. K. Epstein-Barr virus coopts lipid rafts to block the signaling and antigen transport functions of the BCR. *Immunity* **14**, 57-67 (2001).
216. Miller, C. L., Longnecker, R. & Kieff, E. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A blocks calcium mobilization in B lymphocytes. *J Virol* **67**, 3087-94 (1993).
217. Miller, C. L., Lee, J. H., Kieff, E. & Longnecker, R. An integral membrane protein (LMP2) blocks reactivation of Epstein-Barr virus from latency following surface immunoglobulin crosslinking. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 772-6 (1994).
218. Miller, C. L. et al. Integral membrane protein 2 of Epstein-Barr virus regulates reactivation from latency through dominant negative effects on protein-tyrosine kinases. *Immunity* **2**, 155-66 (1995).
219. Portis, T., Ikeda, M. & Longnecker, R. Epstein-Barr virus LMP2A: regulating cellular ubiquitination processes for maintenance of viral latency? *Trends Immunol* **25**, 422-6 (2004).

220. Merchant, M. et al. The effects of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A on B cell function. *Int Rev Immunol* **20**, 805-35 (2001).
221. Fruehling, S. et al. Identification of latent membrane protein 2A (LMP2A) domains essential for the LMP2A dominant-negative effect on B-lymphocyte surface immunoglobulin signal transduction. *J Virol* **70**, 6216-26 (1996).
222. Caldwell, R. G., Wilson, J. B., Anderson, S. J. & Longnecker, R. Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity* **9**, 405-11 (1998).
223. Bradl, H. & Jack, H. M. Surrogate light chain-mediated interaction of a soluble pre-B cell receptor with adherent cell lines. *J Immunol* **167**, 6403-6411 (2001).
224. Gauthier, L., Rossi, B., Roux, F., Termine, E. & Schiff, C. Galectin-1 is a stromal cell ligand of the pre-B cell receptor (BCR) implicated in synapse formation between pre-B and stromal cells and in pre-BCR triggering. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13014-13019 (2002).
225. Bradl, H., Wittmann, J., Milius, D., Vettermann, C. & Jack, H. M. Interaction of murine precursor B cell receptor with stroma cells is controlled by the unique tail of lambda 5 and stroma cell-associated heparan sulfate. *J Immunol* **171**, 2338-2348 (2003).
226. Wang, H. & Clarke, S. H. Evidence for a ligand-mediated positive selection signal in differentiation to a mature B cell. *J Immunol* **171**, 6381-6388 (2003).
227. Merchant, M. & Longnecker, R. LMP2A survival and developmental signals are transmitted through Btk-dependent and Btk-independent pathways. *Virology* **291**, 46-54 (2001).
228. Swart, R., Ruf, I. K., Sample, J. & Longnecker, R. Latent membrane protein 2A-mediated effects on the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt pathway. *J Virol* **74**, 10838-45 (2000).
229. Portis, T. & Longnecker, R. Epstein-Barr virus (EBV) LMP2A mediates B-lymphocyte survival through constitutive activation of the Ras/PI3K/Akt pathway. *Oncogene* **23**, 8619-28 (2004).
230. Engels, N. et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A (LMP2A) employs the SLP-65 signaling module. *J Exp Med* **194**, 255-64 (2001).
231. Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28 (1990).
232. Sayeh, C. E., Demaries, S. L., Pike, K. A., Friedman, J. E. & Ratcliffe, M. J. The chicken B-cell receptor complex and its role in avian B-cell development. *Immunol Rev* **175**, 187-200 (2000).
233. Minegishi, Y. et al. An essential role for BLNK in human B cell development. *Science* **286**, 1954-7 (1999).
234. Gebauer, D. et al. Crystal Structure of the PH-BEACH Domains of Human LRBA/BGL. *Biochemistry* **43**, 14873-80 (2004).
235. Tsuji, S. et al. B cell adaptor containing src homology 2 domain (BASH) links B cell receptor signaling to the activation of hematopoietic progenitor kinase 1. *J Exp Med* **194**, 529-39 (2001).
236. Sauer, K. et al. The Kinase HPK1 Associates Physically and Functionally with the Adaptor Proteins BLNK and SLP-76 in Lymphocytes. *J Biol Chem* (2001).
237. Patschinsky, T., Hunter, T., Esch, F. S., Cooper, J. A. & Sefton, B. M. Analysis of the sequence of amino acids surrounding sites of tyrosine phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 973-977 (1982).
238. Hunter, T. Synthetic peptide substrates for a tyrosine protein kinase. *J Biol Chem* **257**, 4843-4848 (1982).

239. Songyang, Z. et al. Catalytic specificity of protein-tyrosine kinases is critical for selective signalling. *Nature* **373**, 536-539 (1995).
240. Kraus, M. et al. Interference with immunoglobulin (Ig)alpha immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) phosphorylation modulates or blocks B cell development, depending on the availability of an Igbeta cytoplasmic tail. *J Exp Med* **194**, 455-469 (2001).
241. Reichlin, A. et al. A B cell receptor with two Igalph cytoplasmic domains supports development of mature but anergic B cells. *J Exp Med* **199**, 855-865 (2004).
242. Pao, L. I., Famiglietti, S. J. & Cambier, J. C. Asymmetrical phosphorylation and function of immunoreceptor tyrosine-based activation motif tyrosines in B cell antigen receptor signal transduction. *J Immunol* **160**, 3305-14 (1998).
243. Choquet, D. et al. Different patterns of calcium signaling triggered through two components of the B-lymphocyte antigen receptor. *J Biol Chem* **269** (1994).
244. Luisiri, P., Lee, Y. J., Eisfelder, B. J. & Clark, M. R. Cooperativity and segregation of function within the Ig-alpha/beta heterodimer of the B cell antigen receptor complex. *J Biol Chem* **271**, 5158-5163 (1996).
245. Taddie, J. A., Hurley, T. R., Hardwick, B. S. & Sefton, B. M. Activation of B- and T-cells by the cytoplasmic domains of the B-cell antigen receptor proteins Ig-alpha and Ig-beta. *J Biol Chem* **269** (1994).
246. Law, D. A., Chan, V. W. F., Datta, S. K. & De Franco, A. B-cell antigen receptor motifs have redundant signaling capabilities and bind the tyrosine kinases PTK72, Lyn and Fyn. *Curr Biol* **3**, 645-657 (1993).
247. Reichlin, A. et al. B cell development is arrested at the immature stage in mice carrying a mutation in the cytoplasmic domain of immunoglobulin beta. *J Exp Med* **193**, 13-23 (2001).
248. Muller, R., Wienands, J. & Reth, M. The serine and threonine residues in the Ig-alpha cytoplasmic tail negatively regulate immunoreceptor tyrosine-based activation motif-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8451-4 (2000).
249. Siemasko, K. et al. Receptor-Facilitated Antigen Presentation Requires the Recruitment of B Cell Linker Protein to Ig-alpha. *J Immunol* **168**, 2127-2138 (2002).
250. Merchant, M., Caldwell, R. G. & Longnecker, R. The LMP2A ITAM is essential for providing B cells with development and survival signals in vivo. *J Virol* **74**, 9115-24 (2000).
251. Longnecker, R., Druker, B., Roberts, T. M. & Kieff, E. An Epstein-Barr virus protein associated with cell growth transformation interacts with a tyrosine kinase. *J Virol* **65**, 3681-92 (1991).
252. Chiu, C. W., Dalton, M., Ishiai, M., Kurosaki, T. & Chan, A. C. BLNK: molecular scaffolding through 'cis'-mediated organization of signaling proteins. *Embo J* **21**, 6461-72 (2002).
253. Hunter, A. J., Ottoson, N., Boerth, N., Koretzky, G. A. & Shimizu, Y. Cutting edge: a novel function for the SLAP-130/FYB adapter protein in beta 1 integrin signaling and T lymphocyte migration. *J Immunol* **164**, 1143-7 (2000).
254. Yu, J. et al. Synergistic Regulation of Immunoreceptor Signaling by SLP-76-Related Adaptor Clnk and Serine/Threonine Protein Kinase HPK-1. *Mol Cell Biol* **21**, 6102-6112 (2001).
255. Cao, B. M. Y., Davidson, D., Yu, J., Latour, S. & Veillette, A. Clnk, a Novel SLP-76-related Adaptor Molecule Expressed in Cytokine-stimulated Hemopoietic Cells. *J Exp Med* **190**, 1527-1534 (1999).
256. Certain, S. et al. Protein truncation test of LYST reveals heterogenous mutations in patients with Chediak-Higashi syndrome. *Blood* **95**, 979 (2000).

PLASMIDRESTRIKTIONSKARTEN



Das Plasmid pcDNA3/shPRAM-HA basiert auf dem Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen). Es ermöglicht die Expression von HA-Epitop-markiertem p120 in eukaryotischen Zellen unter der Kontrolle des CMV-Promoters. Im Plasmid pcDNA3/shPRAM-HAdeltaSH3L wurde der für die SH3-ähnliche Domäne codierende Bereich durch zielgerichtete Mutagenese deletiert.

LEBENS LAUF**1 Persönliche Details**

1.1 Name:	Engels
1.2 Vorname:	Niklas
1.3 Beruf:	Diplom-Biologe
1.4 Nationalität:	deutsch
1.5 Geburtsdatum:	20.05.1975
1.6 Geburtsort	Hamburg
1.7 Familienstand:	ledig
1.8 Adresse	Breite Straße 9, 37077 Göttingen

2 Ausbildung

2.1 Schulausbildung:	1981 – 1986	Grundschule Ellerau
	1986 – 1994	Gymnasium Quickborn
	1994	Abitur
2.2 Grundwehrdienst:	1994 – 1995	Luftwaffenmusikkorps, Berlin
2.2 Hochschulstudium:	1995 – 1998	Grundstudium der Biologie, Universität Hamburg
	1998	Vordiplom
	1998 – 2000	Hauptstudium der Biologie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
	Fächer:	Molekulare Immunologie, Molekularbiologie und Genetik, Mikrobiologie, Virologie
	2000	Diplom
2.3 Diplomarbeit:	Titel:	Identifizierung neuer Regulations- mechanismen der Signalleitung des B-Zell-Antigenrezeptors und des

Latenten Membranproteins 2A des
Epstein-Barr Virus

Betreuer: Drs. J. Wienands und M. Reth

3 Promotion

- 3.1 Promotionsthema: Titel: Studien an signalleitenden Adapter
proteinen in wildtypischen und
virus-infizierten Zellen
- 3.2 Ort der Arbeit: 10/2000 –
04/2001 Max-Planck-Institut für
Immunbiologie, Freiburg
04/2001 –
11/2004 Universität Bielefeld,
Abteilung für Molekulare
Immunologie und Biochemie
- 3.3 Betreuung der Arbeit durch: Prof. Dr. J. Wienands
- 3.4 Unterstützung der Arbeit durch: Stipendium des Boehringer Ingelheim Fonds