

Regulation der terminalen B-Zell-Differenzierung durch Blimp-1

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Matthias Knödel
aus Crailsheim

Würzburg, 2000

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 1. Juli 1997 bis 30. Juni 2000 am Institut für Virologie und Immunbiologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. Anneliese Schimpl angefertigt.

Inhalt:

1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Die humorale Immunantwort.....	1
1.2 B-Zell-Reifung und Entstehung der Rezeptordiversität.....	2
1.3 Die späte B-Zell-Differenzierung	3
1.3.1 Aktivierung reifer B-Zellen in der Peripherie	3
1.3.2 Differenzierung aktivierter B-Zellen	4
1.3.3 Die Plasmazelle	6
1.3.4 Die Gedächtniszelle	6
1.4 Molekulare Regulation der späten B-Zell-Differenzierung.....	7
1.4.1 Das c-myc/max/mad-Netzwerk.....	7
1.4.2 Die Bcl-2 Familie.....	8
1.4.3 Blimp-1 als Mitglied der PR-Domänen-Familie.....	9
1.4.4 Pax-5/BSAP	10
1.4.5 Weitere Transkriptionsfaktoren.....	11
1.5 Ziele der Arbeit.....	12

2. MATERIAL	13
2.1 Antibiotika	13
2.2 Antikörper	13
2.2.1 B-Zell-Reinigung.....	13
2.2.2 Flußzytometrie.....	13
2.2.3 Elisa/Eli-Spot.....	14
2.2.4 Western Blotting	14
2.3 Seren und Komplement	14
2.4 Enzyme	14
2.5 Bakterien.....	15
2.6 Mäuse.....	15
2.7 Puffer und Medien für Zellkulturen.....	15
2.7.1 PBS (”phosphate buffered saline”)	15
2.7.2 FACS-Puffer:.....	15
2.7.3 BSS (”balanced salt solution”).....	16
2.7.4 RPMI ⁺	16
2.7.5 Medien für Kultur/Transfektion von 293T-Zellen.....	16
2.8 Mitogene, zellaktivierende Substanzen und Interleukine.....	17
2.9 Nukleinsäuren und Nukleotide	17
2.10 Radioaktivität.....	18
2.11 Standards.....	18
2.12 Gebrauchsfertige Lösungen und Kits	18
2.13 Zelllinien.....	18
2.14 Feinchemikalien.....	19

3. METHODEN	20
3.1 Zelluläre Methoden	20
3.1.1 Herstellung von Milzzellsuspensionen.....	20
3.1.2 Isolation und Reinigung ruhender B-Lymphozyten	20
3.1.2.1 Isolation von B-Lymphozyten aus Milzzellsuspensionen.....	20
3.1.2.2 Anreicherung ruhender B-Lymphozyten durch Percollgradienten.....	20
3.1.3 Aktivierung ruhender B-Lymphozyten in vitro	21
3.1.4 Kultivierung von B-Lymphozyten.....	22
3.1.5 Kultivierung der Zelllinien	22
3.1.6 Herstellung rekombinanter Retroviren und Infektion der Zielzellen	22
3.1.7 Analyse der Zellproliferation	23
3.1.7.1 Proliferationstest	23
3.1.7.2 CFSE-Färbung.....	23
3.1.8 Eli-Spot Assay.....	24
3.1.9 Elisa	25
3.1.10 Flußzytometrie.....	25
3.1.10.1 Antikörper-Färbungen von Oberflächenmolekülen	26
3.1.10.2 Analyse CFSE-gefärbter Zellen	26
3.1.10.3 Zellzyklusanalyse mittels Propidiumjodid.....	26
3.2 RNA - Techniken	28
3.2.1 Isolation von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen	28
3.2.2 Bestimmung der RNA-Konzentration.....	29
3.2.3 Ribonuklease-Protektion	29
3.2.4 Reverse Transkription von Gesamt-RNA	30
3.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) von Gesamt-cDNA	30

3.3 DNA-Techniken	32
3.3.1 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen	32
3.3.2 Klonierungen.....	32
3.3.3 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienklonen.....	33
3.3.4 Großpräparation von Plasmid DNA	33
3.3.5 Bestimmung der DNA-Konzentration	34
3.3.6 Sequenzierung mittels Fluorochrom-markierter Nukleotide	34
3.3.6.1 Sequenzierungs-Polymerase-Kettenreaktion	34
3.3.6.2 Fällung und Analyse des DNA-Sequenzierungsansatzes	34
3.3.7 Glycerinkulturen.....	34
3.4 Proteinbiochemische Methoden	35
3.4.1 Herstellung von Proteinextrakten.....	35
3.4.2 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	35
3.4.2.1 Herstellung der Gele	35
3.4.2.2 Vorbereitung der Proben und Durchführung der PAGE.....	36
3.4.3 Coomassie-Färbung	36
3.4.4 Western Blotting.....	37
3.4.4.1 Transfer der Proteine auf PVDF-Membranen.....	37
3.4.4.2 Immunologischer Nachweis.....	37
3.4.4.3 Das ECL-System.....	37

4. ERGEBNISSE..... 39**4.1 Regulation der terminalen B-Zell-Differenzierung durch Unterdrückung bzw.****Induktion von Blimp-139**

4.1.1 Regulation der Expression von Blimp-1.....	39
4.1.1.1 Unterdrückung der Blimp-1 Expression und IgM-Sekretion durch IL-4	40
4.1.1.2 Spezifitätskontrolle für IL-4.....	41
4.1.1.3 Keine Beeinträchtigung der Zellproliferation durch IL-4	42
4.1.1.4 IL-4 verhindert die Generierung von Zellen mit Plasmazell-Phänotyp.....	43
4.1.1.5 IL-4 induziert die Expression von B7.2 (CD86) auf der Zelloberfläche.....	45
4.1.1.6 IL-4 induziert den Klassensprung nach IgG1	47
4.1.1.7 Negative Regulation der Expression von Blimp-1 durch CD40 und IL-4	49
4.1.1.8 Induktion von IgM- und IgG1-Sekretion durch IL-2 und IL-5.....	50
4.1.1.9 Induktion von Blimp-1 Expression sowie IgM- und IgG1-Sekretion durch IL-2 und IL-5 in Abwesenheit von LPS	51
4.1. 2 Ektopische Expression von Blimp-1 durch retrovirale Transduktion	53
4.1.2.1 Manipulation der Genexpression mittels retroviraler Vektoren	53
4.1.2.2 Retrovirale Transduktion primärer B-Lymphozyten.....	55
4.1.2.2.1 Wiederherstellung bzw. Induktion der Ig-Sekretion durch retroviral transduziertes Blimp-1	55
4.1.2.2.2 Beeinträchtigung des Klassensprungs nach IgG1 durch Blimp-1.....	58
4.1.2.2.3 Blimp-1 exprimierende B-Zellen zeigen verminderte Oberflächenexpression von B7.2 (CD86).....	60
4.1.2.2.4 Vergleich der Expression weiterer Transkriptionsfaktoren in An- bzw. Abwesenheit von LPS.....	61
4.1.2.3 Retrovirale Transduktion von WEHI 231 Zellen	63

4.1.2.3.1 Phänotyp Blimp-1 exprimierender WEHI 231 Zellen	63
4.1.2.3.2 Verminderte Oberflächenexpression von B7.2 (CD86) auf Blimp-1 transduzierten WEHI 231 Zellen	67
4.1.2.3.3 Verlust des differenzierten Phänotyps nach Selektion und Kultivierung Blimp-1 transduzierter WEHI 231 Zellen	68
4.1.3 Zusammenfassung.....	70

4.2 Auswirkung der Überexpression von Blimp-1 auf Gene, die Überleben und Proliferation von Zellen steuern.....71

4.2.1 Ektopische Blimp-1 Expression im B-Zell-Lymphom WEHI 231	71
4.2.1.1 Blimp-1 vermindert die Expression von c-myc und A1, stimuliert aber die Expression von mad4	71
4.2.1.2 Überexpression von A1 erhöht die Lebensdauer Blimp-1 ⁺ WEHI 231 Zellen.....	73
4.2.1.3 Aufrechterhaltung des Blimp-1 induzierten Differenzierungszustandes bei Überexpression von A1	76
4.2.1.4 Erhöhung der Lebensdauer Blimp-1 ⁺ WEHI 231 Zellen durch CD40 Ligation	78
4.2.1.5 Langzeitkultur Blimp-1 transduzierter WEHI 231 Zellen führt zur Reversion des c-myc/max/mad4-Netzwerkes	79
4.2.1.6 Zusammenfassung	80
4.2.2 Ektopische Blimp-1 Expression in primären B-Zellen.....	81
4.2.2.1 Erhöhung der mad4 Expression nach Blimp-1 Transduktion	81
4.2.2.2 Verminderung der A1-Expression nach Transduktion von Blimp-1	82
4.3.2.4 Zusammenfassung	84

5. DISKUSSION	85
5.1 Blimp-1 als zentraler Integrator von Signalen, die das Schicksal der Zelle beeinflussen	85
5.2 Förderung der Sekretion von Nicht-IgM-Isotypen durch Blimp-1	86
5.3 Synergismus zwischen Blimp-1 und weiteren Transkriptionsfaktoren.....	87
5.4 Molekulare Auswirkung der Expression von Blimp-1	88
5.5 Pax-5 als möglicher Gegenspieler zu Blimp-1	91
5.6 Argumente gegen einen Blimp-1 abhängigen, absoluten Kontrollpunkt	92
5.7 Wirkungsmechanismus von Blimp-1 und die Rolle von mad4	92
5.8 Modellvorstellung	95
6. ZUSAMMENFASSUNG	97
7. SUMMARY	99
8. LITERATUR	101
8.1 Originalarbeiten	101
8.2 Weitere Literatur.....	117
9. ANHANG	118
9.1 Abkürzungsverzeichnis	118
9.2 Publikationsliste.....	120
9.3 Lebenslauf	122

1. Einleitung

1.1 Die humorale Immunantwort (1)

Die humorale Immunantwort ist der von B-Lymphozyten vermittelte Zweig der adaptiven (erworbenen) Immunität und zeichnet sich - ebenso wie die von T-Zellen vermittelte zelluläre Immunantwort - durch die Spezifität der Immunreaktion, die Erzeugung eines immunologischen Gedächtnisses und die Unterscheidung des Organismus zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“, d.h. Toleranz und Intoleranz, aus. Die Spezifität der Immunreaktion, d.h. die Fähigkeit, ein bestimmtes Antigen zu erkennen und von anderen Antigenen zu unterscheiden, kommt hierbei durch eine extreme Diversität der antigenerkennenden Strukturen von B-Zellen - und auch T-Zellen - zustande. Nach einem Antigenkontakt entsteht sowohl auf B-Zell- als auch auf T-Zell-Seite ein immunologisches Gedächtnis, so dass ein wiederholter Antigenkontakt zu einer sehr viel schnelleren und effizienteren Immunantwort führt.

Die humorale, d.h. die auf Antikörpern (Immunglobuline) basierende Immunantwort, gründet auf der klonalen Selektion von B-Lymphozyten mit spezifischen Antigen-Rezeptoren, die eine Erkennung nahezu jedes Fremdanagens ermöglichen. Während der Immunreaktion erfolgt die Proliferation antigenspezifischer B-Lymphozyten und eine Differenzierung dieser in zwei Typen von Effektorzellen, in Antikörper-sezernierende, i. d. R. kurzlebige Plasmazellen und in sekretorisch inaktive, langlebige Gedächtniszellen. Beide Zelltypen werden in einem späteren Abschnitt genauer beschrieben.

Die ersten in einer humoralen Primärantwort gebildeten Antikörper sind immer vom Isotyp IgM, da die VDJ-Rekombinationen (vgl. 1.2) 5'-wärts der Exons des C μ -Gens stattfinden. Diese frühen IgM-Antikörper werden meist als Pentamere, die von der sog. J (Joining)-Kette zusammengehalten werden, sezerniert [1]. Allerdings existieren auch Arbeiten, in denen zu sehr frühen Zeitpunkten hexamere IgM-Antikörper ohne J-Kette beschrieben sind [1]. Da IgM-Antikörper bereits vor der Affinitätsreifung der B-Zellen gebildet werden, sind diese meist niederaffin. Sie sind hauptsächlich im Blut vorhanden und effektive Aktivatoren des klassischen Weges des Komplementsystems.

Im weiteren Verlauf der Immunantwort treten, bedingt durch den Klassensprung aktivierter B-Zellen, andere Isotypen gleicher Spezifität auf. Hierbei besitzt jeder Isotyp eine charakteristische Verteilung im Organismus und typische Funktionen. Antikörper der IgG-Isotypen sind vor allem im Blut und in extrazellulären Flüssigkeiten vorhanden, wo sie Toxine, Viren und Bakterien neutralisieren, zur Phagozytose durch Monozyten, Makrophagen oder Neutrophile anregen, eine Antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität bewirken oder ebenfalls das Komplementsystem aktivieren. Dagegen werden als Dimere vorkommende IgA-Antikörper durch Epithelien auf deren Oberfläche an Orte transportiert, wo sie Toxine, Viren oder Bakterien neutralisieren und

deren Eintritt in den Organismus blockieren. IgE-Antikörper sind hauptsächlich an der Oberfläche von Mastzellen gebunden, wobei eine Antigenbindung in diesem Fall zur Degranulation der Mastzelle und der Freisetzung gefäßaktiver Mediatoren führt (2).

1.2 B-Zell-Reifung und Entstehung der Rezeptordiversität [2-7]

B-Lymphozyten reifen bei Mensch und Maus im Knochenmark, vor der Geburt allerdings in der fötalen Leber. Sie gehen aus pluripotenten Stammzellen hervor, die auch die Basis aller anderen Zellen des hämatopoetischen Systems darstellen. Bis zum Stadium der reifen B-Zelle durchläuft die Vorläuferzelle in der speziellen Mikroumgebung des Knochenmarks eine Reihe definierter Entwicklungsstadien, deren Abfolge durch Interaktionen mit Liganden der Stromazellen sowie löslichen Zytokinen geregelt wird.

Das Pro-B-Zell-Stadium zeichnet sich durch die somatische Rekombination zwischen Gensegmenten der schweren Kette aus, die für die variablen Regionen des Antikörpers codieren, wobei im frühen Pro-B-Zell-Stadium ein D (Diversity)-Segment und ein J (Joining)-Segment verknüpft werden und diesem rearrangierten DJ-Segment im späten Pro-B-Zell-Stadium ein V-Segment vorgelagert wird. Notwendig für diese Rearrangements sind die Genprodukte von RAG-1 und RAG-2, die daher ab dem Stadium der frühen Pro-B-Zelle exprimiert werden [8].

In der Prä-B-Zelle wird somit bereits eine vollständige μ -Kette synthetisiert und diese mit der Pseudo-leichten Kette, bestehend aus λ_5 und V_{preB1} , als prä-BZR an der Oberfläche im Komplex mit $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ exprimiert. Eine Signalgebung durch diesen Komplex stoppt die Rearrangements am Locus der schweren Kette, initiiert aber die Rearrangements der leichten Kette [9]. Hierbei wird ein V-Segment mit einem J-Segment unter Einfluß von RAG-1 und 2 am Locus der κ -Kette verknüpft. Im Falle nicht produktiver Rearrangements beider κ -Loci erfolgen Rearrangementversuche der λ -Kette.

Die durch Kombinatorik von V-, (D-) und J-Segmenten erreichte Rezeptordiversität wird durch eine gewisse Flexibilität der DNA-Sequenz an den Verknüpfungsstellen einzelner Segmente weiter erhöht. Der Einbau von sog. P- oder N-Nukleotiden führt zur Entstehung alternativer Aminosäuren in diesen Bereichen. P-Nukleotide treten beim Rearrangement von schweren und leichten Ketten auf und entstehen durch asymmetrisches Aufschneiden der Haarnadelstrukturen, die während des Rekombinationsprozesses entstehen. Nach Paarung der entstandenen einzelsträngigen DNA-Enden erfolgt die Entfernung endständiger ungepaarter Basen durch Exonucleasen bzw. das Auffüllen vorhandener Lücken mit komplementären Basen. N-Nukleotide hingegen treten nur beim Rearrangement der schweren Kette auf, da das verantwortliche Enzym, die terminale Desoxynucleotid-Transferase (TdT), im prä-B-Zell-Stadium nicht mehr exprimiert wird. Dieses fügt vor dem Verknüpfen der Gensegmente willkürlich Nukleotide an den Schnittstellen der Haarnadelstrukturen ein und bewirkt daher das Entstehen einer neuen Sequenz an der

Verknüpfungsstelle, wobei nach Paarung der DNA-Enden wiederum die Entfernung endständiger ungepaarter Basen sowie das Auffüllen vorhandener Lücken mit komplementären Basen erfolgt. Sobald eine funktionelle leichte Kette synthetisiert werden kann, exprimiert die nun als unreif bezeichnete B-Zelle funktionelles IgM an der Oberfläche, was die Rearrangements der leichten Kette stoppt. Hat die Zelle in diesem Stadium keinen Antigenkontakt, d.h. keinen autoreaktiven B-Zell-Rezeptor, exprimiert sie durch alternative Polyadenylierungs- und Spleiß-Prozesse zusätzlich zu IgM noch IgD auf der Oberfläche und wird Bestandteil der zwischen den sekundären lymphatischen Organen zirkulierenden Lymphozytenpopulation.

1.3 Die späte B-Zell-Differenzierung

1.3.1 Aktivierung reifer B-Zellen in der Peripherie (1)

Trifft eine ruhende B-Zelle auf das passende Antigen, wird ein komplexer Aktivierungsprozeß eingeleitet. Die alleine durch die B-Zell-Rezeptor-Komplexe transduzierten Signale sind aber für viele sog. Thymus-abhängige Antigene (z.B. alle Protein-Ag) nicht ausreichend, um die naive B-Zelle in den Zellzyklus eintreten zu lassen und die komplexen Differenzierungsprozesse einzuleiten. Hierfür ist die B-Zelle auf die Hilfe von T-Zellen, d.h. auf zusätzliche T-Zell-Signale, angewiesen [10; 11]. Hierfür wird das Antigen über rezeptorvermittelte Endozytose internalisiert, endosomal prozessiert und die erzeugten Peptide über MHC Klasse II Moleküle präsentiert. Die Interaktion des T-Zell-Rezeptors CD4⁺-T-Zellen mit dem präsentierten MHC II/Peptid-Komplex sowie der Erhalt weiterer kostimulatorischer Signale führt auf T-Zell-Seite zur Hochregulation membranständiger B-Zell-Aktivierungsmoleküle und zur Sekretion von B-Zell-stimulierenden Zytokinen. Diese T-Zell-Faktoren sind von zentraler Bedeutung für die Proliferation, das Überleben und die Differenzierung der B-Zelle.

Auf T-Zell Seite ist das wichtigste membranständige B-Zell-Aktivierungsmolekül der frühen Aktivierungsphase der Ligand für CD40 (CD40L, [12; 13]), dessen Interaktion mit CD40 die B-Zelle zum einen in den Zellzyklus treibt und zum anderen vor dem programmierten Zelltod - der Apoptose - schützt [14; 15]. Für diese Prozesse spielt u.a. die Aktivierung des NF- κ B-Systems durch CD40 eine zentrale Rolle ([16; 17], vgl. auch 1.4). Damit verbunden ist eine NF- κ B abhängige Induktion von Genen, die sowohl die Zellproliferation (z.B. c-myc, [18], siehe auch 1.4.1) als auch das Überleben fördern. Beispielsweise wurde gezeigt, dass CD40 Signale die Expression von zwei antiapoptotischen Molekülen der Bcl-2 Familie, bcl-xL und A1, steigern [19-21] und - im murinen und im humanen System - diese Steigerung von NF- κ B abhängt [22; 23]. Auf der anderen Seite führen CD40 Signale jedoch auch zur Expression von Fas (CD95) und machen die Zelle sensitiv für die Fas vermittelte Apoptose [24]. Diesbezüglich vermitteln BZR-Signale

wiederum Schutzfunktion durch Induktion von Überlebensmolekülen wie bcl-xL [24] und FAIM [25].

Diverse Zytokine sind ebenfalls wichtige Komponenten der frühen Phase. IL-4 bewirkt beispielsweise zusammen mit Signalen über den B-Zell-Rezeptor die Expression der zellulären Protoonkogene c-fos und c-myc [26] als Indikator einer proliferativen Aktivität. Weiterhin schützt IL-4 vor Fas vermittelter Apoptose [27] und wirkt bezüglich der Expression von Überlebensmolekülen unterstützend [28].

Die Summe der verschiedenen Aktivierungs- und Überlebenssignale führt schließlich zum Eintritt der B-Zelle in den Zellzyklus und damit zur klonalen Expansion antigenspezifischer B-Zellen. In vivo finden diese T-Zell-abhängigen Aktivierungsprozesse in den T-Zell-Regionen sekundärer lymphoider Gewebe statt. In vitro kann diese Situation mit Hilfe CD40-spezifischer Antikörper (oder CD40 Ligand) und IL-2 oder IL-4 nachgestellt werden [29].

Neben den Thymus-abhängigen Antigenen existieren jedoch auch sog. Thymus-unabhängige Antigene, die B-Zellen ohne T-Zell-Hilfe stimulieren können. Meistens sind dies bakterielle Polysaccharide, polymere Proteine oder Lipopolysaccharide. In hoher Konzentration verursachen diese Moleküle die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen unabhängig von ihrer Antigen-spezifität - somit eine polyklonale Aktivierung - und werden daher als B-Zell-Mitogene bezeichnet. Neueren Ergebnissen zufolge ist die LPS-induzierte Aktivierung der B-Zellen abhängig von den TOLL-ähnlichen Rezeptoren („toll-like receptors“) TLR4 und RP105 [184]. Diese sind für die LPS-induzierte Aktivierung von NF-kB nötig [184]. In vivo erfolgt die T-Zell-unabhängige Stimulation gewöhnlich in den extrafollikulären Regionen sekundärer lymphoider Gewebe [29].

1.3.2 Differenzierung aktivierter B-Zellen (1)

Aktivierte B-Lymphozyten können zwei Differenzierungswege durchlaufen. Zum einen erfolgt die terminale Differenzierung zu in der Regel kurzlebigen Plasmazellen, deren Aufgabe die massive Sekretion von Immunglobulinen ist. Zum anderen entstehen langlebige, sekretorisch inaktive Gedächtniszellen, die an der Primärantwort nicht direkt beteiligt sind, jedoch bei wiederholtem Antigenkontakt eine schnellere und effizientere Sekundärantwort bewirken.

In vivo finden diese komplexen Prozesse in speziellen Mikroumgebungen statt. Von den B-Zellen, die von CD4⁺-T-Zellen in den T-Zell-Regionen der sekundären lymphoiden Organe aktiviert wurden, differenziert ein Teil unter dem Einfluß von T-Zell-Faktoren zu IgM-sezernierenden Plasmazellen. Sie sind die frühe Quelle noch niederaffiner Antikörper. Hierfür wurden beispielsweise IL-2 und IL-5 eine differenzierungsinduzierende Funktion zugeschrieben [30-32].

Andere B-Zellen migrieren jedoch in die Primärfollikel und bilden aufgrund ihrer schnellen klonalen Expansion die sog. Keimzentren. Sie sind Orte intensiver B-Zell-Proliferation und komplexer Differenzierungsprozesse. Ein Keimzentrum entsteht hierbei aus wenigen antigenspezifischen Gründer-B-Zellen [14]. Die B-Zellen stehen hier in Kontakt mit follikulären dendritischen Zellen und T-Zellen, welche die Differenzierungsprozesse kontrollieren [33-35].

Während der Proliferation der B-Zellen im Keimzentrum finden somatische Hypermutationen in den für die variablen Regionen der Immunglobuline codierenden Gensegmenten und eine Selektion von B-Zellen mit höheraffinen B-Zellrezeptoren statt. Der Selektionsprozess basiert hierbei auf der Konkurrenz um eine erneute Bindung des Antigens, welches von follikulären dendritischen Zellen in nicht prozessierter Form präsentiert wird [36]. Diese erneute Antigenbindung ist beispielsweise zur Induktion des vor der Apoptose schützenden Proto-Onkogens Bcl-2 in der B-Zelle notwendig [37].

Weiterhin kommt es im Keimzentrum zum sog. Klassensprung, dem Verknüpfen der VDJ-Gensegmente mit Gensegmenten, die für die konstanten Regionen der weiteren Isotypen außer IgM und IgD codieren (z.B. C γ 1, C α oder C ϵ) und am Ig-Lokus 3'-wärts von C μ und C δ liegen [38]. Hierbei findet eine somatische Rekombination zwischen homologen, repetitiven Switch-Sequenzen, die jeweils 5' vor den für die konstanten Regionen codierenden Sequenzen liegen, statt, so dass die Bereiche zwischen den VDJ-Segmenten und der jeweiligen Switch-Region deletiert und als zirkuläre DNA freigesetzt werden [39; 40]. Dieser Mechanismus ermöglicht die Generierung von Antikörpern verschiedener Isotypen mit gleicher Antigenpezifität. Wichtige Kontrollfunktionen bei diesem Prozeß üben von T-Zellen sezernierte Zytokine aus. So bewirkt beispielsweise IL-4 den Sprung von IgM nach IgG1 und IgE, IFN- γ den Sprung nach IgG2a und IL-5 zusammen mit TGF- β den Sprung nach IgA [41-48].

Klonal expandierte B-Zellen, die aufgrund ihrer höheraffinen Antigenbindung im Keimzentrum positiv selektioniert wurden, differenzieren anschließend zu Plasmazellen oder Gedächtniszellen. Plasmazellen sezernieren nun höheraffine Antikörper anderer Isotypen, während Gedächtniszellen bis zu Folgekontakten mit dem Antigen sekretorisch inaktiv bleiben. Die Regulation dieser Differenzierungsprozesse ist äußerst komplex und noch längst nicht vollständig verstanden. Neben zellulären Wechselwirkungen über membranständige Moleküle - z.B. der neuerlichen CD40-Ligation durch T-Zellen, der Interaktion zwischen CD23 auf follikulären dendritischen Zellen und CD19 auf B-Zellen oder dem OX40-OX40 Ligand-System [14; 49-51] - ist auch das Zytokinmilieu von zentraler Bedeutung. Für das Humansystem wurde gezeigt, dass die CD40 Ligation oder IL-4 die B-Zelle in Richtung Gedächtniszelle treibt und damit der Plasmazell-Differenzierung entgegenwirkt, während beispielsweise die Signalgebung über OX40, CD27, IL-3, IL-6 und IL-10 die Differenzierung von B-Zellblasten im Keimzentrum zu Plasmazellen fördert [14]. Im murinen System haben beispielsweise IL-2 und IL-5 plasmazell-induzierende Wirkung [30]. CD40 dagegen wird in Analogie zum Humansystem als den Plasmazell-Differenzierungsweg inhibierend und

damit den Gedächtniszell-Differenzierungsweg fördernd betrachtet [50]. Ebenso unterstützt IL-4 die Differenzierung zur Gedächtniszelle. Es induziert den Klassensprung nach IgG1 [41; 47] und hohe Dosen führen zur Unterdrückung der IgM-Sekretion [42]. Die Integration dieser Vielzahl möglicher Signale auf molekularer Ebene und damit die Regulation zellulärer Differenzierungsprozesse durch Transkriptionsfaktoren ist Gegenstand intensiver Forschungen und Teil dieser Arbeit. Zentrale Transkriptionsfaktoren sind unter 1.4 beschrieben.

1.3.3 Die Plasmazelle (1)

Plasmazellen sind große, granuläre Zellen mit stark ausgeprägtem endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat, die ca. 50% ihrer Proteinsyntheseaktivität für die Bildung von Immunglobulinen und deren Sekretion verwenden. Sie besitzen weder membranständige Immunglobuline noch MHC Kl. II-Moleküle auf der Oberfläche, so dass sie nicht mehr auf Antigen- oder T-Zell-Kontakte ansprechen. Dagegen wurde die Oberflächenexpression von Syndecan-1, einem Heparansulfat und Chondroitinsulfat enthaltenden Proteoglykan, als Marker für Immunglobulin-sezernierende Plasmazellen *in vivo* beschrieben [52]. Der Großteil der Plasmazellen in Milz und Knochenmark besitzt eine limitierte Lebensdauer von nur wenigen Tagen [53], um die Antikörper-Antwort einzugrenzen. Allerdings existiert auch eine langlebige Subpopulation Ig-sezernierender Plasmazellen im Knochenmark, die eine kontinuierliche Antikörperquelle sind [54-56].

Während der frühen Phase der Primärantwort zeichnen sich Plasmazellen weiterhin durch die Expression der J-Kette aus, die das sezernierte IgM-Pentamer zusammenhält [57; 58]. Auch sind in diesem Stadium die für die variablen Regionen der Immunglobuline codierenden Gensegmente noch nicht mutiert, was eine zunächst niedere Affinität der gebildeten IgM-Antikörper zur Folge hat.

1.3.4 Die Gedächtniszelle

Gedächtnis-B-Zellen ermöglichen die schnellere und effizientere Antikörper-Antwort bei wiederholten Kontakten mit einem Antigen. Aufgrund der stattgefundenen Hypermutationen in den für die variablen Regionen der Immunglobuline codierenden Gensequenzen besitzen sie auf der Oberfläche Antigenrezeptoren höherer Affinität. Da sie im allgemeinen bereits einen Klassensprung vollzogen haben, sind ihre B-Zell-Rezeptoren anderen Isotyps als IgM [59]. Solche Gedächtniszellen sind IgD negativ, da die für die konstante Region der δ -Kette codierenden Exons durch die Rekombinationsprozesse während des Klassensprungs deletiert wurden. Bezüglich

Gedächtniszellen, die noch IgM als B-Zell-Rezeptor besitzen, ist jedoch unklar, ob diese auch noch IgD exprimieren oder nicht [59]. Als Nicht-Immunglobulin-Marker für Gedächtniszellen wurde die Bindung von Peanut-Agglutinin (PNA) und die Expression von MEL-14 beschrieben, wobei frühe Gedächtniszellen einen $\text{PNA}^{\text{hoch}}/\text{MEL-14}^{\text{niedrig}}$ -Phänotyp, späte Gedächtniszellen einen $\text{PNA}^{\text{niedrig}}/\text{MEL-14}^{\text{hoch}}$ -Phänotyp zeigen [60; 61]. Weiterhin zeigen Arbeiten eine im Gegensatz zu naiven B-Zellen verminderte Expression des vom J11d-Antikörper erkannten Heat Stable Antigens (HSA, CD24) auf B-Zellen, welche die Sekundärantwort vermitteln [59; 62; 63].

1.4 Molekulare Regulation der späten B-Zell-Differenzierung

1.4.1 Das c-myc/max/mad-Netzwerk

Das Protoonkogen c-myc codiert für einen Transkriptionsfaktor der basischen Helix-Schleife-Helix-Leucin-Zipper (bHLHZip)-Familie. Es wurde aufgrund der zelltransformierenden Eigenschaften seines onkogenen Pendant v-myc aus Retroviren isoliert und identifiziert [64]. Neben c-Myc gehören noch N- und L-Myc zur Myc Proteinfamilie [65]. Max ist ebenfalls ein bHLHZip-Transkriptionsfaktor und wurde als Partner für Myc-Familienmitglieder zur Bildung von Heterodimeren identifiziert, kann aber - im Gegensatz zu Myc - zumindest in vitro auch Homodimere bilden [66], deren funktionelle Existenz in vivo allerdings in Frage gestellt ist [67]. c-Myc/Max Heterodimere wie auch Max/Max Homodimere binden an CACGTG-Motive oder E-box verwandte Sequenzen [68-70]. Allerdings bewirken nur c-Myc/Max Heterodimere eine transkriptionelle Aktivierung, da Max selbst transkriptionell inert ist und im Gegensatz zu c-Myc keine Transaktivierungsdomäne besitzt [71; 72].

c-Myc/Max Komplexe sind an der positiven Regulation der Zellproliferation beteiligt und daher in proliferierenden Zellen vorhanden [73], worin die transformierenden Eigenschaften und damit das onkogene Potential begründet liegen. Max wird nicht nur während des Zellzyklus exprimiert, es ist sogar in der G₀-Phase und in differenzierenden Zellen vorhanden. c-Myc dagegen wird nur im Übergang zwischen G₀- und G₁-Phase und während des Zellzyklus exprimiert. Es ist daher die verantwortliche Komponente für die proliferationsinduzierende Wirkung der c-Myc/Max Heterodimere [74; 75]. Für die Expression von c-myc selbst ist unter anderem NF-κB von Bedeutung [18; 76]. Während der normalen B-Zell-Entwicklung wird c-myc in Übereinstimmung mit den vorgenannten Befunden in proliferierenden pro- und prä-B-Zellen exprimiert. Auch in reifen B-Zellen wurde nach Stimulation ein transienter Anstieg der Expression von c-myc beschrieben ([77], vgl. auch [29]). Differenzierungsprozesse hingegen werden in vielen Systemen von einer Verminderung der c-Myc Expression begleitet [74; 75; 78]. Auch in B-Zellen nimmt die Expression von c-myc während der Differenzierung zu Plasmazellen ab [79; 80].

Zusätzlich zur Steuerung der Zellproliferation ist c-Myc auch an der Regulation der Apoptose beteiligt. In verschiedenen Systemen ist c-Myc in der Lage, den programmierten Zelltod nach Wachstumsfaktor- oder Nährstoffentzug auszulösen bzw. zu fördern [81-83]. Die Apoptose ist zum Teil abhängig von p53 und kann durch Bcl-2 verhindert werden ([84; 85]; vgl. auch [72]). In diesem Zusammenhang wird diskutiert, dass c-Myc die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien fördert und die Zellen dadurch sensitiv für die Apoptose macht [86]. Allerdings existieren auch Arbeiten, die im Gegensatz dazu eine Verminderung der Expression von c-myc als Auslöser der Apoptose in manchen Zellen, z.B. dem B-Zell-Lymphom WEHI 231, anführen. Die Aufrechterhaltung der c-myc Expression besitzt in diesen Zellen Schutzfunktion und fördert deren Überleben [76; 87].

Myc-Familienmitglieder sind jedoch nicht die einzigen Interaktionspartner von Max. Mad-Proteine - ebenfalls bHLHZip-Transkriptionsfaktoren - können mit Max ebenfalls Heterodimere bilden und konkurrieren daher mit Myc um Max [88]. Inzwischen sind vier mad-Familienmitglieder bekannt (mad1, mxl1(=mad2), mad3 und mad4), die zelltyp- und gewebespezifisch exprimiert werden [65]. Mad/Max Komplexe binden hierbei an die gleichen regulatorischen DNA-Motive wie Myc/Max Komplexe, unterdrücken aber die Transkription, statt sie zu aktivieren. Sie wirken daher antagonistisch zur transkriptionellen Aktivierung durch Myc [89]. Mad/Max Komplexe rekrutieren über als Adapterproteine wirkende Korepressoren (Sin3A/B, N-CoR) Proteine mit Histondeacetylase-Aktivität. Histon-Deacetylierung und die damit einhergehende Änderung der Nukleosomenstruktur wird derzeit als Hauptmechanismus der Transkriptionshemmung durch Mad/Max angesehen [72; 90; 91]. Interessanterweise geht die verstärkte Expression von Mad Proteinen in vielen Systemen mit Differenzierungsprozessen auf Kosten des Zellwachstums einher. Gezeigt ist dies beispielsweise für mad1 bezüglich der Differenzierung von Granulozyten [92], Monozyten [93] und Erythroleukämiezellen [94]. In einer verbreiteten Modellvorstellung beruht die Zelldifferenzierung auf einer Verschiebung des Verhältnisses von Myc/Max- zu Mad/Max-Heterodimeren zugunsten von Mad/Max-Komplexen und damit zumindest teilweise auf einer Inhibition der Transkription von Myc-abhängigen, proiliferationsfördernden Genen. Für B-Lymphozyten wurde ein solcher Mechanismus bereits von Melchers [29] diskutiert.

1.4.2 Die Bcl-2 Familie

Eine entscheidende Funktion für das Überleben von Zellen haben Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie. Sie übernehmen eine zentrale Kontrollfunktion im Rahmen des programmierten Zelltodes. Innerhalb apoptotischer Molekülkaskaden werden sie oberhalb der Caspasen und mitochondrialer Apoptosevorgänge angesiedelt und beeinflussen deren Aktivität bzw. Funktionalität [95]. Die Bcl-2 Familie beinhaltet pro- und antiapoptotische Mitglieder. Alle diese

besitzen mindestens eine von maximal 4 sog. Bcl-2 Homologiedomänen BH1-4 [96]. Proapoptotisch wirken Bax, Bak, Bcl-Xs, Bad, Blk und Bld, antiapoptotisch sind Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 [97] und A1 ([98], vgl. auch [97]). Über ihre Homologiedomänen bilden sie Homo- und Heterodimere, so dass das Verhältnis proapoptotischer zu antiapoptotischen Mitgliedern die Sensitivität der Zelle für ein Todessignal bestimmt [95].

Während der normalen B Zell-Entwicklung scheint Bcl-2 von besonderer Bedeutung für das Überleben unreifer Zellen im Knochenmark zu sein [99; 100]. In Keimzentrums-B Zellen übernimmt neben Bcl-2 auch Bcl-xL eine wichtige Schutzfunktion [101; 102]. Weiterhin ist gezeigt, dass eine BZR induzierte Bcl-xL Expression die Zellen vor Fas vermittelter Apoptose schützt [24; 28]. Die Expression von A1 steigt an, wenn reife B Zellen nach dem Verlassen des Knochenmarks Bestandteil der zirkulierenden Lymphozytenpopulation werden [103]. Weiterhin wurde an c-Rel defizienten Mäusen gezeigt, dass A1 NF-kB abhängig exprimiert wird und für das Überleben der B-Zelle nach Aktivierung notwendig ist [22]. Auch führt Signalgebung über CD40 zur Verstärkung der Expression von A1 und Bcl-xL in WEHI 231 Zellen und primären B Zellen [20; 95]. Eine Beteiligung von NF-kB in diesem Zusammenhang wurde in humanen B Zelllinien demonstriert [23].

1.4.3 Blimp-1 als Mitglied der PR-Domänen-Familie

Der Transkriptionsfaktor Blimp-1 („B lymphocyte induced maturation protein 1“) wurde für die Differenzierung von reifen B-Zellen zu Immunglobulin-sezernierenden Plasmazellen verantwortlich beschrieben und wird als „Mastergen“ der terminalen B-Zell-Differenzierung betrachtet [30]. BCL1-Tumorzellen exprimieren Blimp-1 in Gegenwart von IL-2 und/oder IL-5 und zeigen einen Phänotyp früher Plasmazellen, d.h sie exprimieren Syndecan-1 und die J-Kette, zeigen eine Zunahme von Zellgröße und Granularität und sezernieren IgM. Die Transfektion von BCL1-Zellen mit einem Blimp-1 Expressionsvektor induziert den gleichen Phänotyp [30]. Blimp-1 ist in LPS-stimulierten, IgM-sezernierenden primären B-Zellen hoch exprimiert, während in mit LPS/ $\alpha\mu$ F(ab')₂-kostimulierten Zellen mit reduzierter Sekretionsaktivität nur wenige Transkripte nachweisbar sind. Der Zusatz von IL-2 und IL-5 stellt in diesen Zellen die Blimp-1-Expression und IgM-Sekretion ebenfalls wieder her. Analog bewirkt die direkte Transfektion dieser Zellen mit Blimp-1 ebenfalls die Wiederherstellung der Sekretionsaktivität [104]. Soro et al. [105] postulierten allerdings, dass Blimp-1 eine unterschiedliche Bedeutung im Rahmen von T-Zell-unabhängiger und T-Zell-abhängiger Plasmazell-Differenzierung zukommt: Die Hemmung der Blimp-1 Expression vermindert in LPS-Kulturen primärer B-Zellen die Sekretion von IgM und IgG, aber nicht die durch einen Th2-Zellklon induzierte, geringe Sekretion von IgG1 nach Stimulation über CD40. Allerdings wurde von Angelin-Duclos et al. [192] die zentrale Bedeutung

von Blimp-1 für die Plasmazell-Differenzierung inzwischen auch *in vivo* unterstrichen: Demnach wird Blimp-1 – im Gegensatz zu Soro et al. [105] - sowohl in Plasmazellen einer T-Zell-unabhängigen als auch einer T-Zell-abhängigen Immunantwort exprimiert. Auch Plasmazellen, die den Klassensprung zu anderen Immunglobulin-Isotypen bereits vollzogen haben, sind demnach positiv für Blimp-1. Weiterhin exprimieren 4-15% der B-Zellen in Keimzentren der Milz Blimp-1 nach Immunisierung und zeigen einen intermediären Phänotyp zwischen Keimzentrums-B-Zelle und Plasmazelle. Interessanterweise konnten Shaffer et al. in diesem Zusammenhang zeigen, dass die Expression von Blimp-1 durch den transkriptionellen Repressor BCL-6, der an der Kontrolle der B-Zell-Differenzierung im Keimzentrum beteiligt ist, gehemmt wird [193]. Die Bedeutung von Blimp-1 für die Sekretion von Nicht-IgM-Isotypen ist daher ebenfalls Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

In B-Zell-Lymphomen, die frühe B-Zell-Entwicklungsstadien repräsentieren, führt die Expression von Blimp-1 zum Zelltod [106]. Dieser Sachverhalt wurde mit der Verminderung der Expression von *c-myc* durch Blimp-1 in Zusammenhang gebracht. Blimp-1 bindet als "plasmacytoma repressor factor" an dessen Bindungsstelle im *c-myc* Promotor und wirkt als transkriptioneller Repressor von *c-myc*. Ektopische Expression von *c-myc* im prä-B-Zell-Lymphom 18-81 führt zu einer teilweisen Hemmung des Blimp-1 induzierten Zelltodes in diesem Zusammenhang [80]. Für die Hemmung der *c-myc* Transkription in diesem System sind Histon-Deacetylasen von Bedeutung, die durch eine direkte Interaktion mit Blimp-1 rekrutiert werden [107]. Auch das humane Blimp-1 Homolog, PRDI-BF1 („Positive regulatory domain I-binding factor 1“; [108]), wirkt als transkriptioneller Repressor und hemmt die virusinduzierte Transkription des β -Interferon Genes [109], hier allerdings durch Rekrutierung von Korepressoren der sog. Groucho-Proteinfamilie [110]. Die Bedeutung einer Histondeacetylierung ist in diesem Zusammenhang noch unklar.

Blimp-1 ist ein ca. 100 kDa Kernprotein mit 5 Zinkfinger-Motiven vom Drosophila Krüppel-Typ, besitzt zwei saure sowie zwei Prolin-reiche Aktivierungsdomänen und wird der sog. PR-("positive regulatory") Domänen-Familie zugeordnet [111; 112]. Der das Retinoblastom-Protein (pRB)-bindende Faktor RIZ, SC-1 und die *C. elegans* Genprodukte *egl-43* und *EVI1* sind ebenfalls Mitglieder dieser Proteinfamilie, die generell mit Differenzierungsprozessen und Wachstumstop in Verbindung gebracht wird [112; 113].

1.4.4 Pax-5/BSAP

BSAP ("B cell specific activator protein") ist ein 52kDa Kernprotein und gehört zu der entwicklungsrelevanten Familie von Transkriptionsfaktoren mit einer sog. "paired domain" als

DNA-Bindemotiv [114]. Es sind 4 durch alternatives Spleißen erzeugte Isoformen bekannt, die vom Pax-5 Gen codiert und im hämatopoetischen System B-Zell spezifisch ab der frühen Pro-B-Zelle differentiell exprimiert werden. In terminal differenzierenden B-Zellen nimmt die Expression der meisten Isoformen ab, diejenige von Pax-5b wird jedoch aufrechterhalten [115]. Die Bedeutung von Pax-5 für die B-Zell-Entwicklung zeigt sich an Pax-5 defizienten Mäusen, in denen die Zellen im Pro-B-Zell Stadium arretiert sind [116; 117].

BSAP ist an der positiven Regulation der Expression von λ_5 und V_{preB1} , die während der frühen B-Zell-Entwicklung die Pseudo-leichte-Kette bilden, beteiligt [118; 119]. Auch die Expression von CD19 -einer Komponente des B-Zell-Korezeptors - ist von BSAP abhängig [116; 120; 121]. Im Rahmen der späten B-Zell-Differenzierung wurde es als wichtiger Faktor für die Proliferation reifer B-Zellen nach Stimulation beschrieben [122] und scheint auch bezüglich des Klassensprunges eine Rolle zu spielen, da es beispielsweise für die LPS/IL-4 induzierte, vom I ϵ -Promotor ausgehende Transkription, welche den Rekombinationsereignissen vorausgeht, notwendig ist [123]. Weiterhin ist in BSAP überexprimierenden B-Zelllinien die Plasmazellbildung beeinträchtigt, so dass die Verminderung der Pax-5 Expression eine Voraussetzung für die terminale Differenzierung zu sein scheint [124].

1.4.5 Weitere Transkriptionsfaktoren

Zusätzlich zu den in den vorstehenden Abschnitten ausführlicher beschriebenen Transkriptionsfaktoren sind an der komplexen Regulation der späten B-Zell-Entwicklung noch eine Vielzahl weiterer Faktoren beteiligt, wie anhand der Phänotypen der jeweils defizienten Mäuse deutlich wird. Einige dieser Faktoren sollen hier kurz dargestellt werden (vgl. auch [125]).

Ein zentraler Regulator ist das NF- κ B System. Mäuse, denen eine Komponente (z.B. p50, p52, c-rel, relB) dieses Systems fehlt, zeigen vorwiegend Defekte in der proliferativen B-Zell Antwort, oftmals aber auch sekretorische Defizienzen. p65 defiziente Tiere zeigen zusätzlich eine Verminderung der Anzahl aller sich entwickelnden B-Zellen um ca. 50% und auch Defekte bezüglich Proliferation und Ig-Sekretion [126]. Defizienz in Bob-1 (Oca-B, OBF-1), einem transkriptionellen Koaktivator, führt zu einer beeinträchtigten proliferativen Antwort nach BZR-Stimulus, zu eingeschränkter Ig Sekretion und einem Verlust der Keimzentren [127; 128]. Auch die Abwesenheit von Oct-2, einem Transkriptionsfaktor der POU-Domänen-Familie, hat eine verminderte Anzahl IgM⁺ Zellen und Defekte bezüglich Plasmazell-Differenzierung und Ig Sekretion zur Folge [129].

1.5 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde der Schwerpunkt auf die Regulation der späten B-Zell-Differenzierung durch Blimp-1 gelegt. Dabei standen folgende zentrale Fragen im Mittelpunkt:

Wie wird die Expression von Blimp-1 reguliert?

Die Expression welcher Gene/Moleküle wird durch Blimp-1 beeinflusst?

Fördert Blimp-1 auch die Sekretion sekundärer Isotypen, also von Nicht-IgM-Antikörpern?

2. Material

2.1 Antibiotika

Penicillin
Streptomycinsulfat
G418

Zeocin

Grünenthal, Stolberg
Fatol GmbH, Schiffweiler
Life Technologies (Gibco),
Eggenstein
Invitrogen, Leek (NL)

2.2 Antikörper

2.2.1 B-Zell-Reinigung

Klon C (Anti-Thy 1.2, monoklonaler IgG-Antikörper)

13-4 (Anti-Thy 1.2, monoklonaler IgM-Antikörper)

Anti-CD4 (monoklonaler Ratte-IgM-Ak RL172.4)

Anti-CD8 (monoklonaler Ratte-IgM-Ak 3.168.1)

Arbeitskreis, Klon erhalten von
Dr. Opitz [130] (Bayer AG, For-
schungszentrum Wuppertal)

Arbeitskreis

Arbeitskreis [131]

Arbeitskreis [131]

2.2.2 Flußzytometrie

Ratte-anti-Maus Fc-Rezeptor	2.4G2	Arbeitskreis, Hybridom von Howard Dickler [132]
Anti-B220 PE	(Klon A3-6B2)	Life Technologies (Gibco)
Anti-B220 FITC, Cychrom	(Klon RA3-6B2)	Pharmingen, Hamburg
Anti-CD4 FITC	(Klon H129.19)	Pharmingen
Anti- $\alpha\beta$ TCR PE	(Klon H57-597)	Pharmingen
Anti-CD3 PE	(Klon YCD3-1)	Life Technologies (Gibco)
Anti-Syndecan-1 PE	(Klon 281-2)	Pharmingen
Anti-CD19 bio	(Klon 1D3)	Pharmingen
Anti-HSA FITC	(Klon M1/69)	Pharmingen
Anti-hCD8a PE	(Klon RPA-T8)	Pharmingen
Anti-B7.2 (CD86) bio	(Klon GL1)	Pharmingen
Anti-IgG1 bio	(Klon A85-1)	Pharmingen
Anti-IgM PE	(Klon AF6-78)	Pharmingen

2.2.3 Elisa/Eli-Spot

Ziege-anti-Maus Ig (H+L)		alle bezogen von Southern Biotechnology Associates (vertreten durch Biozol, Heidelberg)
Ziege-anti-Maus Ig (M+G+A)		
Ziege-anti-Maus IgM-AP		
Ziege-anti-Maus IgG-AP		
Ziege-anti-Maus IgG1-AP		
Ziege-anti-Maus IgG2a-AP		
Ziege-anti-Maus IgG2b-AP		
Ziege-anti-Maus IgG3-AP		
Ziege-anti-Maus IgA-AP		

2.2.4 Western Blotting

Kaninchen-anti-Maus Bob-1	(Klon C-20, sc-955)	alle bezogen von Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
Kaninchen-anti-Maus Oct-2	(Klon C-20, sc-233)	
Kaninchen-anti-Maus Bcl-6	(Klon N3, sc-858)	
Ziege anti-Maus Pax-5	(Klon C-20, sc-1974)	

2.3 Seren und Komplement

FCS (fötale Kälberserum)	Pan Systems (Aidenbach)
Meerschweinchenkomplement	Arbeitskreis, Eigenproduktion

2.4 Enzyme

div. Restriktionsendonucleasen	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot New England Biolabs (NEB), Heidelberg Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Life Technologies (Gibco)
Klenow Fragment	New England Biolabs (NEB)
SAP (Alkalische Phosphatase)	Upstate Biotechnology, vertreten durch Biozol, Heidelberg
T4 DNA Ligase	MBI-Fermentas
Taq-DNA-Polymerase	MBI-Fermentas

RNase-Inhibitor MBI-Fermentas, Promega
Superscript II Plus Life Technologies (Gibco)
RNase freie DNase Stratagene, La Jolla, CA

2.5 Bakterien

E. coli Top 10 F' Invitrogen, Arbeitskreis
E. coli DH5 α Arbeitskreis

2.6 Mäuse

C57BL/6: Eigenzucht, Zuchtpaare von Iffa Credo, Straßburg
(C75 BL/6 x C3H) F1 IL-4 tg: K. Erb [133]; erhalten von der AG Dr. H.W. Vohr,
Bayer AG, Forschungszentrum Wuppertal

2.7 Puffer und Medien für Zellkulturen

2.7.1 PBS („phosphate buffered saline“)

8,00 g NaCl
0,20 g KCl
1,15 g Na₂HPO₄
2,00 g KH₂PO₄
1,67 g CaCl₂
0,10 g BSA

2.7.2 FACS-Puffer:

1 x PBS
0,1 % BSA
0,02 % Natriumazid

2.7.3 BSS („balanced salt solution“)

Gebrauchslösung: 1 Vol. BSS 1 (10fach)
 + 1 Vol. BSS 2 (10fach)
 + 8 Vol. Ampuwa-Wasser

BSS 1 (10fach): 10,0 g Glukose
 0,6 g KH₂PO₄
 2,3 g Na₂HPO₄ x 2H₂O
 0,1 g Phenolrot
 gelöst in 1l H₂O und sterilfiltriert

BSS 2 (10fach): 1,86 g CaCl₂ x 2H₂O
 4,00 g KCl
 80,0 g NaCl
 2,00 g MgCl₂ x 6H₂O
 2,00 g MgSO₄ x 7H₂O
 gelöst in 1l H₂O und sterilfiltriert

2.7.4 RPMI⁺

RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin; Kat.Nr. 21875-034	Life Technologies (Gibco)
supplementiert mit	
MEM (non ess. AA 1%); Kat.Nr. 11140-035	Life Technologies (Gibco)
Natrium-Pyruvat (1%); Kat.Nr. 11360-039	Life Technologies (Gibco)
β-Mercaptoethanol (0,05mM); Kat.Nr. 31350-010	Life Technologies (Gibco)
L-Glutamin (0,07%)	Fluka, Buchs (CH)
Penicillin (0,0025%)	Grünenthal
Streptomycinsulfat (0,0025%)	Fatol GmbH
fötales Kälberserum (5%), 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert	PAN Systems

2.7.5 Medien für Kultur/Transfektion von 293T-Zellen

Dulbecco's MEM with Glutamax-1; Kat.Nr. 32430-027 Life Technologies (Gibco)
 Dulbecco's MEM with Pyridoxine; Kat.Nr. 41966-011 Life Technologies (Gibco)
 jeweils supplementiert mit 10% FCS (s. 2.7.4) und Penicillin/Streptomycinsulfat (s. 2.7.4)

2.8 Mitogene, zellaktivierende Substanzen und Interleukine

LPS (Lipopolysaccharid aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	Sigma, Deisenhofen
Ziege-anti-Maus μ F(ab') ₂ -Fragment	Jackson Immunoresearch Laboratories (vertreten durch Dianova, Hamburg)
Anti-CD40 (FGK45.5)	Arbeitskreis, Hybridum erhalten von J. Andersson und A. Rolink, Basel
Interleukin-2 (IL-2)	Arbeitskreis
Interleukin 4 (IL-4, CHO-Überstand)	Arbeitskreis, CHO-Transfektanten von W. Müller, Köln
Interleukin-5 (IL-5)	Arbeitskreis

2.9 Nukleinsäuren und Nukleotide

Desoxyribonucleotidtriphosphate (jedes 200 μ M)	Roth, Karlsruhe
Oligo-dT (500 μ g/ml)	Promega, Madison Wisconsin, (vertreten durch Boehringer, Mannheim)
<u>Primer:</u>	TIB Molbiol, Berlin

β -Aktin:

sense: 5'-CCA GGT CAT CAC TAT TGG CAA CGA-3'

antisense: 5'-GAG CAG TAA TCT CCT TCT GCA TCC-3'

Blimp-1:

sense: 5'-TCC GGC TCC GTG AAG TTT CAA-3'

antisense: 5'-GGT GGA ACT CCT CTC TGG AAT-3'

J-Kette:

sense: 5'-GGA GTC CTG GCC ATT TTT GTT-3'

antisense: 5'-CAA GGC TGC TTG CAC CAT TTT-3'

2.10 Radioaktivität

^3H -Thymidin (6,7 Ci/mmol)	NEN DuPont, Bad Homburg
$\alpha^{32}\text{P}$ -UTP	Amersham-Pharmacia, Freiburg

2.11 Standards

1kb-DNA-Leiter:	Life Technologies (Gibco) oder MBI-Fermentas
SDS-PAGE-Standard (Low Range):	Biorad, München

2.12 Gebrauchsfertige Lösungen und Kits

Trizol-Reagenz (Isolation von RNA)	Life Technologies (Gibco)
Qiagen Plasmid Kits (Isolation von Plasmid-DNA)	Qiagen, Hilden
Biorad-Proteinbestimmungslösung	Biorad
PCR-Optimierungskit	Invitrogen
JETsorb Gelextraktionskit	Genomed (Bad Oeyenhausen)
Fluoreszenz-Sequenzierkit (Terminationsmix, TSR)	Perkin-Elmer, Überlingen
RiboQuant Multi-Probe Ribonuclease Protection Assay System:	Pharmingen

DNA-Matrizen:

mMyc Multi-Probe Template Set	Pharmingen
mApo2 Multi-Probe Template Set	Pharmingen
$\mu\text{m}/\mu\text{s}$	I. Berberich [134]
Blimp-1	Ambion
L32	Pharmingen

2.13 Zelllinien

293T (hum. fötales Nierenepithel, SV40 T-Ag stabil exprim.)	Arbeitskreis
WEHI 231 (ATCC CRL 1702, murines B-Zell-Lymphom)	Arbeitskreis
HT-2	Arbeitskreis
PBC3	Arbeitskreis

2.14 Feinchemikalien

Agarose	Sigma
Agarose, „low melting point“	Roth
Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester (CFSE)	Molecular Probes Inc., Eugene
Propidiumjodid	Sigma
Percoll	Amersham-Pharmacia

Weitere Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

- Boehringer, Mannheim
- Sigma, Deisenhofen
- Fluka, Buchs (CH)
- Serva, Heidelberg
- Amersham-Pharmacia, Freiburg
- Merck, Darmstadt
- Roth, Karlsruhe

3. Methoden

3.1 Zelluläre Methoden

3.1.1 Herstellung von Milzzellsuspensionen

Die Mäuse wurden durch Genickbruch getötet, mit 70%igem Ethanol befeuchtet und auf die rechte Seite gelegt. Nach Öffnung der linken, lateralen Bauchdecke wurde die Milz, welche sich dorsal vom Magen befindet, steril entnommen, weitgehend von Fett- und Geweberesten befreit und in eisgekühltem BSS aufbewahrt. Anschließend wurden die Milzen in einem sterilen Einmalsieb zerrieben, die Zellen durch wiederholtes Spülen mit BSS in ein 50ml Röhrchen überführt und 10 min auf Eis gehalten, damit größere Gewebetrümmer niedersinken. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt, zentrifugiert und das Sediment mit BSS gewaschen. Dazu wurde das Röhrchen mit BSS aufgefüllt und 10 min bei 1200 Upm (165g) zentrifugiert. Aus dem Zellsediment wurden anschließend die B-Lymphozyten isoliert.

3.1.2 Isolation und Reinigung ruhender B-Lymphozyten

3.1.2.1 Isolation von B-Lymphozyten aus Milzzellsuspensionen

T-Lymphozyten wurden durch Inkubation der Milzzellen mit monoklonalen Antikörpern gegen T-Zell-Epitope und anschließender Komplement-Lyse vollständig entfernt. Dazu wurden die sedimentierten Milzzellen (vgl. 3.1.1) in BSS (3,5 ml/Milz) resuspendiert, welches die Antikörper Klon-C, 13-4, α CD4 und α CD8 aus Hybridomüberständen in einer für den jeweiligen Antikörper zuvor ermittelten Optimalkonzentration enthielt. Nach der 30 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit BSS gewaschen, in Meerschweinchenserum (1:20 in BSS) als Komplementquelle aufgenommen und 45 min bei 37°C inkubiert. Abschließend wurden die Zellen erneut mit BSS gewaschen.

3.1.2.2 Anreicherung ruhender B-Lymphozyten durch Percollgradienten

Diese Methode basiert auf der sich unterscheidenden Dichte von ruhenden und aktivierten B-Zellen. Ruhende B-Zellen sind vergleichsweise kleiner und kompakter - daher dichter - als aktivierte B-Zellen und können mittels einer Percoll-Dichtegradientenzentrifugation voneinander getrennt werden.

Hierfür wurden die gewaschenen Zellen nach der Komplement-Behandlung in 10ml BSS aufgenommen, in Gradientenröhrchen überführt und nochmals abzentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt, das Zellsediment in 2 ml 80% (v/v in 0,9% NaCl) Percoll resuspendiert und vorsichtig mit jeweils 2 ml der weiteren Percollstufen (70%, 65%, 60%, 50% v/v in 0,9% NaCl) sowie abschließend 2ml BSS überschichtet. Ein Percollgradient wurde maximal mit den Zellen aus vier Milzen (ca. 5×10^8 Zellen) beladen. Nach erfolgter Zentrifugation (20 min, 4°C, 2000 Upm (400g), ohne Bremse) wurden die Zellen der Interphasen 70/65% Percoll sowie 65/60% Percoll abgenommen und zweimal mit BSS gewaschen, um Percollreste zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in RPMI⁺ aufgenommen.

Zur Ermittlung der Anzahl gewonnener Zellen wurden diese in einer Neubauer-Kammer gezählt. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension in einer Trypanblau-Arbeitslösung (Stocklösung 1:5 in FACS-Puffer verdünnt) in Abhängigkeit der erwarteten Zellzahl 1:2 bis 1:8 verdünnt. Das Trypanblau wird von toten Zellen aufgenommen und ermöglicht es somit, diese von lebenden Zellen zu unterscheiden. 10 µl der Zellverdünnung wurden anschließend unter das Deckgläschen einer Neubauer-Zählkammer pipettiert und die lebenden Zellen in 2-3 Quadranten gezählt. Die Zellzahl wurde gemäß

$(\text{Mittelwert gezählter Zellen/Quadrant}) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$
bestimmt.

Die Reinheit der B-Zell-Präparation wurde mit $1,5-3 \times 10^5$ Zellen im FACScan (vgl. 3.1.10.1) durch Färbungen entweder gegen B220, $\alpha\beta$ TCR und CD4 oder gegen B220 und CD3 kontrolliert und war >92%, wobei die restlichen Zellen Nicht-T-Zellen waren.

3.1.3 Aktivierung ruhender B-Lymphozyten in vitro

Gereinigte, ruhende B-Lymphozyten wurden 10 min bei 1200 Upm (165g) abzentrifugiert, in RPMI⁺ aufgenommen und auf eine Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen pro ml eingestellt. Sollte ein Anteil der Zellen mit CFSE gefärbt werden (3.1.7.2), wurden diese zuvor abgenommen, da für die Färbung ein proteinfreies Medium erforderlich war. Gewünschte Anteile der ruhenden B-Zellen wurden mit dem Mitogen LPS (5 µg/ml), mit dem BZR-quervernetzenden $\alpha\mu\text{F}(\text{ab}')_2$ -Fragment (5 µg/ml) oder mit einem gegen CD40 gerichteten Antikörper (5-10 µg/ml) bzw. verschiedenen Kombinationen derselben stimuliert. IL-2, 4 und 5 von Zytokin-produzierenden P30 Zellen wurden in der Regel in einer Endkonzentration von 100-200 u/ml verwendet. Die Unit-Bestimmung erfolgte anhand der halbmaximalen Proliferation der Indikatorzellen HT-2 (für IL-2 und IL-4) oder PBC3 (für IL-5) [135].

3.1.4 Kultivierung von B-Lymphozyten

In vitro stimulierte B-Lymphozyten wurden in einer Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen pro ml in sterilen 6, 12, 24, oder 96-Napfplatten im Brutschrank bei 37°C und 6% CO₂ kultiviert und täglich mikroskopisch kontrolliert. Zu den im Ergebnisteil angegebenen Zeitpunkten wurde jeweils ein Teil der Zellen geerntet.

3.1.5 Kultivierung der Zelllinien

WEHI 231-Zellen (murines B-Zell-Lymphom) wurden in jeweils 3 ml RPMI⁺ in 12-Napfplatten im Brutschrank bei 37°C und 6% CO₂ kultiviert und alle acht Tage 1:6, 1:12, 1:24 und 1:48 verdünnt. Dem Medium infizierter, EGFP bzw. EYFP exprimierender Zellen wurde im Bedarfsfalle G418 (1mg/ml Endkonzentration) bzw. Zeocin (250µg/ml Endkonzentration) zugesetzt. Zum Erhalt größerer Zellzahlen wurden die Zellen in RPMI⁺ in 50ml Kulturflaschen ausgesät und bis zum Erreichen der erforderlichen Zelldichte im Brutschrank kultiviert.

293T-Zellen wurden in 25ml Petrischalen in Kulturmedium (Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) mit Glutamax-1 (GIBCO) sowie 10% FCS und Antibiotika) gehalten und alle 3-4 Tage mit ATV von der Platte abgelöst und 1:10-1:20 verdünnt.

3.1.6 Herstellung rekombinanter Retroviren und Infektion der Zielzellen

Lösungen: 2 M CaCl₂

2x HBS: 50 mM HEPES, 10 mM KCl, 12 mM Dextrose, 280 mM NaCl,
1.5 mM Na₂HPO₄, auf pH 7.05 einstellen

Rekombinante retrovirale Partikel wurden unter Benutzung des pHIT Verpackungssystems wie von Soneoka et al. beschrieben [136] hergestellt.

293T Zellen wurden in Transfektionsmedium (DMEM mit Pyridoxin (GIBCO) sowie 10% FCS und Antibiotika) transient mit den Expressionskonstrukten für Gag/Pol (pHIT60) und Env (pHIT123) des Murinen Leukämie Virus (MLV) cotransfiziert. Die Cotransfektion wurde zusammen mit entweder dem leeren Vektorplasmid oder dem Vektor mit der jeweiligen für das angegebene Protein codierenden cDNA durchgeführt. Es wurde die Standard-Calciumphosphat-Methode verwendet. Nach 16 h wurde die Transfektionslösung durch RPMI⁺ ersetzt. Die viralen Überstände wurden 24 und 48 Stunden später abgenommen und filtriert (0.45 µm). Zum Filtrat wurde Polybrene (Sigma) zugegeben (Endkonzentration: 13.2 µg/ml).

5×10^5 - 3×10^6 WEHI 231 Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase bzw. 2.5×10^6 - 1×10^7 primäre B-Zellen am Tag 2 der Kultur wurden für 3 h mit 1-2 ml des infektiösen Überstandes inkubiert, mit RPMI⁺ gewaschen und wieder in Kultur genommen. Um hohe Infektionsraten zu erzielen, wurden die Zellen während der Inkubation mit dem infektiösen Überstand zentrifugiert (3-4 h bei 32 °C mit 1000 x g). EGFP bzw. EYFP-exprimierende, d.h. infizierte Zellen wurden mittels Flußzytometrie identifiziert. Eine Anreicherung dieser Zellen erfolgte wahlweise durch Sortierung oder Antibiotika-Selektion (G418: 1mg/ml bzw. Zeocin: 250µg/ml Endkonzentration).

3.1.7 Analyse der Zellproliferation

3.1.7.1 Proliferationstest

Beim Proliferationstest wird die Menge des Tritium (³H)-markierten, in die zelluläre DNA eingebauten Thymidins bestimmt. Sie dient als Maß für die Zellproliferation, da der ³H-Thymidin-Einbau proportional zur DNA-Synthese und damit zur Proliferationsaktivität ist. Allerdings sind Aussagen auf Einzelzellniveau hierbei nicht möglich.

Lösungen: ³H-Thymidin: 10 µCi/ml in RPMI⁺ ohne FCS (1mCi/ml Stocklösung (spez. Aktivität 6.7 Ci/mmol) 1:100 in RPMI⁺ ohne FCS verdünnt)

$1-2 \times 10^5$ stimulierte primäre B-Zellen bzw. $1-2 \times 10^4$ WEHI 231 Zellen in 100-200 µl RPMI⁺ wurden in Triplets in 96-Napf-Flachbodenplatten pipettiert und bis zu den im Ergebnisteil angegebenen Zeitpunkten kultiviert. Dann wurden zu den Zellen 25 µl der ³H-Thymidinlösung gegeben und die Kulturen für weitere 15 Stunden im Brutschrank gehalten.

Die Zellen wurden mittels eines Zellerntegerätes (Pharmacia Beta-Plate-Harvester) mit Wasser aus der 96-Napf-Flachbodenplatte gesaugt und deren radioaktiv markierte, genomische DNA auf einen Glasfaserfilter aufgebracht. Nicht in die DNA eingebautes ³H-Thymidin wurde gewaschen. Der Filter wurde anschließend bei 37°C getrocknet, in Plastikfolie eingeschweißt, mit ca. 10 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und in einem Beta-Counter ausgewertet.

3.1.7.2 CFSE-Färbung [137]

Die Methode der CFSE-Färbung erlaubt die Analyse der Lymphozytenproliferation mittels Flußzytometrie auf Einzelzellniveau. Der Fluoreszenzfarbstoff CFSE (Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester) bindet kovalent an freie Aminogruppen cytoplasmatischer Makromoleküle und zeigt in der verwendeten Konzentration keine toxischen Effekte [138]. Er bleibt somit über längere Zeit in der Zelle erhalten und kann im FACScan in der ersten Fluoreszenz

gemessen werden (vgl. 3.1.10.2). Jede Zellteilung bewirkt dabei die Halbierung der Fluoreszenzintensität. Aufgrund des zellulären Proteinumsatzes nimmt der CFSE-Gehalt jedoch auch bei sich nicht teilenden Zellen langsam ab, daher muß der Referenzwert ungeteilter Zellen für jede Messung neu festgesetzt werden.

Lösungen: CFSE-Stocklösung: 5 mM CFSE in DMSO
RPMI⁺ ohne FCS

Gereinigte, ruhende B-Lymphozyten in BSS wurden sedimentiert, in RPMI⁺ ohne FCS aufgenommen und auf eine Zellkonzentration von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt. Die CFSE-Stocklösung wurde 1:2000 zugegeben und der Ansatz 8 min bei 37°C inkubiert. Abgestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von RPMI⁺ mit 5% FCS. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert, gewaschen, in RPMI⁺ aufgenommen und wie unter 3.1.3 beschrieben stimuliert.

3.1.8 Eli-Spot Assay [139]

Zur Analyse des Sekretionsverhaltens der stimulierten B-Zellen wurde der Anteil Immunglobulinsezernierender Plasmazellen in der Kultur durch Eli-Spot-Versuche bestimmt. Diese ermöglichen auch eine Unterscheidung zwischen den verschiedenen Immunglobulin-Isotypen.

Lösungen: Beschichtungspuffer: 50 mM Tris/HCl pH 9.5
AMP-Puffer: 95.8 ml AMP, 150 mg MgCl₂ x 6H₂O, 100 µl Triton-X100,
ad 1000 ml H₂O dest.
AMP/BCIP: 0,1% (w/v) BCIP in AMP-Puffer

Für die Beschichtung quadratischer 25-Napf-Flachbodenplatten mit den primären Antikörpern wurde jeweils 1ml einer Lösung aus Ziege-anti-Maus Ig (H+L) 2 µg/ml in Beschichtungspuffer pro Napf pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Versuchstag wurden die Platten dreimal mit PBS gewaschen und zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen mindestens 60 min bei Raumtemperatur mit PBS/4% FCS (1 ml/Napf) geblockt. Zur gleichen Zeit wurden die aktivierten B-Zellen geerntet und - zur Entfernung sämtlicher bis zu diesem Zeitpunkt bereits sezernierter Immunglobuline - zweimal mit RPMI⁺ gewaschen. Anschließend wurde das PBS/4% FCS aus den Näpfen entfernt. Von jedem Versuchsansatz wurden jeweils 10^4 , 10^3 und 10^2 Zellen (zum Nachweis von IgM) bzw. 10^5 , 10^4 und 10^3 Zellen (zum Nachweis anderer Immunglobulin-Isotypen) in 1 ml RPMI⁺ in einen beschichteten Napf pipettiert. Nach 12-16 stündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Platten dreimal mit PBS gewaschen und zum Nachweis sezernierter Immunglobuline eine Stunde mit den sekundären, alkalische Phosphatase konjugierten Ziege-anti-

Maus Ig-Antikörpern (1:1000 in PBS/0,05% Tween, 1 ml/Napf) inkubiert. Anschließend wurde die Platte erneut viermal mit PBS gewaschen. Für die Nachweisreaktion wurde die auf 37°C erwärmte Substratlösung AMP/BCIP im Verhältnis 6:1 mit einer aufgekochten und auf 42°C abgekühlten 3%igen "low melting point"-Agaroselösung gemischt und 1 ml dieses Gemisches pro Napf pipettiert. Die alkalische Phosphatase katalysiert die Bildung eines dunkelblauen Farbkomplexes aus dem farblosen Substrat BCIP, so dass an denjenigen Stellen, an denen sich Immunglobulin-seziernde Zellen befanden, blaue Punkte (Spots) entstehen.

3.1.9 Elisa

Lösungen: Diethanolaminpuffer (Herstellung in angegebener Reihenfolge): 200 mg NaN_3 , 800 mg $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 800 ml H_2O , 97 ml Diethanolamin, auf pH 9.8 mit HCl_{konz} einstellen, ad 1000 ml H_2O .

Als Alternative zu Eli-Spot-Versuchen wurde als Maß für die Sekretion die Menge an vorhandenem Immunglobulin im Kulturüberstand per Elisa bestimmt. 96-Napf-Elisaplatten wurden über Nacht bei 4°C mit den primären Antikörpern (Ziege-anti-Maus Ig (H+L), 2 µg/ml in 50 mM Tris pH 9.5, 100 µl/Napf) beschichtet, dreimal mit PBS gewaschen und zur Vermeidung unspezifischer Bindungen eine Stunde bei Raumtemperatur mit PBS/4% FCS (100 µl/Napf) geblockt. Anschließend wurden die Nöpfe in Triplikaten (50 µl/Napf) mit Verdünnungen der Kulturüberstände (1:2-1:50) beschickt, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und die Platten erneut dreimal mit PBS gewaschen. Nach einstündiger Inkubation mit Alkalischer Phosphatase-konjugiertem Ziege anti-Maus IgM (1:1000 in PBS/0,05% (v/v) Tween 20) bei Raumtemperatur und erneutem Waschen erfolgte die Entwicklung durch Farbreaktion mit dem kommerziell erhältlichen Substrat p-Nitrophenylphosphat (Sigma) der Alkalischen Phosphatase im Diethanolamin-Puffer (1 mg/ml Enkonzentration, 100 µl/Napf). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines 96-Napf-Platten-Lesegerätes (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim) bei 405nm.

3.1.10 Flußzytometrie

Per Flußzytometrie kann die Expression von Zelloberflächen-Molekülen durch die Verwendung spezifischer Antikörper, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert sind, auf Einzelzellniveau untersucht werden. Diese Fluoreszenzfarbstoffe werden durch einen Laserstrahl im "Fluorescence Activated Cell Scan" (FACScan, Becton-Dickinson) angeregt und emittieren anschließend Licht charakteristischer Wellenlänge, welches von dem Gerät detektiert wird. Das verwendete Gerät war in der Lage, das emittierte Licht der Farbstoffe FITC (1. Fluoreszenz), PE (2. Fluoreszenz) und

Red 670 bzw. Cychrom (3. Fluoreszenz) zu messen. Zusätzlich zu den drei Fluoreszenzen gibt Laserlicht, welches direkt an den Zellen gestreut wird, Aufschluß über Größe ("forward scatter") und Granularität ("side scatter") der jeweiligen Zelle. Ausgewertet wurden die FACS-Daten mit der Cell Quest-Software für Apple-Macintosh.

3.1.10.1 Antikörper-Färbungen von Oberflächenmolekülen

Lösungen: FACS-Puffer: PBS mit 0.1% (w/v) BSA, 0.02% (w/v) Natriumazid

$1-3 \times 10^5$ Zellen wurden geerntet, in FACS-Röhrchen überführt und mit FACS-Puffer gewaschen (5 min, 1600 Upm). Zum Block der Fc-Rezeptoren - welche Färbeantikörper unspezifisch binden könnten - wurden die Zellen mit dem 2.4G2-Antikörper (1:50-1:100 in FACS-Puffer, 100 μ l Volumen) 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die gewünschten konjugierten Antikörper in der für jeden Antikörper separat bestimmten Verdünnung (1:100 bis 1:400 Endkonzentration) zu den Zellen gegeben. Die Spezifität der Färbungen wurde durch Parallelansätze kontrolliert, bei denen nicht spezifische Antikörper gleichen Isotyps und gleicher Konjugation verwendet wurden. Nach 30 minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Zellen erneut gewaschen. Bei Verwendung biotinylierter Antikörper erfolgte die Detektion dieser durch einen weiteren Inkubationsschritt mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugiertem Streptavidin (1:200 in FACS-Puffer, 100 μ l Volumen). Nach Abschluß aller Inkubationsschritte wurden die gefärbten Zellen nochmals mit FACS-Puffer gewaschen, in 100 μ l FACS-Puffer resuspendiert und am FACScan (Becton-Dickinson) analysiert.

3.1.10.2 Analyse CFSE-gefärbter Zellen

Wie bereits unter 3.1.7.2 beschrieben, kann der CFSE-Gehalt von Zellen mit dem FACScan in der ersten Fluoreszenz gemessen werden. Dazu wurden CFSE-gefärbte Zellen geerntet, in FACS-Röhrchen überführt und mit FACS-Puffer gewaschen. Nach dem Block der Fc-Rezeptoren konnten auch diese Zellen wie unter 3.1.10.1 beschrieben zusätzlich gegen charakteristische Oberflächenmarker in den verbleibenden zwei Fluoreszenzen gefärbt und dann am FACScan analysiert werden.

3.1.10.3 Zellzyklusanalyse mittels Propidiumjodid

Lösungen: Färbepuffer: 0.1% (w/v) Natriumcitrat, 0.1% (w/v) Saponin, 10 μ g/ml Propidiumjodid (PI)

Durch Propidiumjodid-Färbung kann die prozentuale Verteilung von Zellen auf einzelne Phasen des Zellzyklus analysiert werden. Die am FACScan in der 2. Fluoreszenz meßbare Menge des in die DNA interkalierenden Farbstoffes ist proportional zur DNA-Menge in der Zelle und somit abhängig von der jeweiligen Phase des Zellzyklus, so dass Zellen mit doppeltem Chromosomensatz (G1-Phase) sehr gut von Zellen mit größerer DNA-Menge (S-, G2-, M-Phase) bzw. subdiploiden (toten) Zellen unterschieden werden können.

3×10^4 - 5×10^5 Zellen pro Ansatz wurden in FACS-Röhrchen überführt, mit FACS-Puffer gewaschen und in Färbepuffer resuspendiert. Nach 2-4 stündiger Inkubation bei 4°C wurden 300 µl FACS-Puffer zugegeben und die Proben anschließend am FACScan analysiert. Die Inkubation der Zellen in Färbepuffer permeabilisiert die Plasmamembran und tötet somit die Zellen, so dass eine spätere Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen nicht mehr möglich ist. Bei infizierten, EGFP bzw. EYFP exprimierenden Zellen ist zudem von Bedeutung, dass durch obige Behandlung die Grün- bzw. Gelbfluoreszenz verlorenght. Zur Umgehung dieser Problematik wurden EGFP bzw. EYFP exprimierende Zellen vor der Färbung entweder sortiert oder durch Zugabe eines gleichen Volumens (i. d. R. 100 µl) PBS/4% Paraformaldehyd fixiert, so dass sowohl forward/side scatter als auch Grün- bzw. Gelbfluoreszenz erhalten blieben.

3.2 RNA - Techniken

3.2.1 Isolation von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen

Lösungen: Chloroform, RNase-frei

Isopropanol, RNase-frei

70% (v/v) Ethanol in DEPC-H₂O

DEPC-H₂O: H₂O bidest. 1:1000 mit DEPC (Diethylpyrocarbonat)-Stocklösung versetzt, 12-24 Stunden unter Rühren im Abzug inkubiert und anschließend 3-4x autoklaviert (RNase-frei).

Eukaryontische Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des Trizol-Reagenz (Gibco) isoliert, dabei wurde nach dem von Gibco mitgelieferten Protokoll vorgegangen. Es wurden ausschließlich RNase-freie Plastikwaren und Lösungen verwendet.

5×10^4 - 1×10^7 Zellen wurden zu den im Ergebnisteil angegebenen Zeitpunkten geerntet, sedimentiert, nach möglichst vollständigem Absaugen des Überstandes in 1 ml Trizol resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch das Trizol wurden die Zellen lysiert und sämtliche Proteine aufgrund des enthaltenen Guanidiniumisothiocyanats sofort denaturiert, so dass ein enzymatischer Abbau der RNA nicht erfolgen konnte. Das Lysat kann zu diesem Zeitpunkt eingefroren und die RNA-Präparation später fortgesetzt werden. Das Lysat wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 200 µl Chloroform versetzt, gut durchmischt und nach zweiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei 4°C zentrifugiert (15 min, 13000 Upm), um klar getrennte Phasen zu erhalten. Die wässrige, RNA enthaltende Phase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, ohne die organische Phenol/Chloroform-Phase sowie die das gefällte Protein enthaltende weiße Interphase zu berühren. Anschließend wurde die RNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol 2 min bei Raumtemperatur gefällt, sedimentiert (20 min, 13000 Upm, 4°C) und nach Verwerfen des Überstandes mit 0.5 ml 70% Ethanol gewaschen (10 min, 13000 Upm, 4°C). Der Überstand wurde erneut vollständig entfernt, die sedimentierte RNA getrocknet und in 12-20 µl DEPC-H₂O in Abhängigkeit von der zu erwartenden RNA-Menge gelöst. Abschließend wurde die RNA 5-10 min bei 65°C denaturiert und dann bei -20°C gelagert.

3.2.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentrationen wurden photometrisch durch die Messung der Absorption einer 1:70 Verdünnung in einer Mikroküvette (70 µl Volumen) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Hierbei entspricht eine A_{260} -Einheit einer Konzentration von 40 µg/ml RNA. Die Angabe der Konzentration am Photometer (Ultrospec Plus 4045, Pharmacia) erfolgte in µg/ml und wurde nach $c \text{ (µg/µl)} = c \text{ (µg/ml)} \times \text{Verdünnungsfaktor} / 1000$ in die gebräuchlichere Einheit µg/µl umgerechnet.

3.2.3 Ribonuklease-Protektion

In der vorliegenden Arbeit wurde das "RiboQuant[®] Multi-Probe RNase Protection Assay System" der Firma Pharmingen verwendet. Es handelt sich dabei um einen Kit, der alle notwendigen Reagenzien für die Durchführung von Sondensynthese, Hybridisierung und Ribonuclease-Behandlung enthält und zusammen mit verschiedenen "Sonden-Sets" ("Multi-Probe Template Sets") desselben Herstellers verwendet wird. Diese dienen zur gleichzeitigen Identifizierung mehrerer mRNA Species aus einer einzigen Probe von Gesamt-RNA und enthalten ausserdem Sonden zur Erkennung von Haushaltsgenen als interne Standards. Hier wurden die Sets "mApo2" zur Identifizierung von Mitgliedern der Bcl-2-Familie, und "mMyc" zur Detektion einer Reihe von Proto-Onkogenen der Maus verwendet. Zur Identifikation von Blimp-1 bzw. μ_m und μ_s mRNA wurden Einzelsonden in Verbindung mit einem internen Standard (Haushaltsgen L32, Pharmingen) eingesetzt.

Es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren, wobei bei der Reinigung von Sonde bzw. von geschützten Proben auf Phenol und Isoamylalkohol verzichtet und stattdessen reines Chloroform verwendet wurde.

Die geschützten Proben wurden im Anschluss über ein 6%iges denaturierendes Polyacrylamidgel (Acrylamid:Bisacrylamid = 19:1; 8 M Harnstoff) aufgetrennt: Nach einem 45 minütigen Vorlauf bei 40 W wurde das Gel beladen und die Proben für ca. 70 min bei 50 W aufgetrennt. Unbehandeltes Sondenmisch wurde aufgetragen, um eine Identifikation der geschützten Proben zu ermöglichen.

Nach dem Trocknen (>2 h bei 80°C unter Vakuum) wurde das Gel mithilfe von Phosphorimaging bzw. Autoradiographie analysiert. Expositionszeiten lagen zwischen 16 h und 14 Tagen.

3.2.4 Reverse Transkription von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA wurde unter Verwendung von Oligo-dT-Primern, welche mit den 3'-poly(A)-Enden eukaryotischer mRNAs hybridisieren, revers transkribiert. Folgende Komponenten wurden zunächst zusammengefügt:

	1 µg	Gesamt-RNA in DEPC-H ₂ O
	1 µl	Oligo-dT-Primer (500 ng/µl)
	1 µl	RNase-Inhibitor (40 u/µl)
ad	12 µl	DEPC-H ₂ O

Das Gemisch wurde 10 min auf 70°C erhitzt und sofort auf Eis abgekühlt. Nach dem Sammeln der Flüssigkeit durch kurzes Anzentrifugieren wurden folgende Komponenten hinzugefügt:

	4 µl	5x First Strand Buffer (Gibco)
	2 µl	100 mM DTT (Gibco)
	1 µl	200 µM dNTP-Mix

Anschließend wurde der Ansatz zur Hybridisierung der Primer 2 min bei 42°C inkubiert, dann 1 µl Superscript II (200 units) zugegeben und weitere 50 min bei 42°C inkubiert. Beendet wurde die Reaktion durch 15 minütiges Erhitzen des Ansatzes auf 70°C, da hierbei die Superscript II denaturiert wurde. Die so erhaltene cDNA wurde mittels der Polymerase-Kettenreaktion für β-Aktin (vgl. 3.2.5) auf ihre Funktionstüchtigkeit kontrolliert und auch standardisiert. Gelagert wurden die cDNAs bei -20°C.

Sollte Gesamt-RNA von transfizierten oder infizierten Zellen revers transkribiert werden, so wurde möglicherweise kontaminierende Plasmid-DNA oder provirale DNA durch vorgelagerte Inkubation mit DNase entfernt. Hierzu wurde obiger Reaktionsansatz ohne Nukleotide und reverser Transkriptase zunächst 15-20 min mit 5-10 units RNase freier DNase (Stratagene) bei 37°C inkubiert. Nach 10 minütiger Inkubation bei 70°C zur Inaktivierung der DNase wurden die Nukleotide hinzugefügt und die reverse Transkription wie oben beschrieben durchgeführt.

3.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) von Gesamt-cDNA

Lösungen: 10x PCR-Puffer: 500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl pH 9.0, 1% (v/v) Triton X-100

In der vorliegenden Arbeit wurde die Polymerase-Kettenreaktion von Gesamt-cDNA zum Nachweis der Expression von β-Aktin, J-Kette und Blimp-1 verwendet. Die β-Aktin-PCR diente

dabei zur Kontrolle der verschiedenen cDNAs. Sämtliche Plastikmaterialien sowie das verwendete Wasser wurden zunächst 10 min mit UV-Licht bestrahlt, um alle eventuell vorhandenen und daher kontaminierenden Nukleinsäuren zu zerstören. Anschließend wurden folgende Komponenten in 0.5 ml PCR-Reaktionsgefäßen zusammengefügt, wobei für alle zu analysierenden cDNAs ein gemeinsamer Mix verwendet wurde:

	1-2µl	cDNA
	1 µl	Primermix (5'- und 3'-Primer je 10 µM in H ₂ O)
	3 µl	10x PCR-Puffer
	2 µl	25 mM MgCl ₂
	0,4 µl	200 µM dNTP-Mix
	0.3 µl	Taq-Polymerase (1u/µl)
ad	30 µl	H ₂ O

Zur Vermeidung unspezifischer Primer-Hybridisierungen während des ersten Erhitzens wurden die Reaktionen erst bei Erreichen der Denaturierungstemperatur in das PCR-Gerät (Perkin-Elmer Thermo Cycler 9600) gestellt. Folgende Programme wurden verwendet:

β-Aktin	Blimp-1	J-Kette
90s, 94°C		
20s, 94°C	20s, 94°C	20s, 94°C
20s, 62°C 27 Zyklen	20s, 62°C 40 Zyklen	20s, 56°C 27 Zyklen
30s, 72°C	30s, 72°C	30s, 72°C
10min, 72°C		
4°C		

Für jede PCR wurde dabei die Anzahl der Zyklen so gewählt, dass die erhaltenen PCR-Produkte in der linearen Amplifikationsphase entstanden und die Mengen entstandener Produkte so verglichen werden konnten. Die PCR-Produkte wurden auf 3%igen Agarosegelen analysiert (vgl. 3.3.1).

3.3 DNA-Techniken

3.3.1 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

Lösungen: 10x Probenpuffer: 50% Glycerin, 14 mM EDTA pH 8.0, 0.25% (w/v) Bromphenolblau

1x TAE: 40 mM Tris-Acetat, 10 mM EDTA (50x TAE: 242 g Tris, 57.1 ml Eisessig, 100 ml 0.5M EDTA pH 8.0, ad 1000 ml H₂O)

Der Agarosegehalt der verwendeten Gele wurde in Abhängigkeit der zu untersuchenden Fragmente variiert, Verwendung fanden 2-3%ige Agarosegele. Die entsprechende Agarosemenge wurde eingewogen, in 50 ml 1x TAE aufgekocht, nach dem Abkühlen auf ca. 50-60°C mit 1-2 µl Ethidiumbromidlösung (10 µg/ml in H₂O) versetzt und im Kühlraum bei 4°C in einen vorbereiteten Gelschlitten mit Kamm gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde es in eine mit 1x TAE gefüllte Laufkammer eingesetzt und mit den Proben, die zuvor mit 1/10 Volumen 5x Probenpuffer versetzt wurden, beladen. Die Elektrophorese erfolgte spannungskonstant bei 50-60 Volt. Die DNA-Fragmente wurden anschließend unter UV-Licht visualisiert und im Bedarfsfall photographiert.

3.3.2 Klonierungen

Zur Vorbereitung des Vektors wurden Restriktionsendonucleasen für entsprechende Schnittstellen in der "multiple cloning site" (MCS) des eine Ampicillinresistenz tragenden Vektorplasmids ausgewählt. Ca. 5 µg des Plasmids wurden damit gemäß den Angaben des jeweiligen Enzymherstellers behandelt. Gegebenenfalls wurde der Reaktion zur Erzeugung glatter Enden nach Ablauf der Inkubationszeit 1 µl Klenow-Fragment sowie 1 µl dNTP-Mix zugesetzt und für weitere 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Enden des Vektors zur Vermeidung späterer Religationen unter Verwendung von 5 u SAP für weitere 30 min bei 37°C dephosphoryliert. Die Reaktion wurde durch Agarosegelanalyse auf ihren Erfolg hin überprüft. Der Reaktionsansatz wurde dann elektrophoretisch über ein präparatives Agarosegel aufgetrennt und dann das gewünschte Fragment daraus ausgeschnitten und eluiert. Elution bzw. Aufreinigung erfolgte unter Verwendung des "JETsorb Gel Extraction Kit" der Firma Genomed (Bad Oyenhausen) nach deren Angaben.

Das in den Vektor einzusetzende DNA-Fragment wurde entweder aus einem bereits existierenden Plasmid wie beschrieben ausgeschnitten und gereinigt ("Umklonierung") oder durch PCR mit geeigneten Primern mit entsprechenden Schnittstellen versehen und vor der Ligation mit dem Vektorplasmid ebenfalls gereinigt (s.o.). Glatte Enden wurden gegebenenfalls wie oben beschrieben erzeugt.

Für die anschließende Ligation wurden geschnittenes Vektorplasmid und Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:3-1:10 eingesetzt und zusammen mit 1 U T4-DNA-Ligase in Ligationspuffer (enthält ATP) für 16 Stunden bei 15°C inkubiert. Begleitend wurde zur Kontrolle die gleiche Menge an Vektorplasmid zur Abschätzung der Religationshäufigkeit ohne Fragment angesetzt.

Beide Ansätze wurden dann parallel in kompetente E.coli Bakterien (Top 10F') transformiert. Hierzu wurden 50 µl Suspension kompetenter Bakterien auf Eis mit 5 µl Ligationsansatz versetzt, für 30 min auf Eis inkubiert und dann 90s lang auf 42°C gebracht. Anschließend wurde der Ansatz für 1-2 min auf Eis wieder abgekühlt. In der Folge wurden die Ansätze mit 300 µl LB Medium versetzt und für 1 h bei 37°C mit 200 U/min geschüttelt. Die so gewonnenen Bakterienkulturen wurden dann auf ampicillinhaltigem Agar (40 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Vergleich der Koloniezahlen auf Ligationsplatte und Kontrollplatte gab Aufschluss über den Erfolg der Ligation im Verhältnis zur Religation.

3.3.3 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienklonen

Je 3 ml LB/Ampicillin (40 µg/ml) wurden mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt (200 U/min). Die Bakterien wurden sedimentiert, in 100 µl Lösung 1 (50 mM Glukose, 25 mM Tris-HCL pH 8,0 und 10 mM EDTA) aufgenommen und durch Zugabe von 200 µl Lösung 2 (0.2 N NaOH und 1% SDS) lysiert. Nach Zugabe von 150 µl Lösung 3 (3 M Kalium Acetat und 2 M Essigsäure) wurden die Lysate zentrifugiert und die DNA aus den Überständen durch Zugabe von 0.6 Volumina Isopropanol ausgefällt. Die gefällte Plasmid-DNA wurde anschließend sedimentiert, mit 70% Ethanol gewaschen und nach kurzem Trocknen in Wasser aufgenommen.

Restriktionsanalysen wurden mit entsprechenden Endonucleasen nach Angaben des jeweiligen Enzymherstellers durchgeführt. Die Richtigkeit der Klonierung wurde durch Sequenzierung des Vektors im Bereich des eingefügten Fragments überprüft (vgl. 3.3.6).

3.3.4 Großpräparation von Plasmid DNA

Die Gewinnung größerer DNA-Mengen aus 600-800 ml Bakterienkultur erfolgte mit Hilfe des "Plasmid-Maxi-Kit" der Firma Qiagen gemäß der mitgelieferten Vorschrift.

3.3.5 Bestimmung der DNA-Konzentration

Analog zur RNA-Konzentrationsmessung (vgl. 3.2.2) wurde die DNA-Konzentration ebenfalls photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Mikroküvette unter Verwendung einer adäquaten Verdünnung (1:9 bis 1:70 in H₂O, 70 µl Volumen) gemessen. Hierbei entspricht eine A₂₆₀-Einheit einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.

3.3.6 Sequenzierung mittels Fluorochrom-markierter Nukleotide

3.3.6.1 Sequenzierungs-Polymerase-Kettenreaktion

Folgender Reaktionsansatz wurde in einem 0.5 ml PCR-Reaktionsgefäß hergestellt, wobei die Menge einzusetzender DNA entsprechend des Richtwertes (500 ng bei 3 kb) auf die reale Plasmid- bzw. Fragmentgröße umgerechnet wurde:

x µl DNA in H₂O
0.5 µl 10 µM Primer
ad 7.5 µl H₂O
2.5 µl "Abi Prism Big Dye DNA Sequencing Kit" (Perkin Elmer)

Die Reaktion wurde für 30 Zyklen, bestehend aus 10 s 96°C, 5 s 50°C und 4 min 60°C, im PCR-Gerät inkubiert und abschließend auf 4°C abgekühlt.

3.3.6.2 Fällung und Analyse des DNA-Sequenzierungsansatzes

Der Reaktionsansatz wurde in ein 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 1 µl 3M Natriumacetatlösung (pH 5.2) versetzt, die DNA durch Zugabe von 25 µl 100% Ethanol bei Raumtemperatur gefällt und 20 min bei 13000 UpM in einer Eppendorf-Tischzentrifuge sedimentiert. Anschließend wurde das Präzipitat zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 15 µl TSR-Puffer (Perkin-Elmer) aufgenommen. Vor der Analyse im Sequenziergerät wurde die Probe 2 min bei 94°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und in ein spezielles Sequenzanalyse-Reaktionsgefäß überführt.

3.3.7 Glycerinkulturen

Zu 0.8 ml Kultur einzelner verifizierter Bakterienklone wurden 0.2 ml 87% Glycerin gegeben. Die so erhaltene Glycerinkultur wurde bei -70°C gelagert.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Herstellung von Proteinextrakten

Lösungen: 2x NP40-Lysepuffer: 300 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 2% (v/v) NP40, auf pH 8.0 mit HCl einstellen

1-1,3x10⁶ in vitro stimulierte B-Lymphozyten wurden geerntet, gezählt, sedimentiert (5 min, 1600 Upm), in 1 ml PBS resuspendiert und nach dem Transfer in ein 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß erneut abzentrifugiert (ca. 20 s, 13000 Upm). Die sedimentierten Zellen wurden dann in einem auf die jeweilige Zellzahl abgestimmten Volumen 1x NP40-Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren (5 ml 2x NP40-Lysepuffer + 5 ml H₂O, darin 1 Tablette Proteaseinhibitoren (Roche) gelöst) für 30 min bei 4°C unter starkem Schütteln lysiert (i.d.R. 2.5-5x10⁵ Zellen/10 µl Lysepuffer). Anschließend wurden nicht lösliche Komponenten durch Zentrifugation (20 min, 13000 Upm, 4°C) aus dem Lysat entfernt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und bei -70°C gelagert.

3.4.2 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

3.4.2.1 Herstellung der Gele

Lösungen: Puffer A: 1.5 M Tris/HCl pH 8.8, 0.4% (w/v) SDS
 Puffer B: 0.5 M Tris/HCl pH 6.8, 0.4% (w/v) SDS
 30% (w/v) Acrylamid / 0.8% (w/v) Bisacrylamid in H₂O
 10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat in H₂O

Gelzusammensetzungen:

a) Trenngele:

Acrylamidkonzentration in %	7.5	10	12	15	18
Acrylamid/Bisacrylamid 30%/0.8% (ml)	2.5	3.35	4.0	5.0	6.0
Puffer A (ml)	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6
H ₂ O (ml)	4.85	4.0	3.35	2.35	1.35
10% Ammoniumperoxodisulfat (µl)	150	150	150	150	150
TEMED (µl)	20	20	20	20	20

b) Sammelgel: 650 μ l Acrylamid/Bisacrylamid 30%/0.8%, 675 μ l Puffer B, 3.7ml H₂O,
70 μ l 10% Ammoniumperoxodisulfat, 20 μ l TEMED

Gereinigte Minigelplatten wurden mit den zugehörigen Trennstreifen zusammengesetzt und in eine Gießapparatur eingespannt. Anschließend wurde das Trenngel bis ca. 2.5 cm unter den oberen Rand gegossen und zur Ausbildung einer geraden Polymerisationskante vorsichtig mit Butanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation des Trenngels wurde das Butanol sorgfältig entfernt, das Sammelgel gegossen und der Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Nachdem das Sammelgel ebenfalls polymerisiert war, wurde der Kamm vorsichtig herausgezogen und das Gel in die Vertikallaufkammer gespannt.

3.4.2.2 Vorbereitung der Proben und Durchführung der PAGE

Lösungen: 6x Probenpuffer: 14 ml Puffer B (s.oben), 6 ml Glycerin, 2 g SDS, 2.5 mg Bromphenolblau, 1.85 g DTT
5x Laufpuffer: 15.1 g Tris, 72 g Glycin, 5 g SDS, ad 1000 ml H₂O

Die Proteinlösung wurde mit 1/5 Volumen 6x Probenpuffer versetzt und 3 min bei 95°C aufgeköcht. Währenddessen wurden sowohl das obere als auch das untere Pufferreservoir der Vertikallaufkammer mit 1x Laufpuffer gefüllt und die Geltaschen mit einer Spritze ausgespritzt. Nach dem Auftragen der Proben wurde zunächst eine Spannung von 150 Volt angelegt, die auf 200 Volt erhöht wurde, nachdem die Lauffront das Trenngel erreicht hatte.

3.4.3 Coomassie-Färbung

Lösungen: Färbelösung: 1.25 g Coomassie-Blau, 455 ml Methanol, 92 ml Essigsäure,
455 ml H₂O
Entfärbelösung: 375 ml Essigsäure, 250 ml Methanol, ad 5 l H₂O

Zur Visualisierung aufgetrennter Proteine im Polyacrylamid-Gel wurden diese mit dem Farbstoff Coomassie-Brillant-Blue gefärbt. Hierfür wurde das Gel ca. 30 min in Färbelösung inkubiert und anschließend in Entfärbelösung wieder so lange entfärbt, bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Zur Aufbewahrung solcher Gele wurden diese unter Vakuum getrocknet (1-2h, 80°C).

3.4.4 Western Blotting

3.4.4.1 Transfer der Proteine auf PVDF-Membranen

Lösungen: Transferlösung : 25 mM Tris pH 8.3, 192 mM Glycin, 20% Methanol
PonceauS-Stock: 2 g PonceauS, 30 g Trichloressigsäure, 30 g Sulfosalicylsäure,
ad 100 ml H₂O

Nach der SDS-PAGE wurde das Sammelgel abgetrennt, das (Trenn-) Gel zurechtgeschnitten und in Transferlösung inkubiert. Währenddessen wurden die PVDF-Membran und 4 Whatman-Papiere auf Gelgröße zugeschnitten. Zur Vorbereitung der Membran wurde diese kurz in 100% Methanol getaucht, 2 min in ddH₂O und dann 10 min in Transferlösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran luftblasenfrei auf das Gel aufgelegt und zwischen jeweils zwei Whatman-Papieren in die Blotapparatur eingespannt. Der Transfer erfolgte über Nacht bei 40 Volt. Nach dem Transfer wurde die Membran wiederum kurz in 100% Methanol getaucht und zur Fixierung der Proteine auf der Membran luftgetrocknet. Nach erneutem Anfeuchten der Membran in Methanol wurden zur Kontrolle des Transfers reversibel in PonceauS-Arbeitslösung (Stocklösung 1:10 in H₂O verdünnt) angefärbt und die Markerbanden angezeichnet.

3.4.4.2 Immunologischer Nachweis

Lösungen: TBS/T: 10mM Tris pH 7.4, 140mM NaCl, 0.05% Tween 20
als 20x TBS/T: 24.2 g Tris pH 7.4, 163.6 g NaCl, 10 ml Tween 20, ad 1000 ml H₂O
Blockpuffer: 1% (w/v) Magermilchpulver in TBS/T

Alle nachfolgenden Schritte wurden auf einem Schüttler durchgeführt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran zunächst 1 h in Blockpuffer geschwenkt, und eine Stunde mit dem 1. Antikörper in Blockpuffer inkubiert. Nach dem Waschen der Membran (3x10 min mit TBS/T) erfolgte die einstündige Detektion des 1. Antikörpers mit einem zweiten, Peroxidase-konjugierten Antikörper in Blockpuffer. Anschließend wurde die Membran erneut wie oben beschrieben gewaschen und die Nachweisreaktion unter Verwendung des ECL-Systems (Amersham) durchgeführt.

3.4.4.3 Das ECL-System

Gebundene Antikörper-Peroxidase-Konjugate wurden in der Dunkelkammer mit dem ECL-System nachgewiesen. Bei der von der Peroxidase katalysierten Reaktion wird Licht erzeugt und mit diesem ein Röntgenfilm belichtet.

Lösung 1 und Lösung 2 wurden zu gleichen Teilen gemischt und die Membran für 1 min in dem Gemisch inkubiert. Anschließend wurde sie zwischen zwei Folien plaziert und ein Röntgenfilm in einer lichtdichten Kassette für verschieden lange Zeiten (0.5-15 min) auf ihr exponiert. Der Röntgenfilm wurde sofort entwickelt.

4. Ergebnisse

4.1 Regulation der terminalen B-Zell-Differenzierung durch Unterdrückung bzw. Induktion von Blimp-1

4.1.1 Regulation der Expression von Blimp-1

Der Zink-Finger Transkriptionsfaktor Blimp-1 wird als Mastergen für die terminale Differenzierung von B-Lymphozyten zu Immunglobulin sezernierenden Plasmazellen betrachtet [30; 104; 106], d.h. Blimp-1 - wenn induziert und exprimiert - scheint in der Lage, das komplexe terminale Differenzierungsprogramm irreversibel in Gang zu setzen. Da ein solcher Schritt von enormer Tragweite für das weitere Schicksal der B-Zelle ist, erscheint eine präzise Regulation der Expression von Blimp-1 zwingend. In der Tat wurden bereits einige Regulatoren identifiziert, die entscheidenden Einfluß auf die terminale B-Zell-Differenzierung über Suppression oder Induktion von Blimp-1 nehmen. So wird Blimp-1 durch Signalgebung über den B-Zell-Rezeptor oder CD40 unterdrückt [50; 104], durch IL-2 und IL-5 dagegen induziert [30]. Auch die BZR-vermittelte Blockade der Blimp-1 Expression kann durch IL-2 und IL-5 wieder aufgehoben werden [104]. In der vorliegenden Arbeit wurde nun IL-4 als weiterer Regulator identifiziert, der die terminale Differenzierung primärer B-Zellen durch Unterdrückung von Blimp-1 hemmt.

4.1.1.1 Unterdrückung der Blimp-1 Expression und IgM-Sekretion durch IL-4

Zur Analyse der Auswirkungen von IL-4 auf die Expression von Blimp-1 und die Generierung von IgM-sezierenden Zellen wurden ruhende, primäre B-Zellen wildtypischer und IL-4 transgener Mäuse [133] (Bayer AG, Wuppertal) mit LPS in An- und Abwesenheit von zusätzlichem exogenem IL-4 stimuliert. Anschließend wurde die Expression von Blimp-1 in RNase-Protektionsexperimenten untersucht und die Anzahl IgM-sezierender Zellen in den Kulturen in Elispot-Versuchen bestimmt.

Wie aus Abb. 4.1A hervorgeht, ist in Gegenwart von IL-4 sowohl die Expression von Blimp-1 unterdrückt als auch die Anzahl IgM-sezierender Zellen in den Kulturen sehr stark vermindert. Die Hemmung der IgM-Sekretion durch hohe Dosen von IL-4 wurde bereits beschrieben [183], jedoch noch nicht mit einer negativen Regulation von Blimp-1 in Verbindung gebracht. Dabei spielt es keine Rolle, ob das IL-4 exogen zugegeben oder endogen aufgrund des Transgens produziert und in den Überstand abgegeben wird. Endogenes und exogenes IL-4 wirken synergistisch, da die Hemmung der LPS induzierten Differenzierung IL-4 transgener B-Zellen in Gegenwart von exogenem IL-4 am ausgeprägtesten ist. Dass die Blimp-1 Expression durch IL-4 tatsächlich gehemmt und nicht nur verzögert wird, ist in Abb. 4.1B gezeigt. Eine mit LPS-Kulturen vergleichbare Expression von Blimp-1 wird in Gegenwart von IL-4 auch zu späten Zeitpunkten nicht erreicht.

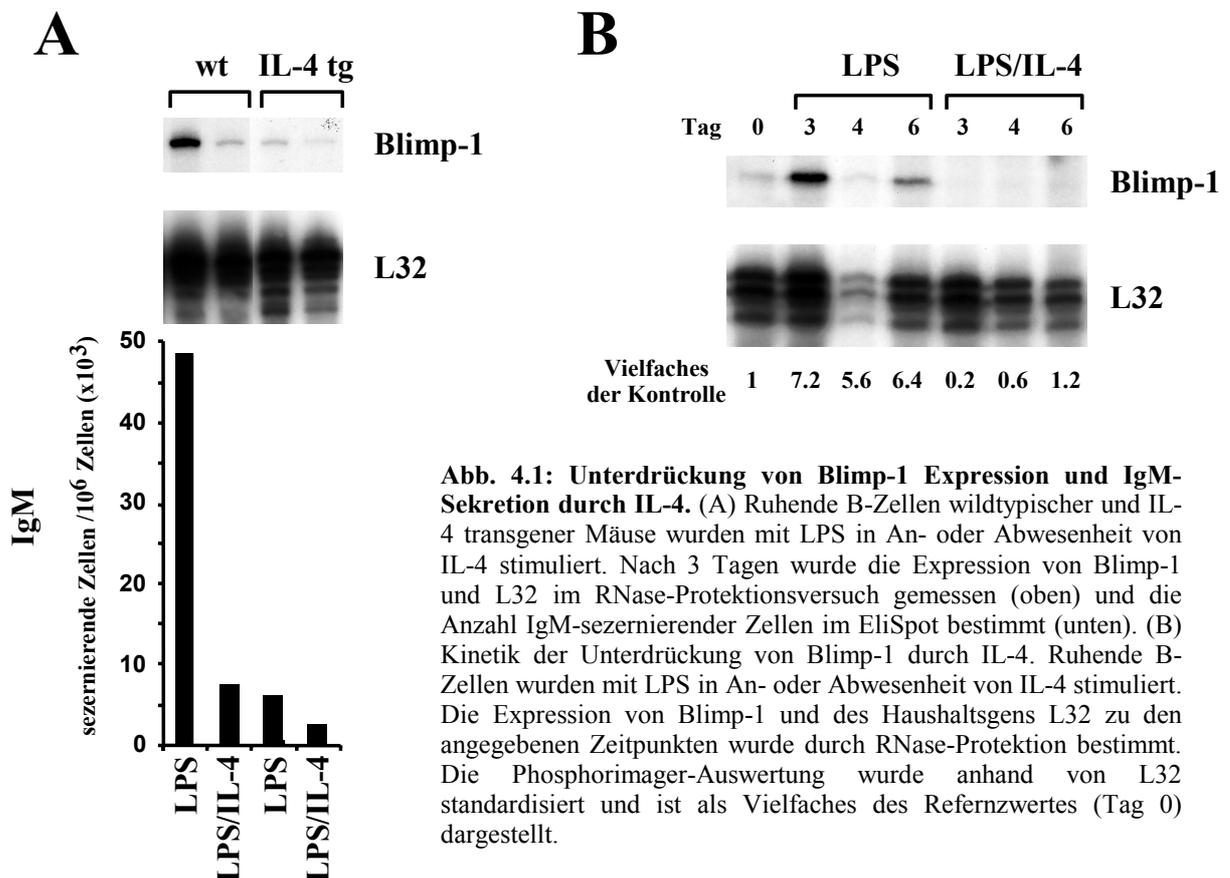


Abb. 4.1: Unterdrückung von Blimp-1 Expression und IgM-Sekretion durch IL-4. (A) Ruhende B-Zellen wildtypischer und IL-4 transgener Mäuse wurden mit LPS in An- oder Abwesenheit von IL-4 stimuliert. Nach 3 Tagen wurde die Expression von Blimp-1 und L32 im RNase-Protektionsversuch gemessen (oben) und die Anzahl IgM-sezierender Zellen im EliSpot bestimmt (unten). (B) Kinetik der Unterdrückung von Blimp-1 durch IL-4. Ruhende B-Zellen wurden mit LPS in An- oder Abwesenheit von IL-4 stimuliert. Die Expression von Blimp-1 und des Haushaltgens L32 zu den angegebenen Zeitpunkten wurde durch RNase-Protektion bestimmt. Die Phosphorimager-Auswertung wurde anhand von L32 standardisiert und ist als Vielfaches des Referenzwertes (Tag 0) dargestellt.

4.1.1.2 Spezifitätskontrolle für IL-4

In den meisten Experimenten zur IL-4 vermittelten Unterdrückung der Plasmazell-Differenzierung wurde ein IL-4 enthaltender Kulturüberstand verwendet. Aus diesem Grunde war es unbedingt erforderlich zu demonstrieren, dass die gemessenen Effekte in der Tat durch IL-4 und nicht durch eine sonstige Komponente des Kulturüberstandes bewirkt wurden. Dies wurde zum einen durch einen Vergleich des Kulturüberstandes (IL-4^{ÜS}) mit einem gereinigten, kommerziell erhältlichen IL4 (IL-4^{kommerziell}), zum anderen durch Blockade des IL-4 im Kulturüberstand mit anti-IL-4 Antikörpern (11B11) erreicht.

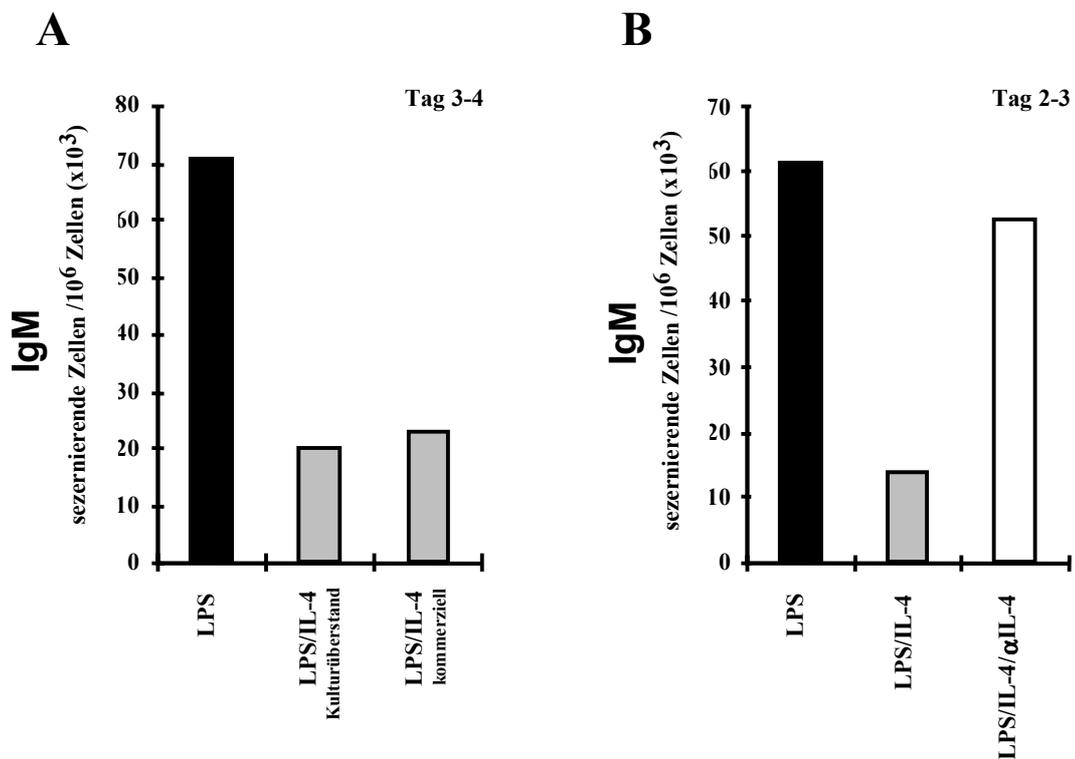
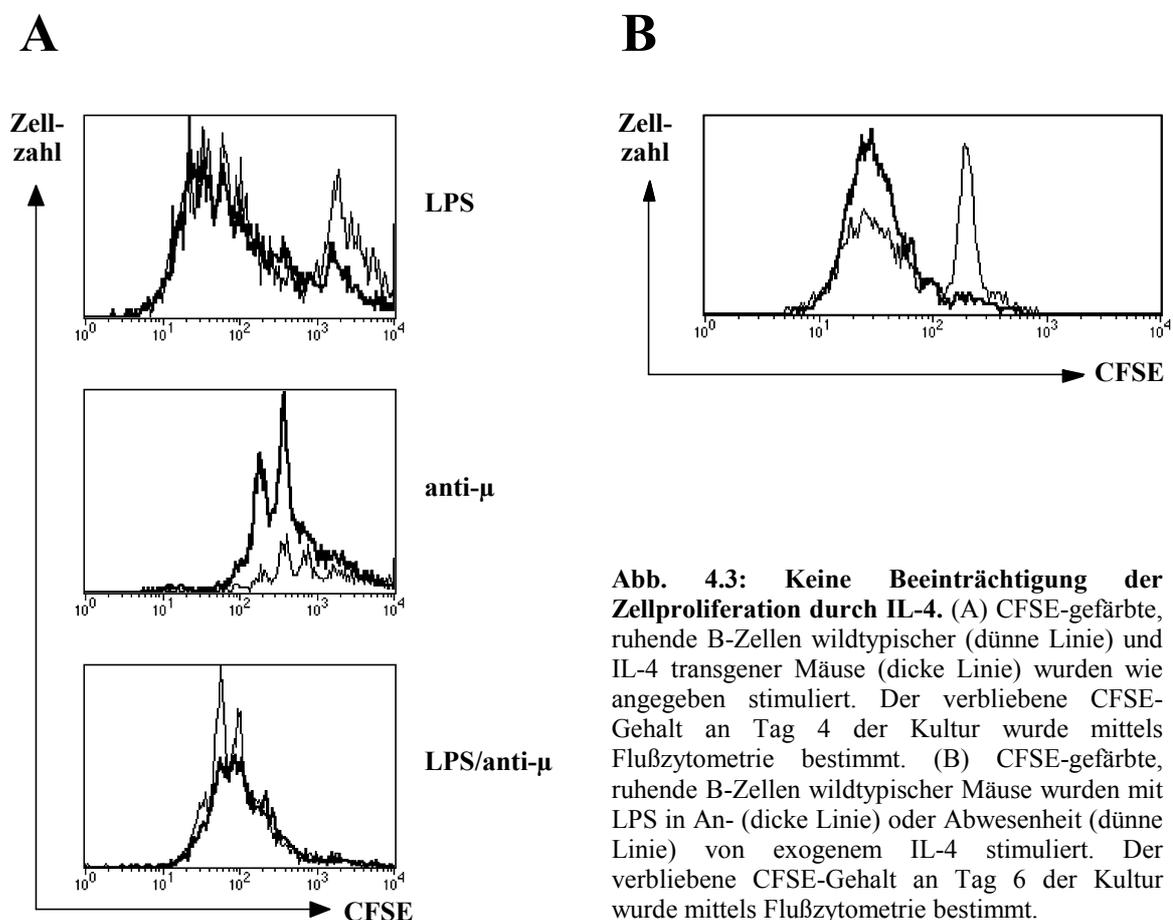


Abb. 4.2: Spezifitätskontrolle für IL-4. (A) Hemmung der IgM-Sekretion durch den IL-4 enthaltenden Kulturüberstand sowie kommerziell erhältliches, gereinigtes IL-4. Ruhende B-Zellen wurden wie angegeben stimuliert und die Anzahl IgM-sezernierender Zellen nach 3 Tagen im EliSpot ermittelt. (B) Aufhebung der IL-4 vermittelten Hemmung der IgM-Sekretion durch anti-IL-4-Antikörper. Zur Blockierung des IL-4 aus dem Kulturüberstand mit anti-IL-4-Antikörpern wurden die Reagentien vor der Zugabe zu den Zellen zunächst 20 min bei 37°C vorinkubiert. Die Anzahl IgM-sezernierender Zellen in den Kulturen wurde von Tag 2-3 im EliSpot ermittelt.

Abb. 4.2A zeigt, dass sowohl in Gegenwart von IL-4^{ÜS} als auch in Gegenwart des IL-4^{kommerziell} die Anzahl IgM-sezernierender Zellen in den Kulturen in vergleichbarem Maße vermindert ist. Wird jedoch das IL-4^{ÜS} durch anti-IL-4 Antikörper blockiert, so erreicht die Zahl der IgM-Sezernenten nahezu wieder das Kontrollniveau (Abb. 4.2B).

4.1.1.3 Keine Beeinträchtigung der Zellproliferation durch IL-4

IL-4 blockiert im LPS-System die Expression von Blimp-1 und die Entstehung IgM-sezernierender Zellen (vgl. 4.1.1.1). Um auszuschließen, dass der Grund hierfür ein beeinträchtigtes Zellwachstum ist, wurden die Auswirkungen von IL-4 auf das Proliferationsverhalten von B-Zellen durch CFSE-Färbungen analysiert. CFSE-markierte Zellen verlieren mit jeder Zellteilung die Hälfte dieses Farbstoffes, so dass der Vergleich des CFSE-Gehaltes proliferierender Zellen mit demjenigen nicht proliferierender Kontrollzellen direkte Rückschlüsse auf die Anzahl der durchlaufenen Zellzyklen zu einem bestimmten Zeitpunkt erlaubt.



Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abb. 4.3 gezeigt. Wildtypische oder IL-4 transgene B-Zellen zeigen keine Unterschiede im CFSE-Profil nach verschiedenen Stimuli (Abb. 4.3A), d.h. IL-4 bewirkt keine Beschleunigung oder Verlangsamung der Proliferation. Auch führt es nicht zum Durchlaufen weiterer Zellzyklen nach Stimulation über den BZR alleine im Vergleich mit Wildtypzellen (Abb. 4.3A, Mitte). Werden anstelle transgener B-Zellen LPS stimulierte Wildtypzellen in An- und Abwesenheit von exogenem IL-4 analysiert, so zeigt sich

erwartungsgemäß auch hier keine unterschiedliche Anzahl durchlaufener Zellzyklen zum jeweiligen Analysezeitpunkt (Abb. 4.3B). Interessant ist allerdings, dass sich in Gegenwart von IL-4 deutlich mehr Zellen an der proliferativen Antwort nach Stimulation mit LPS oder $\alpha\mu$ beteiligen, da in diesen Kulturen nur noch wenige lebende, ungeteilte Zellen vorhanden sind (Abb. 4.3A, oben und Abb. 4.3B). IL-4 alleine induziert in diesem Zusammenhang keine Zellproliferation [188] und wurde bereits von Paul et al. [185] als wichtiger Kofaktor für die Proliferation von B-Zellen beschrieben. Zusammenfassend kann eine verminderte Differenzierung aufgrund beeinträchtigter Zellproliferation durch IL-4 ausgeschlossen werden.

4.1.1.4 IL-4 verhindert die Generierung von Zellen mit Plasmazell-Phänotyp

Zur näheren Charakterisierung des durch IL-4 unterstützten Phänotyps wurden wildtypische oder IL-4 transgene B-Zellen mit LPS in An- bzw. Abwesenheit eines B-Zell-Rezeptorsignals, gegeben durch ein gegen Oberflächen-IgM gerichtetes $F(ab')_2$ -Fragment ($\alpha\mu F(ab')_2$), stimuliert. Der Phänotyp der Zellen in den Kulturen wurde durch Oberflächenfärbungen von Syndecan-1 (CD138) und des "Heat Stable Antigen" (HSA, CD24) ermittelt. Syndecan-1 - ein Heparansulfat und Chondroitinsulfat enthaltendes Proteoglykan - ist als Marker für Immunglobulin-sezernierende Plasmazellen in vivo beschrieben [52] und wird auf LPS-Blasten verstärkt exprimiert ([105], vgl. auch Knödel, M., Diplomarbeit). Für HSA - ein variabel glykosyliertes Membranprotein auf Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten [140] - ist eine im Gegensatz zu naiven B-Zellen verminderte Expression auf solchen B-Zellen gezeigt, welche die Sekundärantwort vermitteln [59; 62; 63]. Im Gegensatz hierzu wird HSA auf LPS-Blasten verstärkt exprimiert ([63], vgl. auch Knödel, M., Diplomarbeit). Die Kostimulation primärer B-Zellen mit LPS und $\alpha\mu F(ab')_2$ induziert in diesem System einen Gedächtniszell-Phänotyp, charakterisiert durch $Syndecan-1^{niedrig} HSA^{niedrig} I\gamma 1^{sterile} Transkripte^+$ (Schliephake, D., Dissertation und [104]).

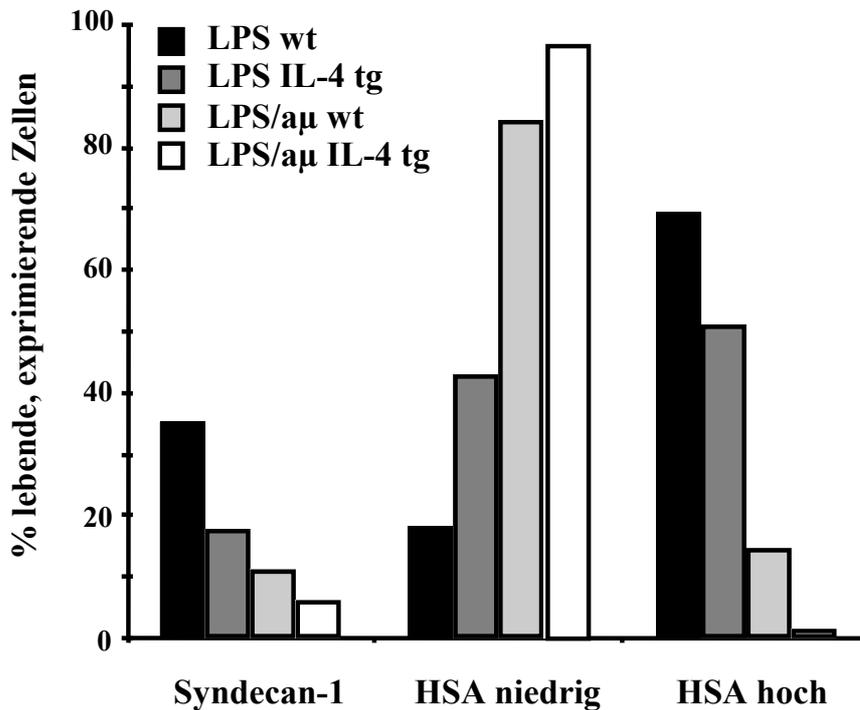


Abb. 4.4: IL-4 wirkt der Generierung von Zellen mit Plasmazell-Phänotyp entgegen. Ruhende B-Zellen wildtypischer oder IL-4 transgener Mäuse wurden mit LPS stimuliert. Einem Teil der Zellen wurde zusätzlich ein BZR-Signal gegeben. Am Tag 3 wurde der Anteil Syndecan-1, HSA niedrig- und HSA hochexprimierender Zellen in den Kulturen mittels Flußzytometrie bestimmt.

Es zeigte sich, dass der Anteil von Zellen mit "Nicht-Plasmazell-Phänotyp", d.h. Syndecan-1^{neg} HSA^{niedrig}, in Gegenwart von IL-4 erhöht ist (Abb. 4.4). Der Anteil HSA hochexprimierender Zellen ist dementsprechend vermindert. Selbst der schon hohe Anteil Syndecan-1^{neg} HSA^{niedrig} Zellen nach Kostimulation mit LPS und αμF(ab')₂ ist mit IL-4 nochmals erhöht. Das Entgegenwirken von IL-4 bezüglich der terminalen Differenzierung von B-Zellen spiegelt sich somit im Phänotyp der Zellen in den entsprechenden Kulturen wider.

4.1.1.5 IL-4 induziert die Expression von B7.2 (CD86) auf der Zelloberfläche

B7.2 (CD86) ist ein wichtiges kostimulatorisches Molekül und wird u.a. auf B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert [141-143]. Die Interaktion von B7.2 mit seinem Liganden CD28 auf T-Zellen spielt eine zentrale Rolle bei kostimulatorischen Wechselwirkungen zwischen antigenpräsentierenden B- und T-Zellen [144-147], die u.a. notwendig sind, T-Zellen zu aktivieren und damit B-Zellen wichtige T-Zell-Hilfe, z.B. IL-2, IL-4 und IL-5, zur Verfügung zu stellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen der Charakterisierung des IL-4 induzierten Phänotyps auch die Oberflächenexpression von B7.2 untersucht. Wie später gezeigt wird (vgl. 4.1.2.2.3 und 4.1.2.3.2), ist diese durch Blimp-1 beeinflusst und daher Bestandteil dieser Thematik.

Die B7.2-Expression auf wildtypischen und IL-4 transgenen Zellen wurde mittels Flußzytometrie sowohl ex vivo (Abb. 4.5A) als auch nach Stimulation mit diversen Agentien gemessen (Abb. 4.5B). Hierbei wurde deutlich, dass IL-4 - sowohl im transgenen System als auch exogen zugegeben - die Expression von B7.2 induziert, sofern das zur Stimulation verwendete Agens nicht bereits selbst zur Expression von B7.2 geführt hatte (Abb. 4.5B). Im transgenen System zeigt sich die positive Wirkung von IL-4 bereits ex vivo, da die Mehrzahl der B220 positiven Milzzellen auch positiv für B7.2 ist (Abb. 4.5A).

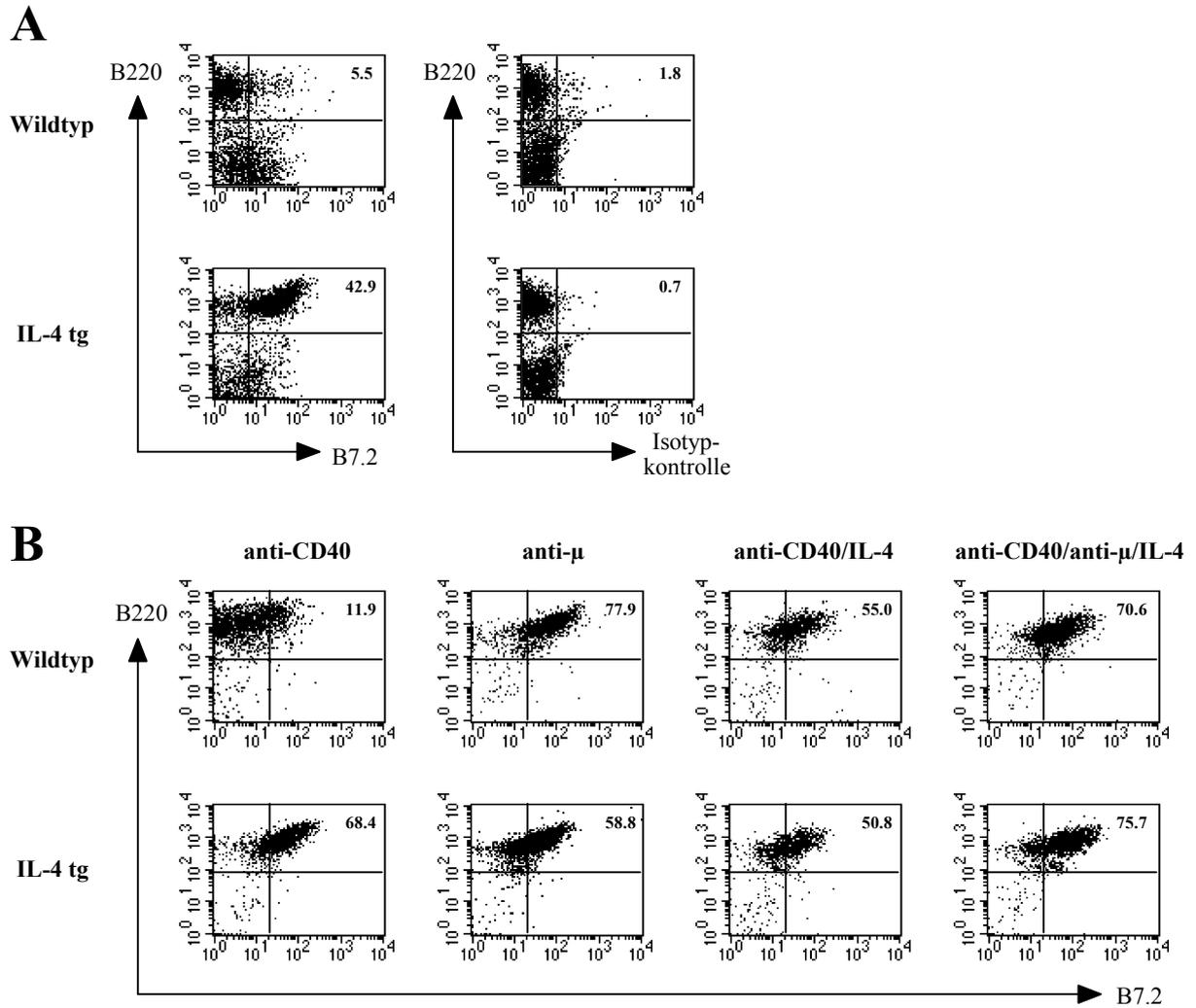


Abb. 4.5: Induktion der Expression von B7.2 durch IL-4. (A) Expression von B7.2 auf IL-4 transgenen B-Zellen *ex vivo*. Die B7.2-Expression auf Milzzellen wildtypischer und IL-4 transgener Mäuse wurde nach hypotoner Lyse der Erythrozyten mittels Flußzytometrie analysiert (links). B-Zellen wurden aufgrund ihrer Expression von B220 innerhalb der Gesamtpopulation identifiziert. Die Isotyp-Negativkontrollen sind ebenfalls gezeigt (rechts). (B) Expression von B7.2 auf B-Zellen nach Stimulation *in vitro*. Ruhende B-Zellen wildtypischer und IL-4 transgener Mäuse wurden wie angegeben stimuliert. Der prozentuale Anteil B7.2 exprimierender Zellen wurde am Tag 3 der Kultur durch Flußzytometrie bestimmt.

4.1.1.6 IL-4 induziert den Klassensprung nach IgG1

Für IL-4 ist beschrieben, dass es in B-Zellen den Klassensprung nach IgG1 und IgE induziert [41; 47; 148], d.h. auf DNA-Ebene rückt durch Rekombinationsprozesse zwischen sog. S(witch)-Sequenzen das für C γ 1 bzw. C ϵ codierende Gensegment an die Stelle des im naiven Zustand verwendeten C μ Segmentes. Die zwischen C μ und C γ 1 bzw. C ϵ befindlichen Sequenzen bleiben zunächst in Form zirkulärer DNA zurück und werden dann abgebaut. B-Zellen, die den Klassensprung nach IgG1 vollzogen haben, tragen daher als B-Zell-Rezeptor membranständiges IgG1 auf der Oberfläche und sezernieren gegebenenfalls auch IgG1.

Da in Anwesenheit von IL-4 die Expression von Blimp-1 und die Sekretion von IgM unterdrückt ist, wurde nun der Klassensprung nach IgG1 und die Sekretion desselben im verwendeten System untersucht. Hierfür wurden ruhende, primäre B-Zellen wie in Abb. 4.6 angegeben stimuliert und die Oberflächenexpression von IgG1 mittels Flußzytometrie analysiert. Sezerniertes IgG1 wurde in EliSpot-Versuchen gemessen.

Abb. 4.6A zeigt, dass nach vier Tagen Kultur in Gegenwart von IL-4 bereits ca. 25% der Zellen IgG1 auf der Oberfläche tragen. Weiterhin bewirkt IL-4 eine gesteigerte Sekretion von IgG1 bei gehemmter IgM-Sekretion ab etwa Tag 4 nach Stimulation (Abb. 4.6B), während die Signalgebung über CD40 in Anwesenheit von LPS zwar auch die Sekretion von IgM unterdrückt, aber keine Sekretion von IgG1 bewirkt. Erhalten so stimulierte Zellen jedoch noch zusätzlich IL-4, so erfolgt wieder eine verstärkte Sekretion von IgG1, nicht aber von IgM (Abb. 4.6B).

Weiterhin wird aber deutlich, dass trotz gesteigerter Sekretion von IgG1 die sekretorische Gesamtaktivität in Anwesenheit von IL-4 drastisch vermindert ist, wie die absoluten Zellzahlen zeigen. Im LPS-System sezernieren an Tag 4 beispielsweise ca. 10-15% der Zellen IgM (ca. 1.2×10^5) und nur sehr wenige IgG1, dagegen sind es nach Kostimulation mit LPS und IL-4 nur ca. 2.2% (2.2×10^4), unter denen sich dann allerdings mehr IgG1-Sezernenten (ca. $1.5-2 \times 10^3$) befinden. Für die Signalgebung über CD40 zeigt sich analog eine Verminderung der sekretorischen Gesamtaktivität (4-5% gegenüber 15%). Diese war allerdings im Vergleich mit IL-4 weniger stark ausgeprägt und ohne vermehrte IgG1-Sekretion. Nachfolgend wurde daher auch die Auswirkung von CD40-Signalen auf die Expression von Blimp-1 in diesem System untersucht.

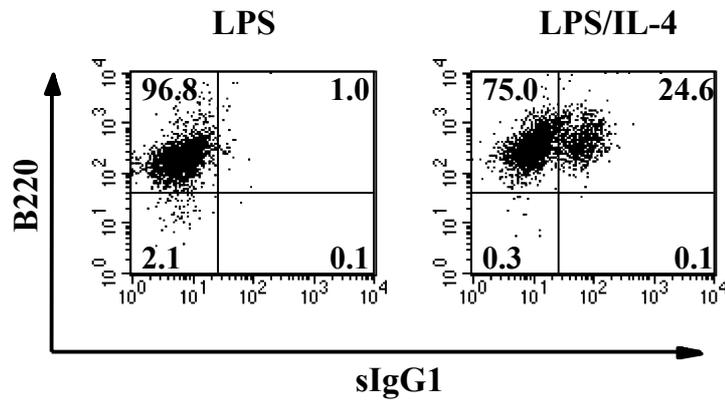
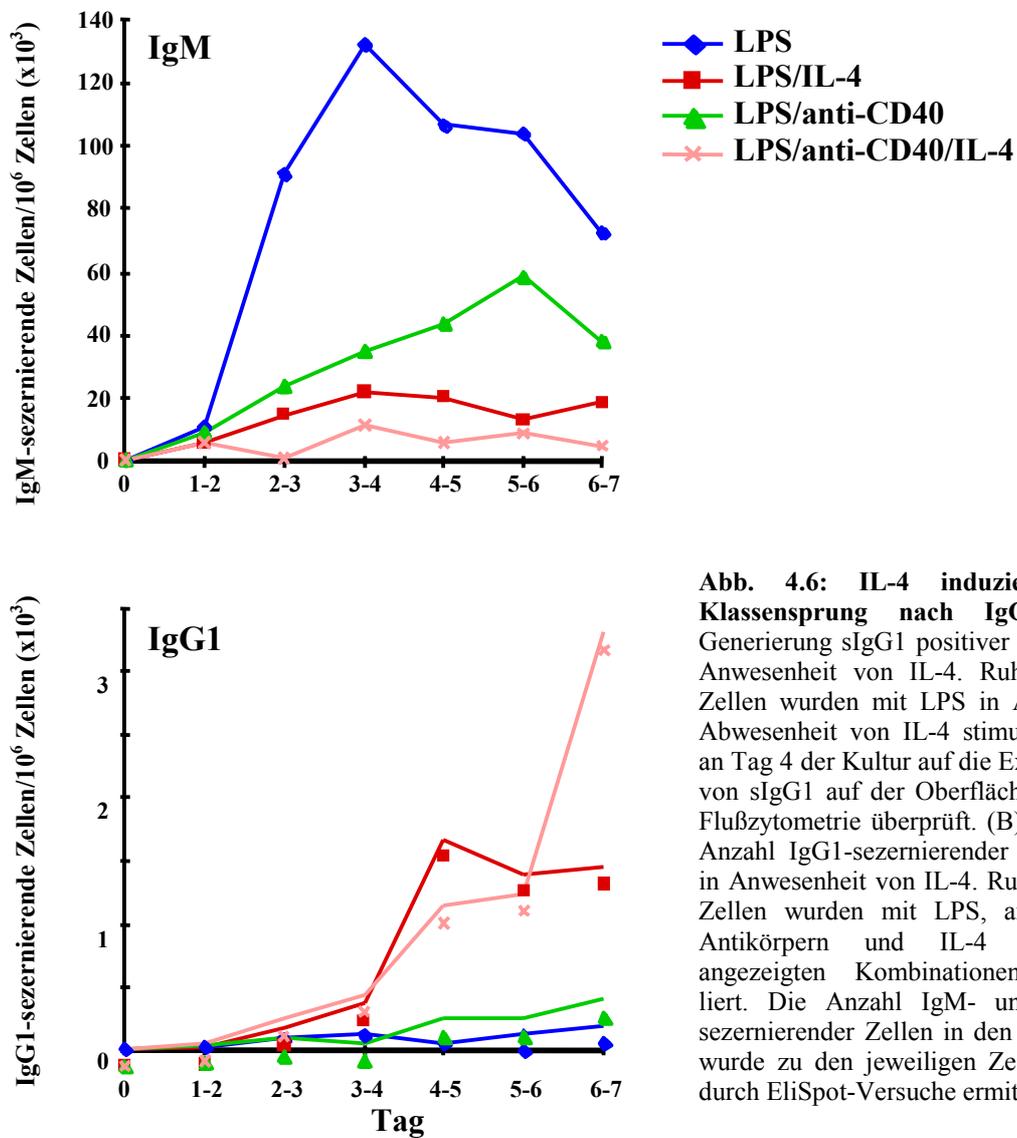
A**B**

Abb. 4.6: IL-4 induziert den Klassensprung nach IgG1. (A) Generierung sIgG1 positiver Zellen in Anwesenheit von IL-4. Ruhende B-Zellen wurden mit LPS in An- bzw. Abwesenheit von IL-4 stimuliert und an Tag 4 der Kultur auf die Expression von sIgG1 auf der Oberfläche mittels Flußzytometrie überprüft. (B) Erhöhte Anzahl IgG1-sezernierender B-Zellen in Anwesenheit von IL-4. Ruhende B-Zellen wurden mit LPS, anti-CD40 Antikörpern und IL-4 in den angezeigten Kombinationen stimuliert. Die Anzahl IgM- und IgG1-sezernierender Zellen in den Kulturen wurde zu den jeweiligen Zeitpunkten durch EliSpot-Versuche ermittelt.

4.1.1.7 Negative Regulation der Expression von Blimp-1 durch CD40 und IL-4

Wie im vorstehenden Abschnitt beschrieben, ist die Gesamtzahl Ig-sezernierender Zellen in LPS-Kulturen mit IL-4 oder anti-CD40 vermindert. Zur Überprüfung der Expression von Blimp-1 unter diesen Bedingungen wurde Gesamt-RNA entsprechend stimulierter primärer B-Zellen in RNase-Protektionsversuchen analysiert. Parallel dazu wurde die Anzahl IgM- bzw. IgG1 sezernierender B-Zellen in den Kulturen durch EliSpot-Versuche ermittelt.

Es zeigte sich, dass die Expression von Blimp-1 sowohl durch IL-4 als auch durch anti-CD40 unterdrückt wird (Abb. 4.7, oben). Die verminderte Blimp-1-Expression korreliert hierbei mit der sekretorischen Gesamtaktivität in der jeweiligen Kultur (Abb. 4.7, unten), wobei - wie bereits beschrieben (vgl. 4.1.1.6) - in Gegenwart von IL-4 entsprechend mehr IgG1-Sezernenten existieren.

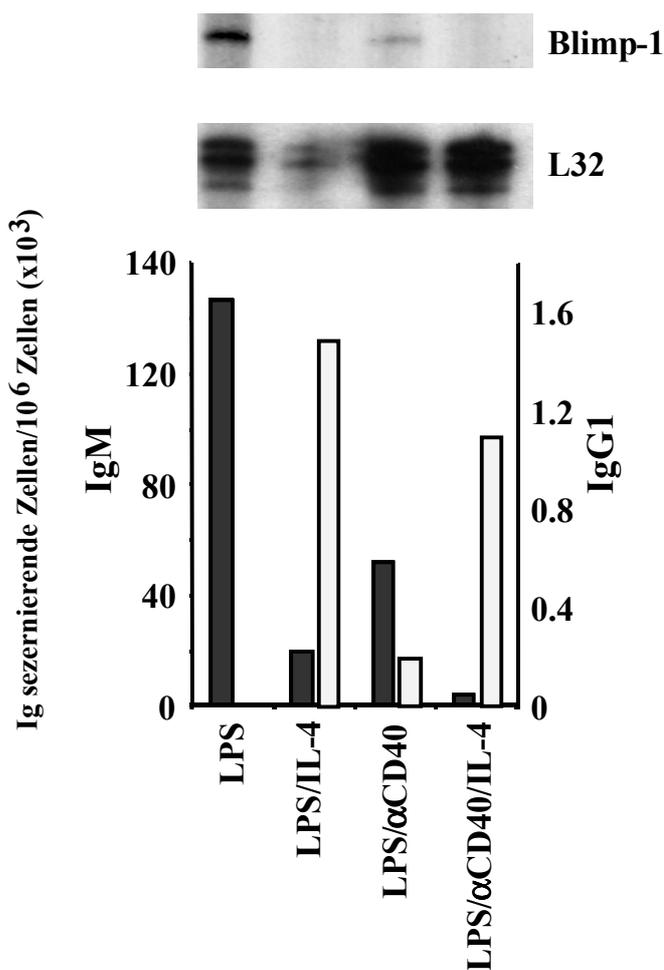


Abb. 4.7: Hemmung der Blimp-1 Expression und Ig-Sekretion durch CD40 Ligation und IL-4. Ruhende B-Zellen wurden mit LPS, anti-CD40 und IL-4 in den angegebenen Kombinationen stimuliert und die Expression von Blimp-1 an Tag 5 durch RNase-Protektion gemessen (oben). Die Anzahl IgM- (schwarze Säulen, linke Skala) und IgG1-(graue Säulen, rechte Skala) sezernierender B-Zellen in den Kulturen wurde in parallelen EliSpot-Versuchen bestimmt.

4.1.1.8 Induktion von IgM- und IgG1-Sekretion durch IL-2 und IL-5

Für IL-2 und IL-5 ist gezeigt, dass sie in BCL1-Zellen zur Induktion von Blimp-1 und zur Sekretion führen [30]. In primären Zellen revertieren sie den BZR-vermittelten Block der IgM-Sekretion nach Kostimulation mit LPS und $\alpha\mu$ [104]. Aus diesem Grunde wurde nachfolgend untersucht, ob diese Zytokine die IL-4 vermittelte Hemmung der Ig-Sekretion ebenfalls aufheben können und - wenn ja - ob dies auch für verschiedene Isotypen (hier IgM und IgG1) gültig ist. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde ein zweistufiges Kultursystem etabliert: Primäre B-Zellen wurden zunächst für 3 Tage mit LPS und IL-4 zur Induktion des Klassensprunges nach IgG1 stimuliert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, wie in Abb. 4.8 angegeben für weitere 2 Tage restimuliert und die Sekretion von IgM und IgG1 in EliSpot-Versuchen gemessen.

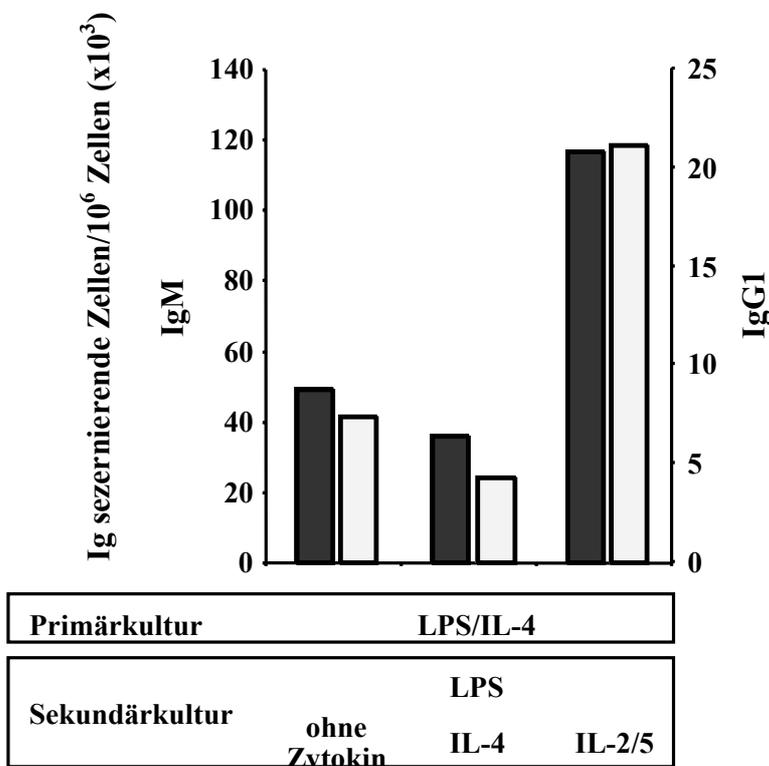


Abb. 4.8: Reversion der IL-4 vermittelten Unterdrückung der Ig-Sekretion durch IL-2 und IL-5. Ruhende B-Zellen wurden mit LPS und IL-4 für 3 Tage stimuliert (Primärkultur). Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen und mit LPS und den angegebenen Zytokinen restimuliert (Sekundärkultur). Am Tag 5 wurde die Anzahl IgM- (dunkle Säulen, linke Skala) und IgG1- (helle Säulen, rechte Skala) sezernierender B-Zellen in den Kulturen im EliSpot bestimmt.

Analog zum LPS/ $\alpha\mu$ -System bewirken IL-2 und IL-5 ebenfalls eine Steigerung der Ig-Sekretion bei LPS/IL-4 vorstimulierten Zellen (Abb. 4.8), und zwar sowohl von IgM als auch von IgG1. Die Zytokine erscheinen bei LPS/IL-4 vorbehandelten Zellen auch absolut notwendig, um die Ig-Sekretion maßgeblich zu steigern, da die alleinige Entfernung des IL-4 nach der Primärkultur keine nennenswerte Steigerung bewirkt, obwohl die Sekundärkultur nur in Anwesenheit von LPS erfolgte. Die im LPS/ $\alpha\mu$ -System gewonnenen Erkenntnisse lassen sich also auf das durch IL-4 gehemmte System übertragen, allerdings ausgeweitet auf den zusätzlichen Isotyp IgG1.

4.1.1.9 Induktion von Blimp-1 Expression sowie IgM- und IgG1-Sekretion durch IL-2 und IL-5 in Abwesenheit von LPS

Aus den in den vorstehenden Abschnitten gewonnenen Daten ergab sich nun die Frage, ob die Expression von Blimp-1 in einem LPS-freien, nicht gehemmten System durch IL-2 und IL-5 ebenfalls induziert wird und mit der beschriebenen Sekretion von Immunglobulinen [186] korreliert. In diesem Fall wurden die primären B-Zellen nur mit Antikörpern gegen CD40 stimuliert. Diese Art der Stimulation führt zur Proliferation der Zellen, nicht aber zur Sekretion. Die aktivierten B-Zellen wurden in Gegenwart von IL-2, IL-4 und IL-5 kultiviert und deren Gesamt-RNA in RNase-Protektionsversuchen auf die Anwesenheit von Blimp-1 mRNA überprüft. Parallel dazu wurde die Anzahl IgM- bzw. IgG1 sezernierender B-Zellen in den Kulturen durch EliSpot-Versuche ermittelt.

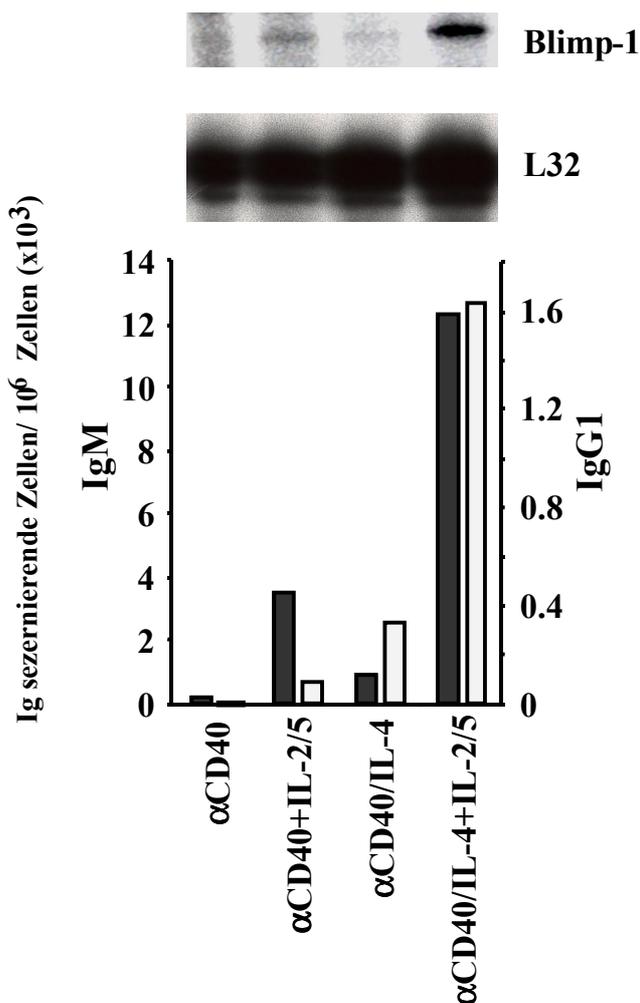


Abb. 4.9: Induktion von Blimp-1 Expression und Ig-Sekretion durch IL-2 und IL-5 in Abwesenheit von LPS. Ruhende B-Zellen wurden mit anti-CD40 und verschiedenen Zytokinen in den angegebenen Kombinationen stimuliert. Nach 3 Tagen wurde die Expression von Blimp-1 durch RNase-Protektion gemessen (oben). Die Anzahl IgM- (dunkle Säulen, linke Skala) und IgG1- (helle Säulen, rechte Skala) sezernierender B-Zellen in den Kulturen wurde in parallelen EliSpot-Versuchen bestimmt.

Wie aus Abb. 4.9 hervorheht, induzieren IL-2 und IL-5 im nicht gehemmten System sowohl Blimp-1 mRNA als auch die Sekretion von IgM und - in Anwesenheit von IL-4 - IgG1 (Abb. 4.9, Spuren 2 und 4). Die in Gegenwart von IL-4 detektierbare, basale Sekretion von IgG1 wird durch IL-2 und IL-5 noch um einen Faktor von 4-5 gesteigert. Die höchsten Absolutzahlen IgM- und IgG1-sezernierender B- Zellen treten interessanterweise in denjenigen Kulturen auf, die neben anti-CD40 noch IL-2, IL-4 und IL-5 enthalten. In Übereinstimmung zeigt sich hier auch die stärkste Expression von Blimp-1. Dabei ist unklar, ob alle drei Zytokine zusammen die mit anti-CD40 stimulierten B-Zellen tatsächlich effizienter differenzieren lassen oder ob dieser Sachverhalt möglicherweise die antiapoptotische Wirkung des IL-4 reflektiert. Zusammenfassend läßt sich sagen, dass sich - in Analogie zum bereits beschriebenen gehemmten LPS-System - auch im CD40-System die positiven Wirkungen von IL-2 und IL-5 bezüglich Blimp-1-Expression und Sekretion von IgM und IgG1 zeigen.

4.1. 2 Ektopische Expression von Blimp-1 durch retrovirale Transduktion

4.1.2.1 Manipulation der Genexpression mittels retroviraler Vektoren

Für die ektopische Expression von Blimp-1 in primären B-Zellen sowie in Zelllinien wurde ein retrovirales Expressionssystem nach Soneoka et al. [136] verwendet. Durch Dreifachtransfektion von 293T-Produzentenzellen mit Expressionsvektoren, die zum einen für die retroviralen Genprodukte Gag, Pol und Env, zum anderen für Blimp-1 (oder ein beliebiges Genprodukt) und ein EGFP-Neomycin-Resistenz-Fusionsprodukt (pEGN-Vektoren) bzw. ein EYFP-Zeocin-Resistenz-Fusionsprodukt (pEYZ-Vektoren) codieren, konnten rekombinante retrovirale Partikel hergestellt und mit diesen die Zielzellen infiziert werden (vgl. auch Methoden). Die verwendeten Vektoren sind schematisch in Abb. 4.10A dargestellt. Infizierte Zellen können sowohl über ihre Grün- bzw. Gelbfluoreszenz (Abb. 4.10B) als auch durch Selektion mit dem entsprechenden Antibiotikum identifiziert und im Bedarfsfalle auch angereichert werden. Ein besonderer Vorteil dieses Systems und der verwendeten Vektoren ist die direkte Kopplung der Expression von cDNA und Markerkonstrukt in der Zelle, da beide von der gleichen, bicistronischen mRNA translatiert werden. Die Initiation der Translation des Markerkonstruktes erfolgt hierbei über die IRES des EMCV. Somit exprimieren alle Zellen mit Grün- bzw. Gelbfluoreszenz oder Antibiotikaresistenz auch die eingebrachte cDNA, wobei der Grad der cDNA-Expression mit der Intensität der Grün- bzw. Gelbfluoreszenz korreliert (Abb. 4.10D). In Abb. 4.10C wurde in WEHI 231-Zellen eingebrachtes Blimp-1 mittels RT-PCR auf RNA-Ebene als Expressionskontrolle nachgewiesen.

Unter Verwendung des beschriebenen Systems können cDNAs sowohl in Zelllinien als auch in primäre, voraktivierte Zellen eingebracht und exprimiert werden, wobei Zelllinien effizienter als primäre Zellen infiziert werden, gemessen am prozentualen Anteil EGFP- bzw. EYFP-exprimierender Zellen in der Kultur. Die Infektionseffizienz bei primären Zellen hängt zudem stark von der Art der Stimulation ab: beispielsweise werden LPS-stimulierte Zellen wesentlich besser als anti-CD40-stimulierte B-Zellen infiziert.

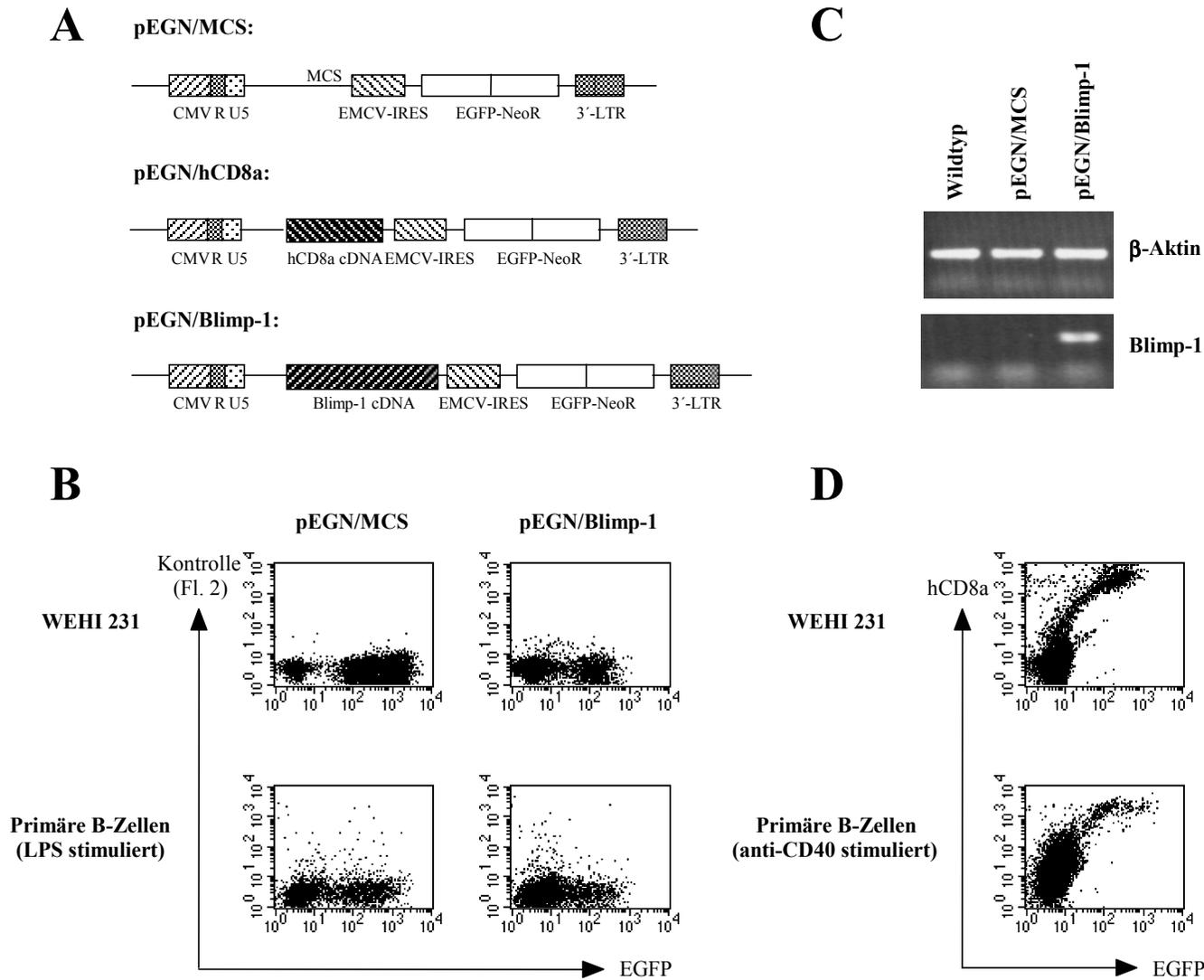


Abb. 4.10. Das retrovirale Infektionssystem. WEHI 231 Zellen bzw. wie angegeben stimulierte, primäre B-Zellen wurden mit für Blimp-1 codierenden Retroviren (pEGN/Blimp-1) bzw. Kontrollviren (pEGN/MCS) infiziert. (A) Schematische Darstellung der retroviralen Konstrukte. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis. (B) Identifikation infizierter Zellen mittels Flußzytometrie. Zwei Tage nach Infektion wurden infizierte, d.h. EGFP-exprimierende Zellen mittels Flußzytometrie detektiert. (C) Nachweis von Blimp-1 mRNA in transduzierten WEHI 231-Zellen. Gesamt-RNA wurde 4 Tage nach Infektion präpariert und Blimp-1 mRNA (unten) mittels RT-PCR nachgewiesen. β -Aktin diente als interne Kontrolle (oben). Möglicherweise kontaminierende Plasmid-DNA wurde zuvor durch DNase-Verdau entfernt. (D) Korrelation von cDNA-Expression und Intensität der Grünfluoreszenz. WEHI 231-Zellen (oben) bzw. mit anti-CD40 stimulierte, primäre B-Zellen (unten) wurden mit einem für humanes CD8a codierenden Retrovirus infiziert. Die Expression von hCD8a und EGFP wurde 3 Tage nach Infektion mittels Flußzytometrie nachgewiesen.

4.1.2.2 Retrovirale Transduktion primärer B-Lymphozyten

4.1.2.2.1 Wiederherstellung bzw. Induktion der Ig-Sekretion durch retroviral transduziertes Blimp-1

In den vorhergehenden Abschnitten sind die positiven Wirkungen von IL-2 und IL-5 auf Blimp-1-Expression und Ig-Sekretion in primären B-Zellen gezeigt. Im folgenden wurde daher analysiert, ob die direkte Transduktion dieser Zellen mit Blimp-1 die Blockade der Ig-Sekretion im LPS/ $\alpha\mu$ /anti-CD40/IL-4-System aufheben bzw. im CD40-System die Ig-Sekretion induzieren kann. Ruhende, primäre B-Zellen wurden wie angegeben stimuliert und für 2 Tage in Kultur gehalten. Anschließend wurden sie mit für Blimp-1-codierenden Retroviren (pEGN/Blimp-1) bzw. mit nur für das EGFP-Neomycinresistenz-Markerkonstrukt codierenden Kontrollviren (pEGN/MCS) infiziert und für weitere 2-3 Tage in Kultur gehalten. Infizierte, d.h. EGFP-exprimierende und daher auch G418-resistente Zellen wurden mittels Flußzytometrie identifiziert und durch Sortierung oder G418-Selektion angereichert. Das Sekretionsverhalten dieser Zellen wurde in EliSpot-Versuchen untersucht.

Hierbei zeigte sich, dass die ektopische Expression von Blimp-1 im durch IL-4, $\alpha\mu$ oder anti-CD40 gehemmten LPS-System die Ig-Sekretion wiederherstellt (Abb. 4.11). Im Mittel werden mindestens 50% der IgM-Sekretion der parallelen LPS-Referenzkultur wieder erreicht, was einem Anteil von 5-10% der Zellen in den Kulturen entspricht. Weiterhin fördert Blimp-1 auch die Sekretion von IgG1, erwartungsgemäß natürlich nur in Anwesenheit des den Klassensprung-induzierenden IL-4. In diesen Ansätzen wurde durchschnittlich eine 50fache Steigerung im Vergleich mit der LPS-Referenzkultur und eine 10-15fache Steigerung im Vergleich mit kontrollinfizierten LPS/IL-4-Zellen gemessen (Abb. 4.11A). Allerdings sezernierten trotzdem nur 0.5-1.3% aller Blimp-1⁺ Zellen in dieser Kultur IgG1, im Vergleich zu IgM ein deutlich niedriger Prozentsatz. Aus diesem Grunde wurde untersucht, ob sich diese Diskrepanz alleine durch den nur in einem Teil der Zellen stattfindenden Klassensprung nach IgG1 erklären läßt oder ob Blimp-1 diesen sogar beeinträchtigt. Die Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt dargestellt (vgl. 4.1.2.2.2). Bei transduzierten LPS/ $\alpha\mu$ - bzw. LPS/anti-CD40-Zellen bewirkt Blimp-1 dagegen keine Erhöhung der IgG1-Sekretion, d.h. Blimp-1 selbst induziert dementsprechend keinen Klassensprung nach IgG1. Diese Daten sind daher in Abb. 4.11 nicht gezeigt.

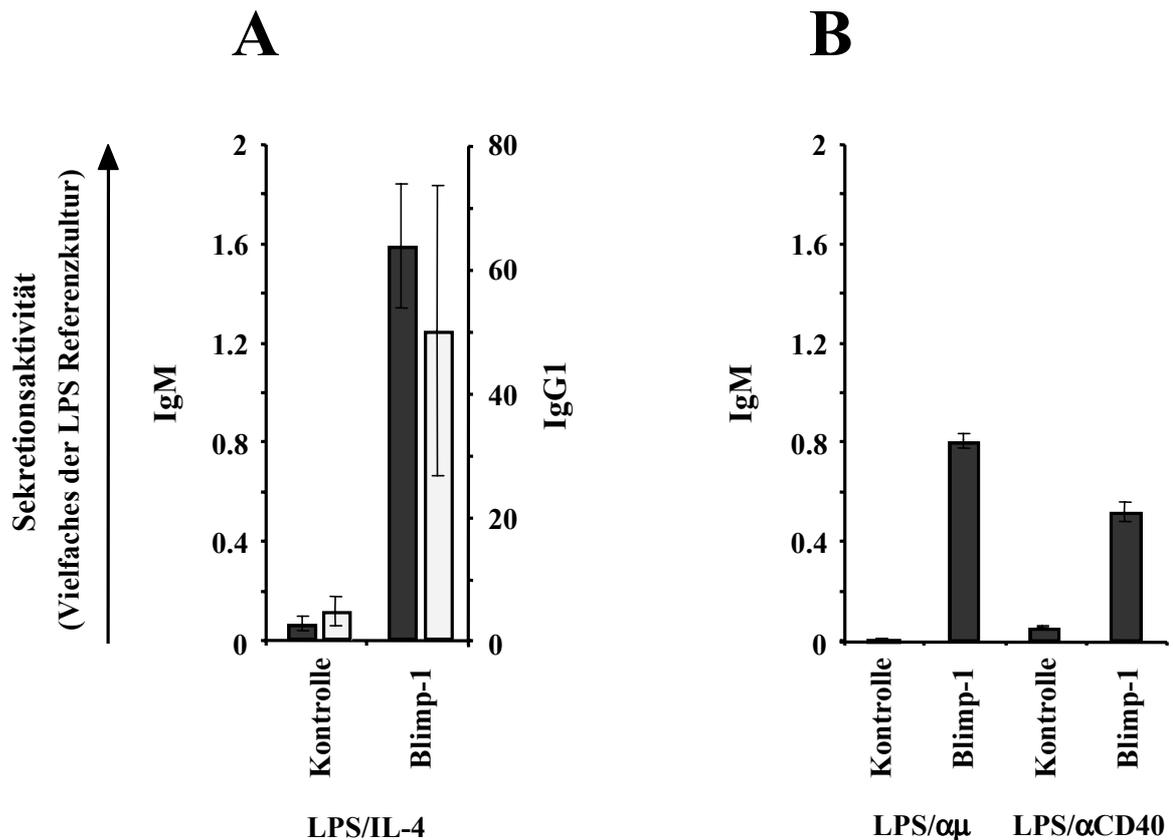


Abb. 4.11: Wiederherstellung der Ig-Sekretion durch retroviral transduziertes Blimp-1 im gehemnten LPS-System. Ruhende B-Zellen wurden mit LPS in Kombination mit IL-4 (A), αμ oder anti-CD40 (B) stimuliert und an Tag 2 der Kultur mit für Blimp-1 codierenden Retroviren (Blimp-1) bzw. entsprechenden Kontrollviren (Kontrolle) infiziert. Infizierte Zellen wurden durch Sortierung oder G418-Selektion (1mg/ml) angereichert. Die Anzahl IgM- (dunkle Säulen, linke Skala) und IgG1- (helle Säulen, rechte Skala) sezernierender B-Zellen in den Kulturen wurde 2-3 Tage später in EliSpot-Versuchen bestimmt. Zum Vergleich verschiedener unabhängiger Experimente sind die Daten als Vielfaches der LPS-Referenzkultur in jedem Experiment dargestellt. Die LPS-Referenzwerte (Ig-sezernierende Zellen/10⁶ Zellen x 10³) waren 69.0-147.0 (A) und 104.0-152.0 (B) für IgM und 0.001-0.2 für IgG1.

Ein verändertes Bild bietet sich bezüglich der Induktion der Ig-Sekretion in anti-CD40-System (Abb. 4.12). Die Transduktion von Blimp-1 bewirkt zwar ebenfalls eine deutliche Steigerung der Sekretion sowohl von IgM als auch - in Anwesenheit von IL-4 - von IgG1, allerdings waren in Blimp-1⁺ CD40-Kulturen trotzdem nur ca. 10% an IgM-Sezernenten im Vergleich mit einer LPS-Referenzkultur vorhanden. Dies legt die Vermutung nahe, dass in diesem System eine oder mehrere wichtige Komponente(n) fehlen, die zusätzlich zu Blimp-1 für eine effizientere Sekretion benötigt werden. Vor diesem Hintergrund erscheint Blimp-1 für die Ig-Sekretion notwendig, alleine aber möglicherweise doch nicht ausreichend. Dieser Frage wurde in anderen Experimenten

noch nachgegangen (siehe 4.1.2.2.4). Wie im LPS/IL-4 System zeigt sich auch im anti-CD40/IL-4 System ein im Vergleich zu IgM-Sekretanten deutlich niedriger Prozentsatz an IgG1 sezernierenden Zellen. Auf die Gesamtkultur bezogen wurden nur ca. 2.5-4% IgM-Sekretanten und 0.2-0.4% IgG1-Sekretanten gemessen, wobei nach Transduktion von anti-CD40/IL-4 stimulierten Zellen mit Blimp-1 interessanterweise immer mehr IgM-Sekretanten detektiert werden als nach Transduktion von mit anti-CD40 alleine stimulierten Zellen. Die Rolle des Klassensprunges nach IgG1 und die Auswirkung der Expression von Blimp-1 auf denselben sind daher ebenfalls im folgenden Abschnitt gezeigt (vgl. 4.1.2.2.2).

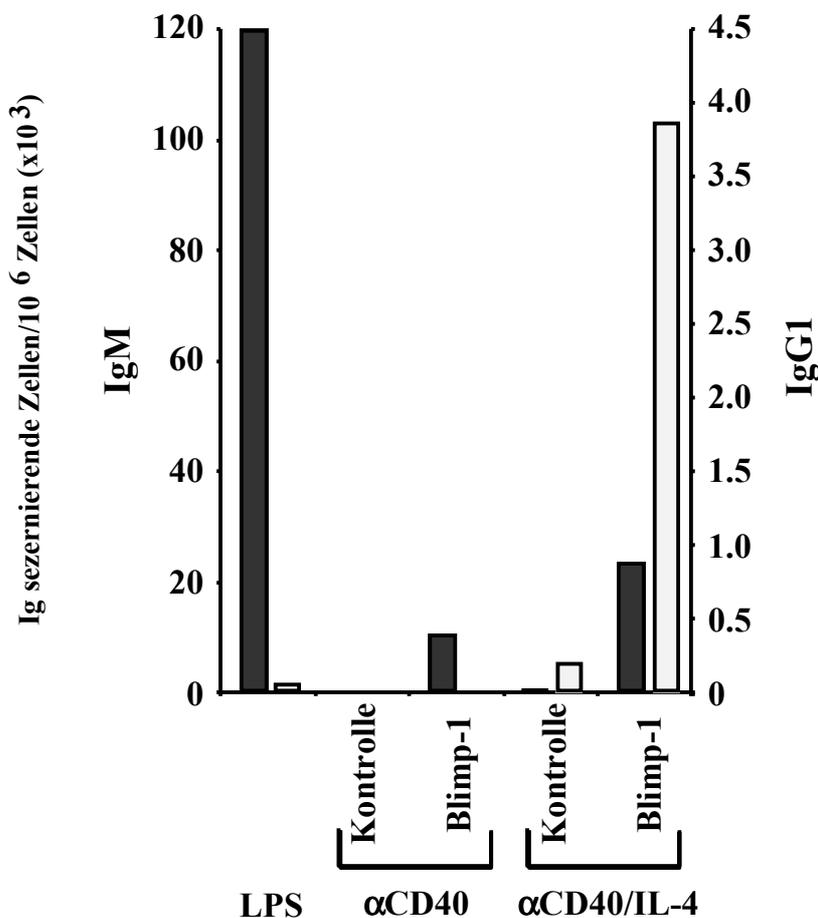


Abb. 4.12: Initiation der Ig-Sekretion durch retroviral transduziertes Blimp-1 im CD40-System. Ruhende B-Zellen wurden mit anti-CD40 in An- und Abwesenheit von IL-4 stimuliert und nach 2 Tagen mit für Blimp-1 codierenden Retroviren (Blimp-1) bzw. entsprechenden Kontrollviren (Kontrolle) infiziert. EGFP⁺ Zellen wurden nach weiteren 2 Tagen durch Sortierung angereichert und die Anzahl IgM- (dunkle Säulen, linke Skala) und IgG1- (helle Säulen, rechte Skala) sezernierender B-Zellen im EliSpot bestimmt.

Zusammenfassend zeigt sich somit, dass Blimp-1 durchaus ausreicht, die Sekretion von IgM - und auch von anderen Isotypen wie IgG1 - erheblich zu steigern. Es ist in der Lage, ein geblocktes LPS-System zu revertieren und auch eine Sekretionsaktivität im anti-CD40-System zu induzieren.

4.1.2.2.2 Beeinträchtigung des Klassensprungs nach IgG1 durch Blimp-1

Wie vorstehend gezeigt, bewirkt die Transduktion von LPS/IL-4-Blasten bzw. anti-CD40/IL-4 stimulierten B-Zellen mit Blimp-1 eine deutliche Steigerung der Ig-Sekretion, und zwar sowohl von IgM als auch von IgG1. Allerdings scheinen sich trotzdem nur 0.5-1.5% aller Blimp-1⁺ Zellen einer LPS/IL-4 Kultur bzw. nur 0.2-0.4% einer anti-CD40/IL-4 Kultur an der IgG1-Antwort zu beteiligen. IgM sezernieren zum Vergleich wieder 10-15% der Zellen einer Blimp-1⁺ LPS/IL-4 Kultur und immerhin 2.5-4% der Blimp-1⁺ anti-CD40/IL-4 Kultur. Zum Verständnis dieser Diskrepanz wurde daher analysiert, ob sie sich alleine durch den nur in einem Teil der Zellen ablaufenden Klassensprung nach IgG1 erklären läßt oder ob Blimp-1 diesen sogar beeinträchtigt. Im letzteren Fall wäre die prozentual geringere Beteiligung der Zellen an der IgG1-Antwort somit auf eine kleinere Zahl von Zellen mit vollzogenem Klassensprung zurückzuführen.

Primäre, ruhende B-Zellen wurden mit LPS oder anti-CD40 in An- und Abwesenheit von IL-4 stimuliert, nach 2 Tagen mit für Blimp-1-codierenden Retroviren (pEGN/Blimp-1; Blimp-1) bzw. entsprechenden Kontrollviren (pEGN/MCS; Kontrolle) infiziert und weiter in Kultur gehalten. Der prozentuale Anteil infizierter (EGFP⁺), sIgG1⁺ B-Zellen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten mittels Flußzytometrie bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass nach Transduktion von Blimp-1 in der Tat weniger sIgG1⁺ EGFP⁺ Zellen in den Kulturen vorhanden sind (Abb. 4.13). Dies trifft sowohl auf das LPS-System (Abb. 4.13A) als auch auf das anti-CD40-System (Abb. 4.13B) zu. Weiterhin zeigt sich folgende Dosisabhängigkeit: je stärker die EGFP-Intensität ist, d.h. je mehr Blimp-1 die Zellen exprimieren, desto geringer wird der Anteil an sIgG1⁺ EGFP⁺ Zellen. Die Generierung von sIgG1⁺ Zellen nimmt somit mit steigender Expression von Blimp-1 ab. Kontrollfärbungen gegen IgM ergaben zudem, dass die Blimp-1 exprimierenden EGFP⁺ Zellen noch IgM auf der Oberfläche tragen (nicht gezeigt), d.h. Hinweise auf ein etwaiges Fehlen von membranständigem IgG1 auf der Oberfläche aufgrund massiver sekretorischer Aktivität dieser Zellen gibt es nicht.

Vor diesem Hintergrund wird eine Anpassung der obigen Kalkulation notwendig: nach Transduktion von Blimp-1 zeigt sich ein höherer Anteil IgG1-sezernierender Zellen bei einem geringeren Prozentsatz von sIgG1⁺ Zellen. In verschiedenen Experimenten, in denen die B-Zellen sowohl mit LPS + IL-4 als auch mit anti-CD40 + IL-4 stimuliert waren, sezernierten 4-17% der mit Blimp-1 transduzierten, sIgG1⁺ Zellen diesen Isotyp. Von beispielsweise 38×10^3 Blimp-1⁺sIgG1⁺ Zellen einer anti-CD40/IL-4 Kultur sezernierten 2.7×10^3 Zellen IgG1, d.h. 7.1%. Dieser Anteil ist sogar größer als die gemessenen Beteiligung von ca. 2.5-4% der Zellen einer transduzierten anti-CD40/IL-4 Kultur an der IgM-Sekretion und spricht gegen eine selektive Wirkung von Blimp-1 nur auf die von T-Helferzellen unabhängige IgM-Sekretion, wie von Soro et al. [105] postuliert wurde. Gleichzeitig sind die Daten in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Angelin-Duclos et al. [192], wonach Blimp-1 auch während einer T-Zell-abhängigen Immunantwort von zentraler Bedeutung ist.

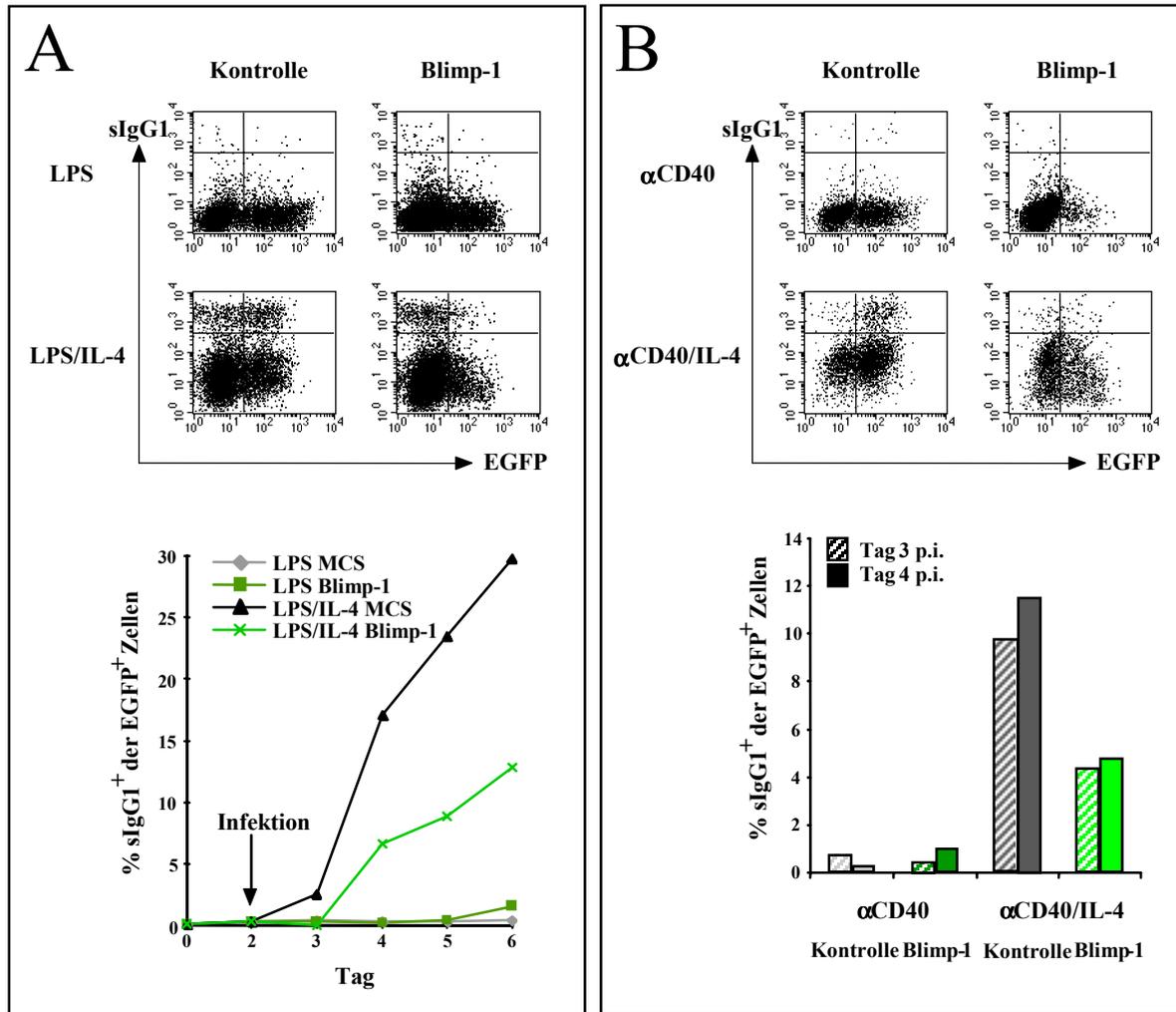


Abb. 4.13: Blimp-1 hemmt den Klassensprung nach IgG1. Ruhende B-Zellen wurden wie angegeben stimuliert und an Tag 2 mit für Blimp-1 codierenden Retroviren (Blimp-1) oder Kontrollviren (Kontrolle) infiziert. Der Anteil lebender, EGFP⁺ sIgG1⁺ Zellen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Flußzytometrie bestimmt. (A) Oben: Tag 2 nach Infektion; unten: Kinetik der Expression von sIgG1. (B) Oben: Tag 4 nach Infektion; unten: Tag 3 und 4 nach Infektion.

4.1.2.2.3 Blimp-1 exprimierende B-Zellen zeigen verminderte Oberflächenexpression von B7.2 (CD86)

Die Expression von B7.2 (CD86), einem wichtigen kostimulatorischen Molekül im Hinblick auf Interaktionen zwischen B- und T-Zellen, wird auf primären B-Zellen u.a. durch IL-4 induziert (vgl. 4.1.1.5). IL-4 unterdrückt nun aber auch die Expression von Blimp-1 und damit die terminale Differenzierung (vgl. 4.1.1.1). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher auch untersucht, ob Blimp-1 die Expression von B7.2 beeinflusst. Hierfür wurden primäre B-Zellen mit entsprechenden Retroviren infiziert und die Expression von B7.2 auf der Oberfläche der EGFP⁺ Zellen per Flußzytometrie gemessen.

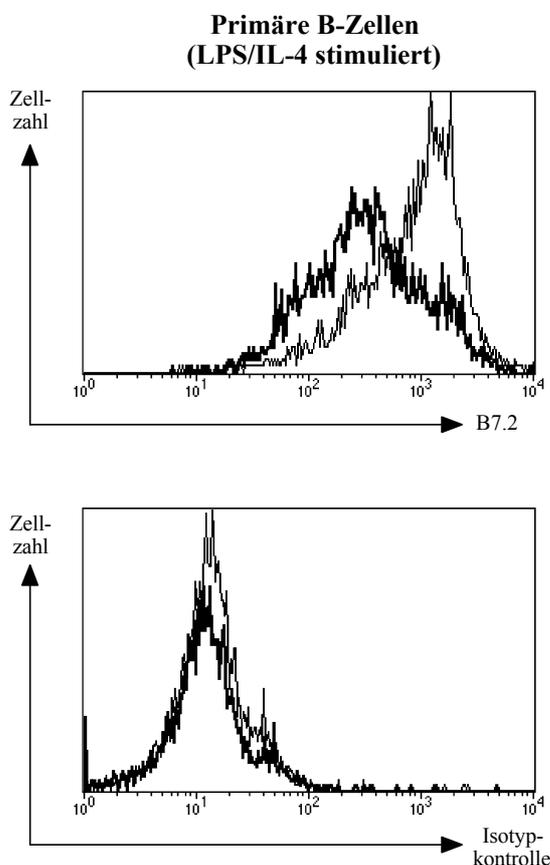


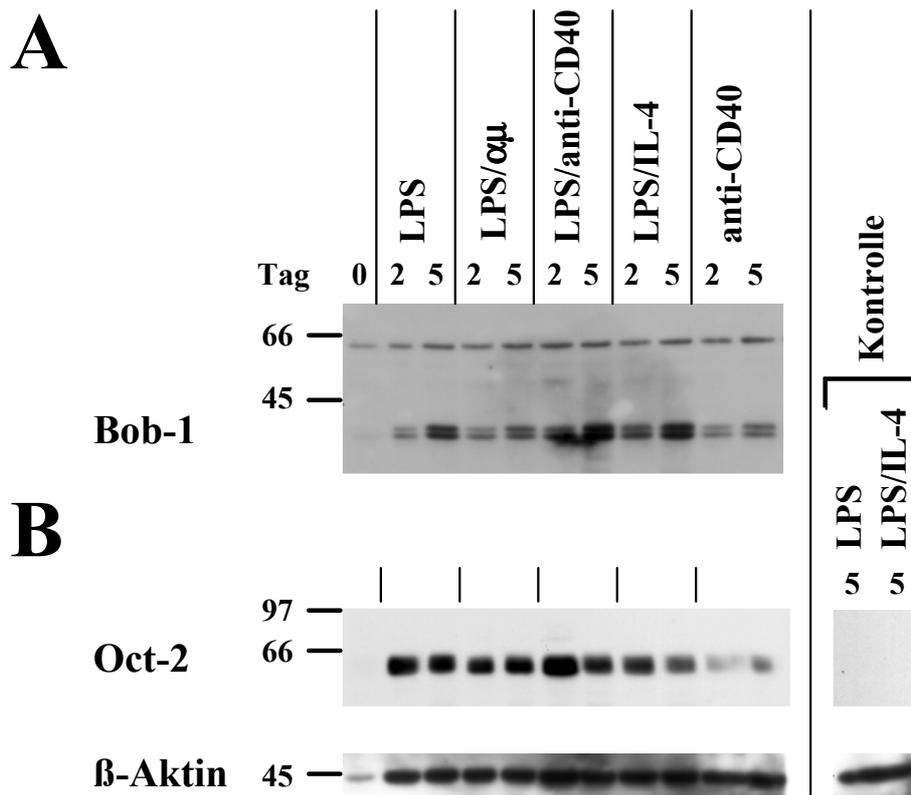
Abb. 4.14: Verminderte Expression von B7.2 (CD86) auf der Oberfläche Blimp-1 exprimierender B-Zellen. Ruhende, primäre B- Zellen wurden mit LPS und IL-4 stimuliert und an Tag 2 der Kultur mit für Blimp-1 codierenden Retroviren (dicke Linie) bzw. Kontrollviren (dünne Linie) infiziert. Die Expression von B7.2 auf der Oberfläche wurde 4 Tage später mittels Flußzytometrie gemessen (oben). Die Spezifität der Färbungen wurde durch Kontrollfärbungen mit Antikörpern gleichen Isotyps und gleicher Konjugation überprüft (unten). Die gezeigten Daten repräsentieren lebende, EGFP⁺ Zellen.

Es zeigte sich, dass Blimp-1 zur Erniedrigung der Expression von B7.2 auf der Zelloberfläche führt (Abb. 4.14). In LPS/IL-4 kostimulierten primären Zellen ist dieser Sachverhalt sehr deutlich ausgeprägt (ca. 5fach), da diese Zellen an sich schon sehr viel B7.2 auf ihrer Oberfläche tragen. Terminal differenzierende B-Zellen verlieren somit eine wichtige Fähigkeit zur Kostimulation.

4.1.2.2.4 Vergleich der Expression weiterer Transkriptionsfaktoren in An- bzw. Abwesenheit von LPS

Wie unter 4.1.2.2.1 dargestellt, bewirkt die Transduktion von anti-CD40 stimulierten B-Zellen mit Blimp-1 ebenfalls eine deutliche Steigerung der Sekretion sowohl von IgM als auch - in Anwesenheit von IL-4 - von IgG1. Im Vergleich mit einer LPS-Referenzkultur sind allerdings trotzdem erheblich weniger IgM-sezernierende Zellen (nur ca. 10%) in diesen Kulturen vorhanden. Dies legt die Vermutung nahe, dass in diesem System eine oder mehrere wichtige Komponente(n) fehlen, die zusätzlich zu Blimp-1 für eine effizientere Sekretion benötigt werden. Vor diesem Hintergrund wurde die Expression weiterer Transkriptionsfaktoren, die für die späte B-Zell-Differenzierung als von Bedeutung beschrieben sind (vgl. auch 1.4), in B-Zellen nach verschiedenen Stimuli durch Western-Blotting untersucht. Für die Versuche wurden B-Zellen verwendet, die mit LPS alleine, LPS/ $\alpha\mu$, LPS/anti-CD40, LPS/IL-4 und anti-CD40 alleine stimuliert worden waren.

Abb. 4.15: Analyse der Expression von Bob-1 und Oct-2 in verschiedenen stimulierten



B-Zellen. Ruhende, primäre B-Zellen wurden wie angegeben stimuliert, kultiviert und zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Die Expression von Bob-1 (A) und Oct-2 (B) wurde in Gesamtlysaten durch Western-Blotting bestimmt. Als Kontrolle der Spezifität der verwendeten primären Antikörper dienen Parallelansätze, die nur mit dem sekundären Antikörper entwickelt wurden, wie beispielhaft in (B), rechter Teil dargestellt. β -Aktin diente als interne Ladekontrolle.

Abb. 4.15 zeigt das Expressionsmuster von Bob-1 (A) und Oct-2 (B). Die Expression von Bob-1 stieg nach Aktivierung der B-Zelle an, und zwar sowohl in An- als auch in Abwesenheit von LPS. Zu späten Zeitpunkten (Tag 5) bestanden nur geringe Expressionsunterschiede zwischen den unterschiedlich stimulierten B-Zellen, allerdings stieg die Expression in mit anti-CD40 alleine stimulierten B-Zellen etwas weniger stark an als in Gegenwart von LPS. Bei der Analyse früherer Zeitpunkte zeigte sich jedoch eine deutlich geringere Bob-1 Expression in Gegenwart von anti-CD40 im Vergleich mit den LPS-Kulturen (Abb. 4.16). Die Verstärkung der Bob-1 Expression scheint somit nach anti-CD40 Stimulation langsamer vorstatten zu gehen.

Die Untersuchung von Oct-2 zeigte dagegen eine deutlich verminderte Expression zu frühen und zu späten Zeitpunkten, und zwar ausschließlich in Abwesenheit von LPS (Abb. 4.15B).

Hinsichtlich der Ig-Sekretion könnten daher Oct-2 und Bob-1 limitierend im Blimp-1 transduzierten anti-CD40 System sein, zumal Bob-1/Oct-2-Komplexe als von zentraler Bedeutung für die Aktivität der Immunglobulin-Promotoren betrachtet werden [128; 129; 149].

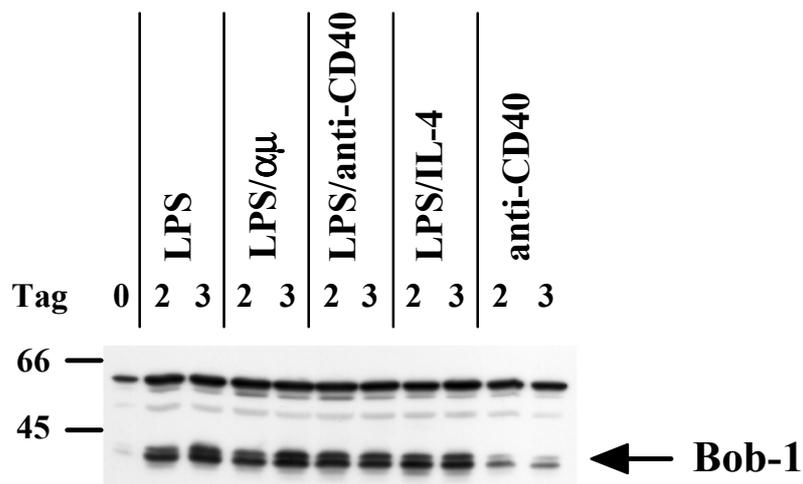


Abb. 4.16: Analyse der Expression von Bob-1 in verschiedenen stimulierten B-Zellen zu frühen Zeitpunkten. Ruhende, primäre B-Zellen wurden wie angegeben stimuliert, kultiviert und zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Die Expression von Bob-1 wurde in Gesamtlisaten durch Western-Blotting bestimmt. Als Kontrolle der Spezifität der verwendeten primären Antikörper dienten Parallelansätze, die nur mit dem sekundären Antikörper entwickelt wurden (nicht gezeigt).

4.1.2.3 Retrovirale Transduktion von WEHI 231 Zellen

4.1.2.3.1 Phänotyp Blimp-1 exprimierender WEHI 231 Zellen

Messika et al. [106] postulierten, dass die durch Blimp-1 bewirkte Differenzierung abhängig vom Entwicklungsstadium der B-Zelle ist. Die Expression von Blimp-1 stelle einen Kontrollpunkt dar: vollständig aktivierte Zellen differenzieren weiter zur Plasmazelle, unreifere B-Zell-Stadien hingegen werden eliminiert.

Zur Überprüfung dieses Sachverhaltes und zur Analyse der Auswirkung der Blimp-1-Expression in einem frühen Reifungsstadium einer B-Zelle wurden WEHI 231 Zellen mit für Blimp-1-codierenden Retroviren (pEGN/Blimp-1) bzw. mit nur für das EGFP-Neomycinresistenz-Markerkonstrukt codierenden Kontrollviren (pEGN/MCS) infiziert. Da WEHI 231 Zellen nur IgM auf der Zelloberfläche exprimieren und Signalgebung über den B-Zellrezeptor zur Apoptose führt [172], werden sie häufig als Modellsystem für eine unreife B-Zelle eingesetzt. Die infizierten WEHI 231 Zellen wurden bezüglich ihres Proliferations- und Differenzierungsverhaltens untersucht. Hierbei zeigte sich ein gravierender Wachstums- und/oder Überlebensnachteil Blimp-1 transduzierter Zellen, da der prozentuale Anteil EGFP-exprimierender Zellen nach Transduktion von Blimp-1 im Gegensatz zu Kontrollzellen kontinuierlich abnahm (Abb. 4.17A). Zur Unterscheidung, ob der Verlust dieser Zellen im Proliferationsverhalten oder im Überleben begründet ist, wurden Zellzyklusanalysen mit Propidiumjodid bei Zellen, die gemäß ihrer EGFP-Expression sortiert waren, durchgeführt. Hierbei zeigte sich sowohl ein verminderter Übergang in die S/G2/M-Phase des Zellzyklus als auch eine Zunahme subdiploider (d.h. apoptotischer) Zellen nach Blimp-1 Transduktion (Abb. 4.17C), so dass offensichtlich beide Faktoren, Proliferationsnachteil und Zelltod, für den Verlust der Blimp-1 exprimierenden WEHI 231 Zellen verantwortlich sind. Während sich in Kulturen ohne hohe Blimp-1-Expression 34-41% der Zellen in der S/G2/M-Phase befanden und kaum subdiploide Zellen vorhanden waren, befanden sich nur noch ca. 10% der Blimp-1 exprimierenden Zellen in der S/G2/M-Phase und der Anteil subdiploider Zellen war auf 48% erhöht. Wurden gemäß ihrer EGFP-Expression sortierte Zellen in Gegenwart von 3H-Thymidin kultiviert, so zeigte sich erwartungsgemäß ein verminderter 3H-Thymidineinbau in Blimp-1 exprimierenden Zellen. Diese Verminderung korrelierte mit der Intensität der Grünfluoreszenz und damit mit der Stärke der Blimp-1 Expression (Abb. 4.17C).

In diesem Zusammenhang zeigte sich erneut der große Vorteil der strikten Kopplung der Blimp-1-Expression und der Grünfluoreszenz: die gemessenen Blimp-1 Effekte waren jeweils in der EGFP-positiven Zellpopulation vorhanden, so dass die jeweilige EGFP-negative Zellpopulation der gleichen Infektion als interne Spezifitätskontrolle diente.

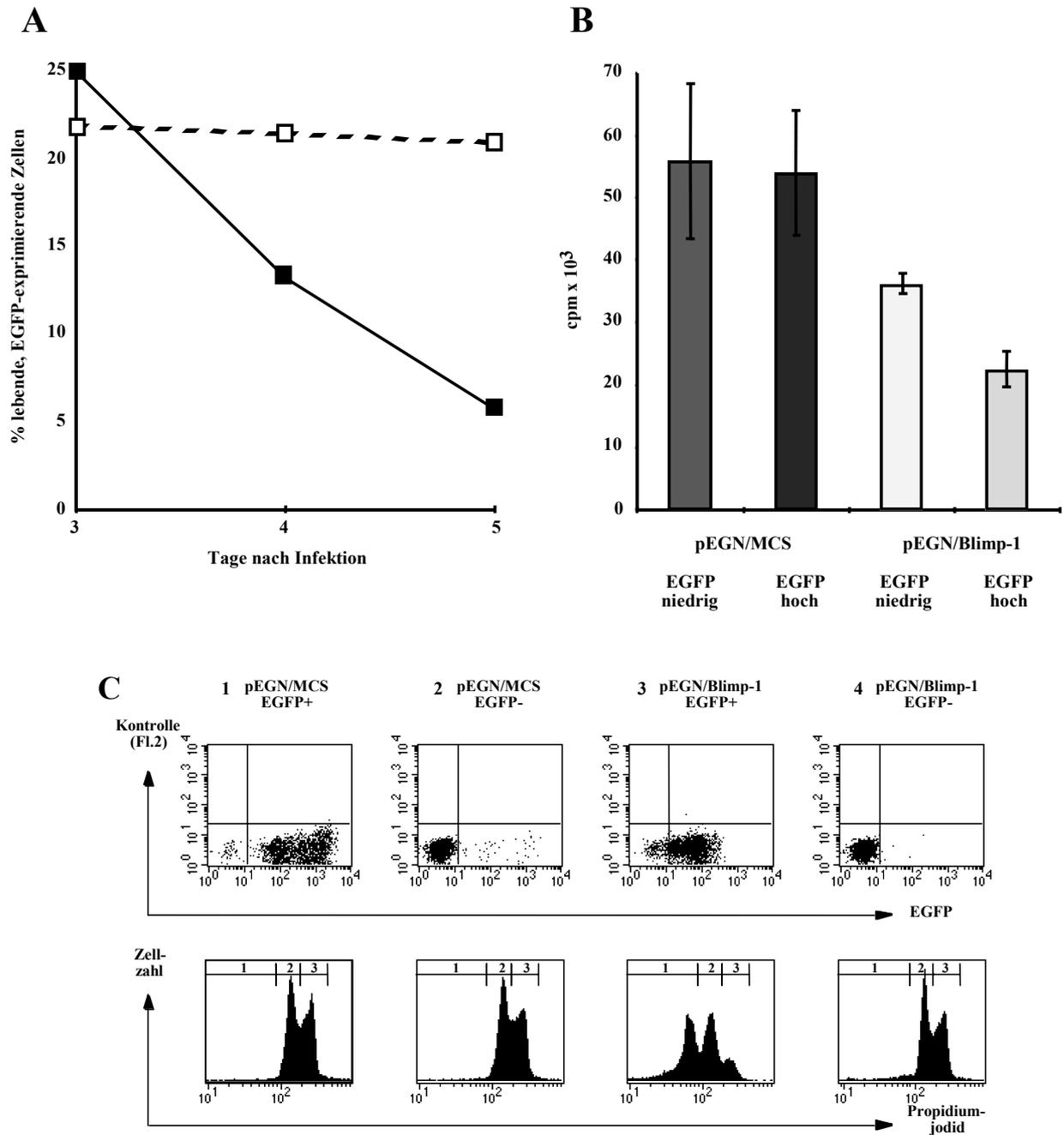


Abb. 4.17: Wachstumsnachteil Blimp-1 transduzierter WEHI 231 Zellen. (A) Verlust Blimp-1⁺EGFP⁺ Zellen während der Kultur. WEHI 231 Zellen wurden mit für Blimp-1 codierenden Retroviren (■) bzw. Kontrollviren (□) infiziert. Der Prozentsatz lebender, EGFP⁺ Zellen in den Kulturen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten mittels Flußzytometrie bestimmt. (B) Verminderte Wachstumsrate von Zellen von EGFP- und Blimp-1 hochexprimierenden Zellen. Blimp-1 transduzierte Zellen oder entsprechende Kontrollzellen wurden 2 Wochen in Gegenwart von G418 (1mg/ml) kultiviert und bezüglich ihrer EGFP-Expression sortiert. Anschließend wurden die Zellen (1×10^4 in 100 μ l Medium) für 15 h in Gegenwart von 0.25 μ Ci ³H-Thymidin inkubiert und der Thymidineinbau gemessen. (C) Verminderter Eintritt in die S-Phase und verstärkter Zelltod Blimp-1 exprimierender Zellen. Blimp-1 transduzierte Zellen (pEGN/Blimp-1) oder entsprechende Kontrollzellen (pEGN/MCS) wurden bezüglich ihrer EGFP-Expression 3 Tage nach Infektion sortiert. Die gezeigten Subpopulationen (oben) wurden mit Propidiumjodid gefärbt und mittels Flußzytometrie analysiert (unten). Angegebene Regionen: 1. apoptotische Zellen (subdiploid); 2. G0/G1 Phase (2n); 3. S/G2/M Phase (2-4n).

Überraschenderweise zeigte sich weiterhin, dass Blimp-1 aber nicht sofort und ausschließlich zum Absterben der Zelle führt, da Blimp-1 exprimierende WEHI 231 Zellen charakteristische Merkmale einer zur Plasmazelle differenzierenden B-Zelle zeigen. So sezernieren diese Zellen IgM (Abb. 4.18A) und zeigen ein geändertes Verhältnis zwischen sezernierter und membranständiger Form der μ -Kette mit Schwerpunkt auf der sezernierten Form (Abb. 4.18B). Außerdem exprimieren sie die J-Kette (Abb. 4.18C) und zeigen eine erhöhte Oberflächenexpression des Plasmazellmarkers Syndecan-1 bei einer gleichzeitigen Verminderung des Oberflächen-IgM (Abb. 4.18D). Daneben ist die Konzentration der μ -Transkripte in Blimp-1-positiven Zellen um einen Faktor 4-5 erhöht, wie der Vergleich mit dem konstant exprimierten Haushaltsgen L32 verdeutlicht (Abb. 4.18B). Die in Abb. 4.18A und 15C gezeigten Experimente wurden mit nicht sortierten Gesamtkulturen durchgeführt, die zum Analysezeitpunkt ca. 10% EGFP⁺Blimp-1⁺ Zellen enthielten; daher ist der Unterschied zwischen Blimp-1-infizierten Zellen und Kontrollzellen auf Einzelzellbasis dementsprechend größer.

Interessanterweise zeigen Blimp-1 infizierte Zellen, die für längere Zeit in G418 selektioniert wurden, kein geändertes μ m/ μ s-Verhältnis mehr, und auch die Transkription der μ -Kette entspricht wieder dem Niveau der Kontrollzellen (Abb. 4.18B, Spur 3). Dies ist in Übereinstimmung mit den in Abschnitt 4.1.2.3.3 gezeigten Daten und wird dort im Zusammenhang dargestellt.

Zusammengefaßt zeigen Blimp-1 exprimierende, unreife WEHI 231 Zellen bemerkenswerterweise den Phänotyp kurzlebiger Plasmazellen und konnten somit verwendet werden, um molekulare Mechanismen der Blimp-1-induzierten Plasmazell-Differenzierung sowie des Blimp-1-vermittelten, differenzierungsabhängigen Zelltodes zu untersuchen (vgl. 4.2).

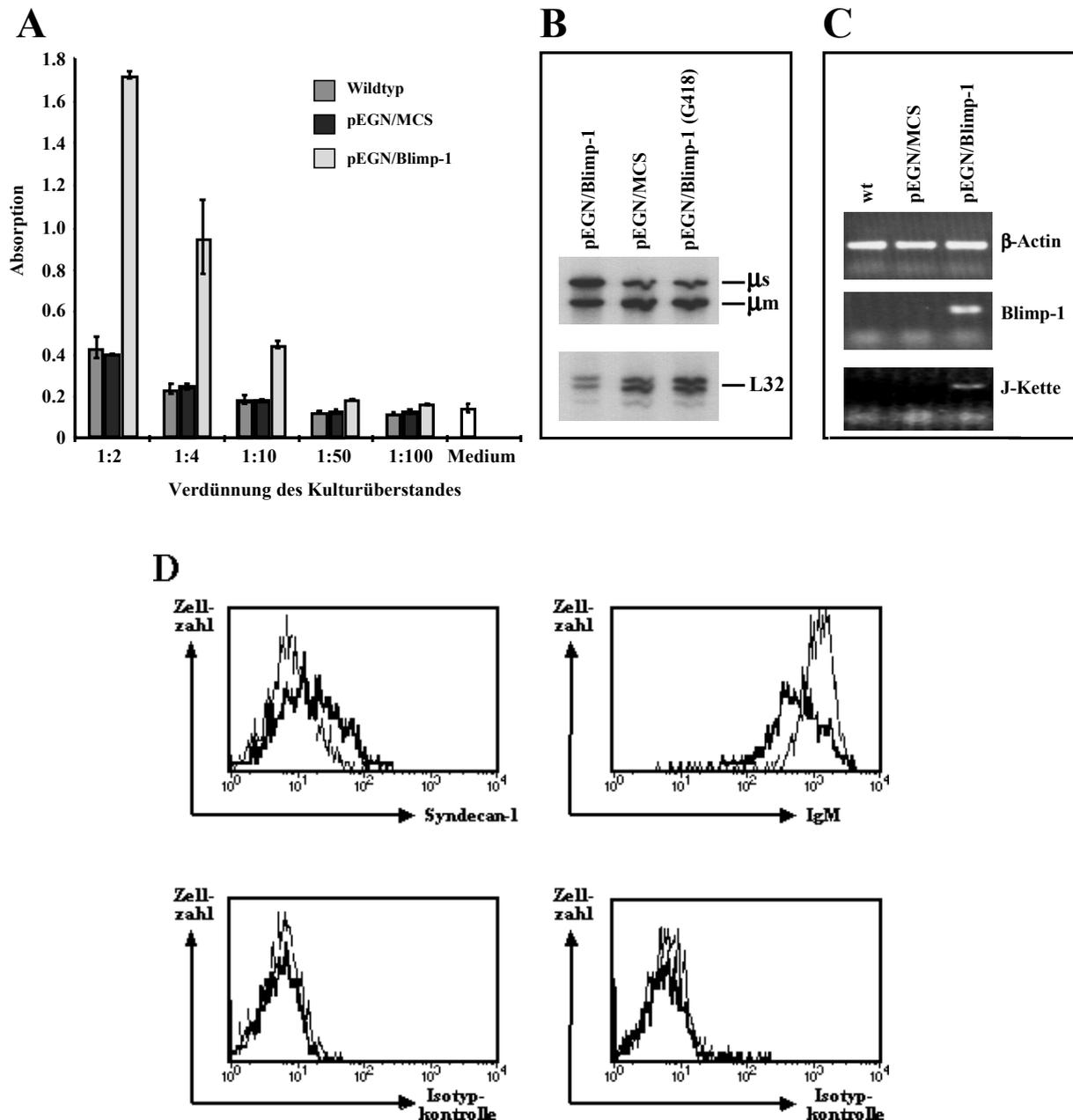


Abb. 4.18: Blimp-1 induziert IgM-Sekretion, die Erhöhung der Expression von μ s, J-Kette und Syndecan-1 sowie die Erniedrigung der Expression von μ m in WEHI 231 Zellen. (A) IgM Sekretion. WEHI 231 Zellen wurden mit den angezeigten rekombinanten Viren infiziert und in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen/ml ausgesät. Am Tag 4 nach Infektion wurde im Kulturüberstand vorhandenes IgM durch ELISA gemessen. (B) Änderung des Verhältnisses von μ m zu μ s mRNA. EGFP⁺ Zellen der wie angegeben infizierten Kulturen wurden am Tag 3 nach Infektion sortiert. Zusätzlich wurden Blimp-1 transduzierte, in Gegenwart von G418 (1mg/ml) kultivierte EGFP⁺ Zellen verwendet. In 2-3 μ g Gesamt-RNA der sortierten Zellen wurden die angezeigten Transkripte mittels RNase-Protektion nachgewiesen. (C) Verstärkte Expression der J-Kette. Aus Gesamt-RNA wildtypischer, kontrolltransduzierter oder Blimp-1 transduzierter WEHI 231 Zellen wurde nach DNase-Verdau cDNA synthetisiert. J-Ketten-spezifische Sequenzen wurden anschließend mittels PCR amplifiziert. RT-PCR mit β -Aktin- bzw. Blimp-1-spezifischen Oligonukleotiden dienten als interne Kontrolle. (D) Verstärkte Expression von Syndecan-1 und verminderte Expression von μ gM. Auf Blimp-1 transduzierten (dicke Linien) bzw. kontrolltransduzierten (dünne Linien) WEHI 231 Zellen wurde die Expression von Syndecan-1 bzw. μ gM an Tag 4 nach Infektion durch Flußzytometrie

bestimmt (oben). Die Spezifität der Färbungen wurde durch Parallelfärbungen mit Kontrollantikörpern gleichen Isotyps und gleicher Konjugation überprüft (unten). Die gezeigten Daten repräsentieren lebende, EGFP⁺ Zellen.

4.1.2.3.2 Verminderte Oberflächenexpression von B7.2 (CD86) auf Blimp-1 transduzierten WEHI 231 Zellen

Wie unter 4.1.2.2.3 gezeigt, führt Blimp-1 zur Erniedrigung des zur Kostimulation von T-Zellen relevanten Oberflächenmoleküls B7.2 (CD86) auf LPS/IL-4 stimulierten, primären B-Zellen. Im folgenden wurde nun überprüft, ob dieser Sachverhalt im Lymphommodell der WEHI 231 Zelle ebenfalls Gültigkeit besitzt. Hierfür wurden WEHI 231 Zellen mit entsprechenden Retroviren infiziert und die Expression von B7.2 auf der Oberfläche der EGFP⁺ Zellen per Flußzytometrie gemessen.

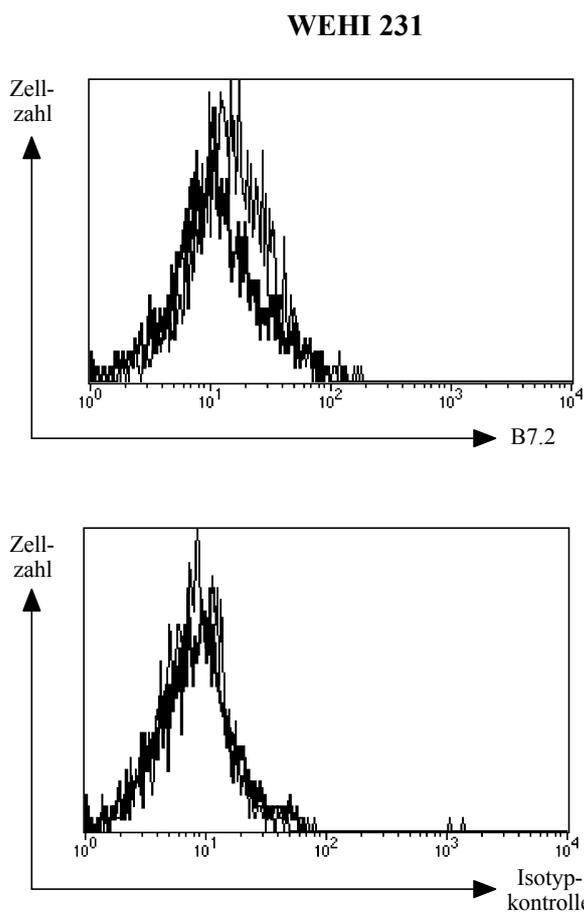


Abb. 4.19: Verminderte Expression von B7.2 (CD86) auf der Oberfläche Blimp-1 exprimierender WEHI 231 Zellen. WEHI 231 Zellen wurden mit für Blimp-1 codierenden Retroviren (dicke Linie) bzw. Kontrollviren (dünne Linie) infiziert und die Expression von B7.2 auf der Oberfläche 4 Tage später mittels Flußzytometrie gemessen (oben). Die Spezifität der Färbungen wurde durch Kontrollfärbungen mit Antikörpern gleichen Isotyps und gleicher Konjugation überprüft (unten). Die gezeigten Daten repräsentieren lebende, EGFP⁺ Zellen.

Es zeigte sich, dass Blimp-1 auch auf WEHI 231 Zellen zur Erniedrigung der Expression von B7.2 auf der Zelloberfläche führt (Abb. 4.19). Im Gegensatz zu primären Zellen ist der Effekt allerdings sehr viel schwächer ausgeprägt, da WEHI 231 Zellen nur sehr wenig B7.2 auf der Oberfläche exprimieren. Die an sich schon geringe B7.2-Expression wird durch Blimp-1 nochmals vermindert.

4.1.2.3.3 Verlust des differenzierten Phänotyps nach Selektion und Kultivierung Blimp-1 transduzierter WEHI 231 Zellen

Da die Expression von Blimp-1 in WEHI 231 Zellen Differenzierungsprozesse charakteristisch für eine zur Plasmazelle differenzierenden B-Zelle induziert - allerdings auf Kosten der Proliferation und des Überlebens -, wurde überprüft, ob Zellen differenzierten Phänotyps unter Selektionsdruck längere Zeit kultiviert werden können. Hierfür wurde dem Medium Blimp-1 infizierter bzw. kontrollinfizierter Zellen G418 (1 mg/ml Endkonzentration) zugesetzt, so dass nicht infizierte Zellen ohne Neomycinresistenz absterben. Hierbei zeigte sich, dass auch nach Blimp-1 Transduktion Zellen auswachsen, die a) grün und b) G418 resistent sind (Abb. 4.20A). Interessanterweise ist das Verhältnis von hochgrünen zu niedriggrünen Zellen in Blimp-1 Kulturen sehr stark zugunsten der Zellen mit niedriger Grünfluoreszenz, d.h. niedriger Expression von Blimp-1, verschoben (31.4% hochgrüne Blimp-1 Zellen im Gegensatz zu 88.8% hochgrüne Kontrollzellen), so dass sich die Beeinträchtigung des Zellwachstums durch Blimp-1 auch hier manifestiert. Werden die ausgewachsenen Zellen nach der Intensität ihrer Grünfluoreszenz sortiert, so ist in beiden Zellpopulationen (EGFP^{hoch} und EGFP^{niedrig}) Blimp-1 mRNA mittels RT-PCR weiterhin nachweisbar (Abb. 4.20B, Mitte). Allerdings scheint die Blimp-1 mRNA-Konzentration in der hochgrünen Population nicht erhöht. Weiterhin ist im Gegensatz zu frisch mit Blimp-1 infizierten Zellen keine für die J-Kette codierende mRNA mehr nachweisbar (Abb. 4.20B, unten). Entsprechend zeigt sich auch keine erhöhte IgM-Konzentration im Kulturüberstand mehr, die Zellen exprimieren kein Syndecan-1 auf der Oberfläche und die Verminderung des Oberflächen-IgM ist ebenfalls nicht mehr gegeben (Abb. 4.20D). G418 selektionierte, Blimp-1 transduzierte WEHI 231 Zellen verlieren somit nach ca. 1-2 Wochen Kultur trotz nachweisbarer Blimp-1 mRNA den differenzierten Phänotyp.

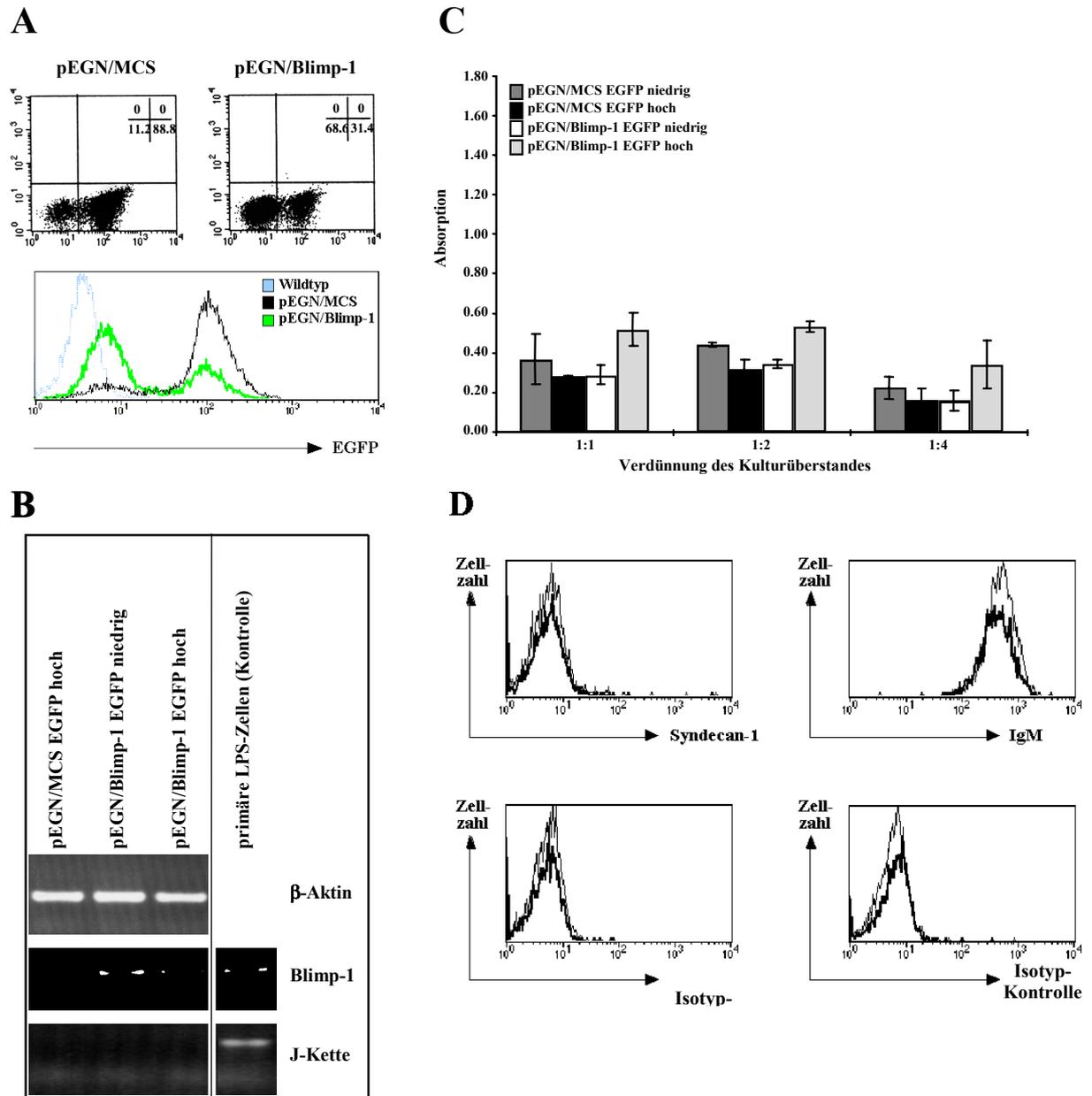


Abb. 4.20: Selektion und Langzeitkultur Blimp-1⁺EGFP⁺ WEHI 231 Zellen führt zum Verlust der Blimp-1 vermittelten Differenzierungsereignisse. (A) Selektion transduzierter Zellen mit G418 (1mg/ml). (B) Blimp-1 transduzierte, mit G418 selektionierte EGFP⁺ Zellen exprimieren Blimp-1 mRNA, aber keine J-Ketten mRNA. Blimp-1 transduzierte bzw. kontrolltransduzierte Zellen wurden in Gegenwart von G418 (1mg/ml) kultiviert, gemäß ihrer EGFP-Expression in die angezeigten Subpopulationen sortiert und Blimp-1 mRNA (Mitte) bzw. J-Ketten mRNA (unten) durch RT-PCR nachgewiesen. Die RNA primärer, mit LPS stimulierter B-Zellen wurde als Positivkontrolle verwendet. RT-PCR mit β-Aktin-spezifischen Oligonukleotiden diente als interne Kontrolle (oben). (C) Blimp-1 transduzierte, mit G418 selektionierte EGFP⁺ Zellen sezernieren nicht mehr verstärkt IgM. G418 selektionierte, wie angegeben infizierte Zellen wurden in die angezeigten Subpopulationen sortiert und in einer Konzentration von 1×10^4 Zellen/ml ausgesät. Im Kulturüberstand vorhandenes IgM wurde 2 Tage später im ELISA gemessen. (D) Blimp-1 transduzierte, mit G418 selektionierte EGFP⁺ Zellen zeigen keine verstärkte Syndecan-1 Expression bzw. verminderte sIgM Expression. Auf Blimp-1 transduzierten, G418 selektionierten EGFP hochexprimierenden Zellen (dicke Linien) bzw. Kontrollzellen (dünne Linien) wurde die Expression von Syndecan-1 bzw. sIgM

durch Flußzytometrie bestimmt. Die Spezifität der Färbungen wurde durch Parallelfärbungen mit Kontrollantikörpern gleichen Isotyps und gleicher Konjugation überprüft (unten). Die gezeigten Daten repräsentieren lebende, EGFP⁺ Zellen.

4.1.3 Zusammenfassung

Interleukin 4 (IL-4) hemmt - wie auch die Signalgebung über den BZR und über CD40 - die Expression von Blimp-1 und die Ig-Sekretion. Die Zellproliferation bleibt dagegen unbeeinflusst und der Klassensprung nach IgG1 wird induziert. IL-4 unterstützt somit den Differenzierungsweg zur Gedächtniszelle. Retrovirale Transduktion von Blimp-1 revertiert die durch IL-4, $\alpha\mu$ und anti-CD40 vermittelte Hemmung der Ig-Sekretion im LPS-System und induziert die Ig-Sekretion im LPS-freien anti-CD40-System. Hierbei unterstützt Blimp-1 sowohl die Sekretion von IgM als auch von IgG1. In Gegenwart von IL-4 wird Klassensprung nach IgG1 durch Blimp-1 gehemmt, wobei der Grad der Hemmung mit der Stärke der Blimp-1 Expression korreliert. Im anti-CD40-System sezernieren nach Transduktion von Blimp-1 allerdings erheblich weniger Zellen IgM. Möglicherweise fehlen wichtige Komponenten, die zusätzlich zu Blimp-1 für eine "high-level-secretion" benötigt werden.

Die Überexpression von Blimp-1 in WEHI 231 Zellen, einem Modellsystem unreifer B-Zellen, führt nicht nur wie von Messika et al. [106] postuliert zum Zelltod, sondern induziert ebenfalls Differenzierungsvorgänge, die für eine zur Plasmazelle differenzierende B-Zelle charakteristisch sind. Wachstumsnachteil und Zelltod sind daher neben der Ig-Sekretion auch Bestandteil dieser Blimp-1 vermittelten Differenzierung.

4.2 Auswirkung der Überexpression von Blimp-1 auf Gene, die Überleben und Proliferation von Zellen steuern

4.2.1 Ektopische Blimp-1 Expression im B-Zell-Lymphom WEHI 231

4.2.1.1 Blimp-1 vermindert die Expression von c-myc und A1, stimuliert aber die Expression von mad4

Wie unter 4.1.2.3.1 dargestellt, führt die ektopische Expression von Blimp-1 in WEHI 231 Zellen zum Zellzyklus-Arrest und zur Differenzierung. Aus diesem Grunde erfolgte die Analyse der Expression des für die Proliferation und das Überleben der WEHI 231 Zellen relevanten Proto-Onkogens c-myc [18; 150; 151] und einiger seiner potentiellen Interaktionspartner in diesem System durch Nuklease-Protektionsversuche. In einem anderen System wurde eine Blimp-1 vermittelte Verminderung der Expression von c-myc bereits beschrieben [80]. Weiterhin wurde analysiert, ob Blimp-1 die Expression von Mitgliedern der bcl-2 Familie ebenfalls beeinflusst, da bcl-2 Familienmitglieder für die Regulation der Apoptose ebenfalls von zentraler Bedeutung sind [95].

Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abb. 4.21 dargestellt. Neben der Verminderung der Expression von c-myc führt die Überexpression von Blimp-1 zu einer etwa 3-4 fachen Erhöhung der mad4 mRNA-Konzentration, während die Expression von max in geringerem Maße beeinflusst ist (Abb. 4.21A und C). Von verschiedenen experimentellen Systemen ist bekannt, dass die Induktion von Transkripten der mad-Familie und eine damit verbundene Erhöhung von Mad/Max-Komplexen auf Kosten von Myc/Max-Komplexen Differenzierungsvorgänge zu Lasten der Zellproliferation initiiert [92-94].

Bei der Analyse der Expression pro- und anti-apoptotischer Mitglieder der bcl-2 Familie zeigte sich eine deutliche Verminderung der Expression von anti-apoptotischem A1 in Blimp-1 exprimierenden WEHI 231 Zellen. Die Expression der weiteren, in diesen Analysen detektierten pro- und anti-apoptotischen Familienmitglieder war hingegen weit geringer beeinflusst.

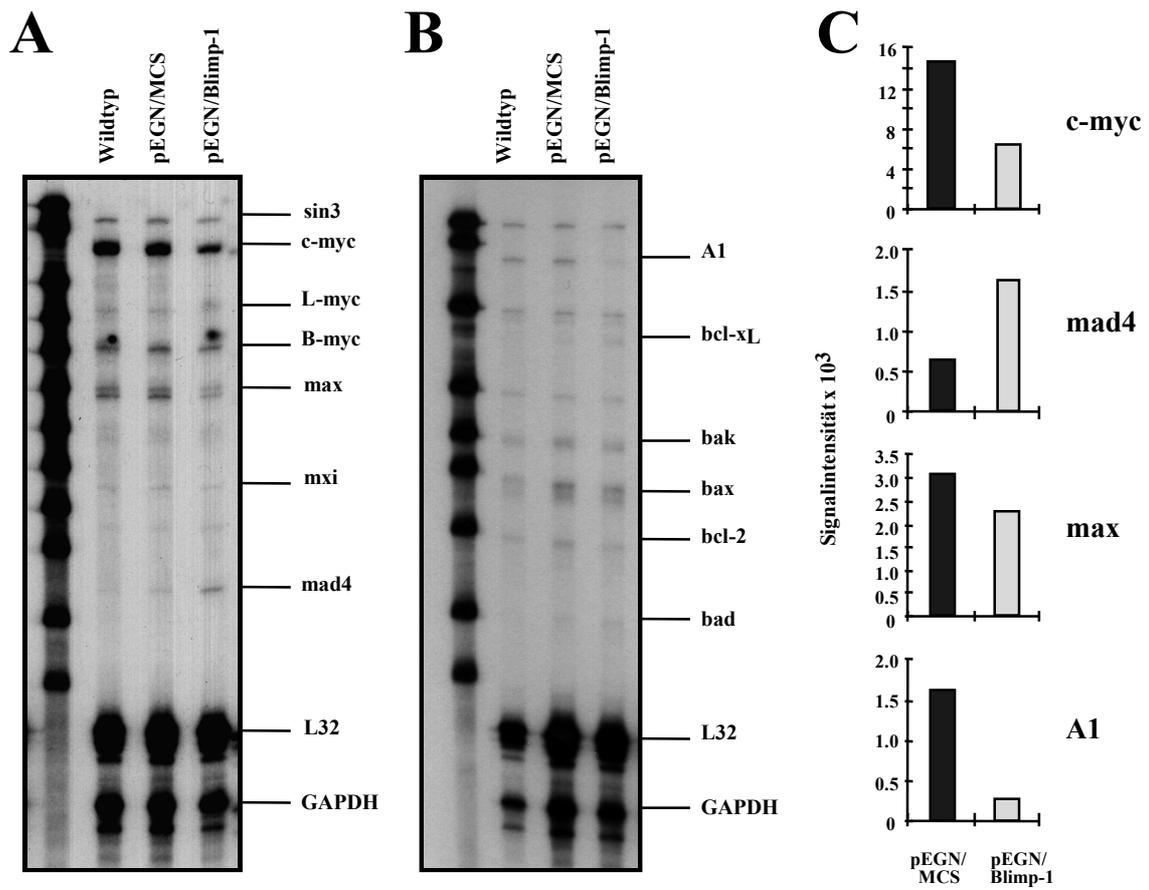


Abb. 4.21: Erhöhung der mad4 mRNA- und Erniedrigung der c-myc- und A1 mRNA Konzentrationen in Blimp-1 exprimierenden, differenzierenden WEHI 231 Zellen. WEHI 231 Zellen wurden mit rekombinanten Retroviren wie angegeben infiziert. Nach 3 Tagen wurden EGFP⁺ Zellen sortiert und die angezeigten Transkripte der Myc-Familie(A) sowie der Bcl-2 Familie (B) in 2 µg Gesamt-RNA dieser Zellen im RNase-Protektionsversuch nachgewiesen. (C) zeigt die anhand des Haushaltgens L32 standardisierte Phosphorimager-Analyse der angegebenen Gene.

4.2.1.2 Überexpression von A1 erhöht die Lebensdauer Blimp-1⁺ WEHI 231 Zellen

Zur Überprüfung, ob die Verminderung der A1-Expression durch Blimp-1 ein Grund für die Kurzlebigkeit Blimp-1⁺ WEHI 231 Zellen ist, wurden A1 überexprimierende WEHI 231 Sublinien hergestellt. Dafür wurden die Zellen mit Retroviren infiziert, die für ein Flag-markiertes A1 codieren und dessen Expression über eine IRES an ein EYFP-Zeocinresistenz-Konstrukt gekoppelt ist (pEYZ/FmA1). Als Kontrolle dienten Zellen, die nur ein retroviral eingebrachtes EYFP-Zeocinresistenz-Konstrukt exprimieren (pEYZ/MCS). Nach Selektion in Gegenwart von Zeocin und Anreicherung EYFP hochexprimierender Zellen wurden FmA1-Zellen bzw. EYFP-Kontrollzellen mit für Blimp-1 codierenden Retroviren (pEGN/MCS) oder entsprechenden Kontrollviren (pEGN/MCS) infiziert und die Auswirkungen der Blimp-1 Expression auf Proliferation und Differenzierung in diesen Zellen analysiert.

Wie aus Abb. 4.22A hervorgeht, sind in Kulturen A1 exprimierender WEHI 231 Zellen sehr viel mehr Zellen mit hoher Grünfluoreszenz als Maß der Blimp-1 Expression im Vergleich mit entsprechenden Kontrollkulturen vorhanden (15.7% gegenüber 0.3% in diesem Experiment zu diesem Zeitpunkt). Der Prozentsatz an Zellen mit mittlerer Intensität der Grünfluoreszenz ist ebenfalls um einen Faktor 5 erhöht (13.8% gegenüber 2.6%). A1⁺ Blimp-1⁺ Zellen zeigen somit einen Überlebensvorteil und tolerieren eine erhöhte Blimp-1 Expression als ihre entsprechenden Kontrollzellen.

Ein weiterer Hinweis dafür, dass in der Tat A1 der Grund für das bessere Überleben der A1⁺ Blimp-1⁺ WEHI 231 Zellen ist, zeigt sich bei der Analyse der A1 Expression in diesen Zellen: lebende A1⁺ Blimp-1⁺ doppelpositive Zellen zeigen eine 5-7 fach höhere Intensität der Gelbfluoreszenz als A1⁺ Zellen, die mit dem grünen Kontrollvektor infiziert sind, was eine Selektion von A1 hochexprimierenden Zellen durch Blimp-1 impliziert (Abb. 4.22B).

Allerdings nimmt auch in A1 exprimierenden Kulturen der Prozentsatz A1⁺ Blimp-1⁺ Zellen kontinuierlich mit der Zeit ab (Abb. 4.22C).

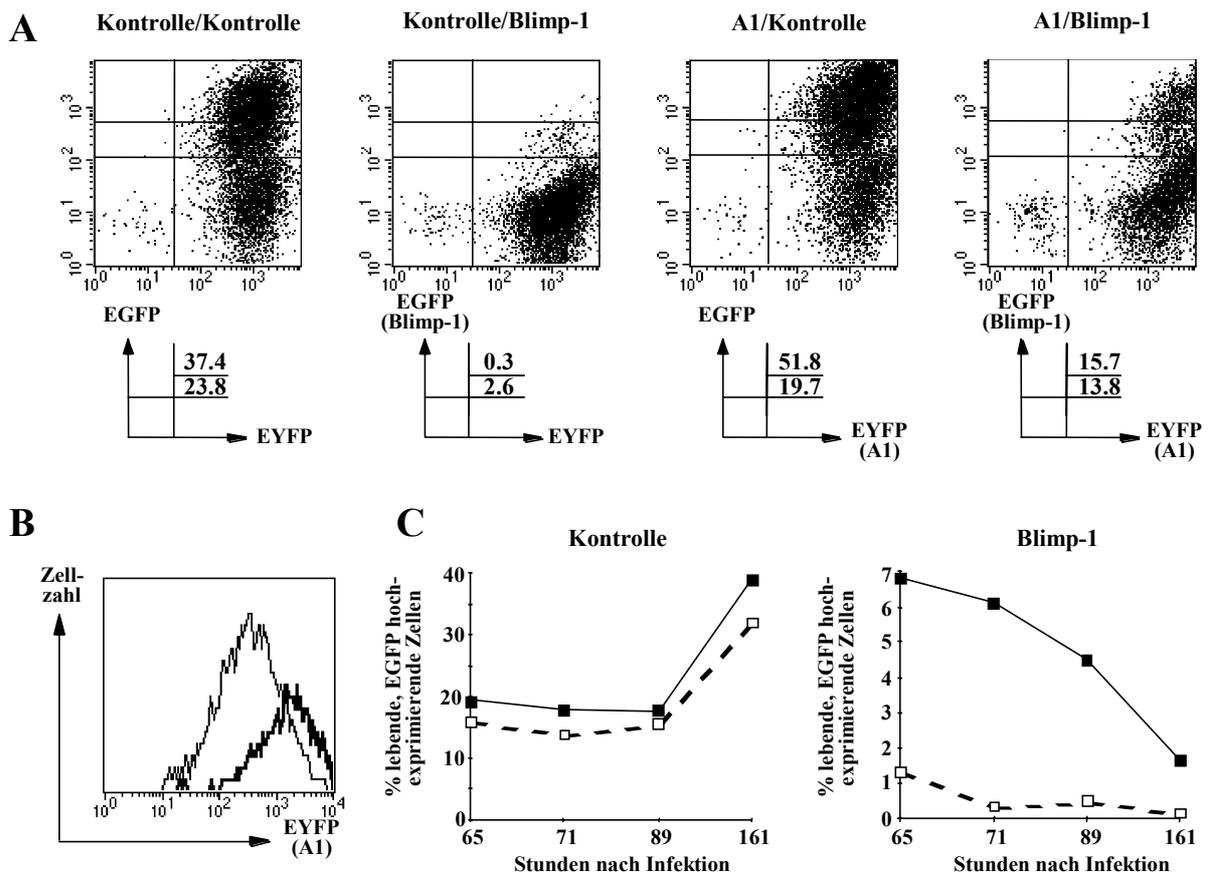


Abb. 4.22: A1 fördert das Überleben Blimp-1 exprimierender WEHI 231 Zellen. (A) Besseres Überleben von A1- und Blimp-1 koexprimierenden Zellen. A1 exprimierende Zellen (A1) bzw. entsprechende EYFP⁺ Kontrollzellen (EYFP; Kontrolle) wurden mit für Blimp-1 codierenden Retroviren (Blimp-1) oder mit nur für EGFP codierenden Kontrollviren (EGFP; Kontrolle) infiziert. Der prozentuale Anteil lebender, EYFP (A1) EGFP (Blimp-1) hochexprimierender und EYFP (A1) EGFP (Blimp-1) intermediär exprimierender Zellen wurde an Tag 3 nach Infektion durch Flußzytometrie bestimmt. (B) Selektion A1 hochexprimierender Zellen durch Blimp-1. Die Intensität der EYFP (d.h. A1)-Expression Blimp-1 transduzierter bzw. kontrolltransduzierter EYFP⁺ A1⁺ Zellen wurde an Tag 4 nach Infektion mittels Flußzytometrie analysiert. (C) Verzögerter Verlust EYFP⁺ A1⁺ EGFP^{hoch} Blimp-1^{hoch} exprimierender Zellen während der Kultur. EYFP⁺ A1⁺ Zellen (□) oder EYFP⁺ Kontrollzellen (■) wurden mit für Blimp-1 codierenden Retroviren (Blimp-1) oder mit nur für EGFP codierenden Kontrollviren (Kontrolle) infiziert. Der prozentuale Anteil lebender, EYFP (A1) EGFP (Blimp-1) hochexprimierender Zellen in den Kulturen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten durch Flußzytometrie ermittelt.

Wie in Abschnitt 4.1.2.3.1 anhand von Zellzyklusanalysen gezeigt, sind sowohl Zellzyklusarrest als auch Zelltod für den Verlust Blimp-1 exprimierender WEHI 231 Zellen in den entsprechenden Kulturen verantwortlich. Blimp-1 exprimierende WEHI 231 Zellen, die zusätzlich noch A1 exprimieren, zeigen nun zwar einen Überlebensvorteil, der allerdings nicht nicht absolut ist, da auch diese Zellen mit der Zeit in den Kulturen verlorengehen. Somit stellt sich die Frage, ob A1⁺ Blimp-1⁺ Zellen zwar im Überleben begünstigt, aber möglicherweise noch immer im Zellzyklus arretiert sind. Zur Klärung dieser Frage wurden Blimp-1 infizierte FmA1-Zellen bzw. die entsprechenden grünen (EGFP) und gelben (EYFP) Kontrollzellen zunächst sortiert und anschließend die Verteilung der verschiedenen Populationen auf die Phasen des Zellzyklus mit Propidiumjodid analysiert (Abb. 4.23).

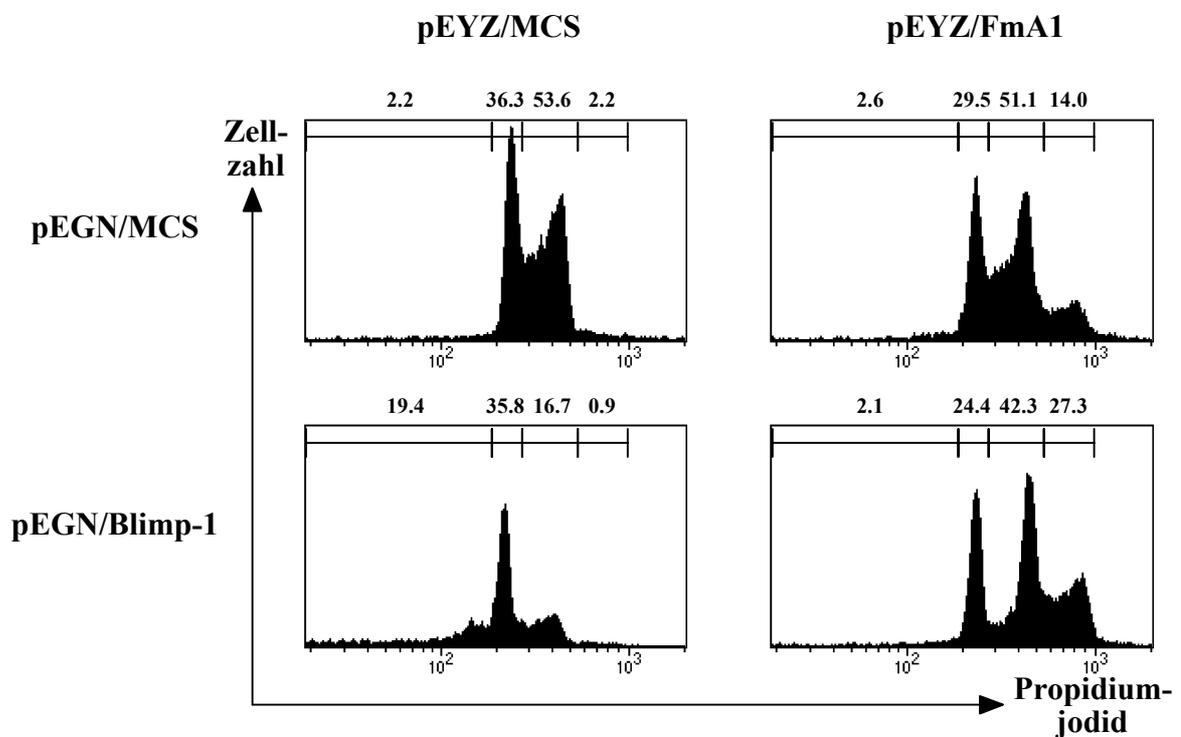


Abb. 4.23: A1 fördert das Überleben Blimp-1⁺ WEHI 231 Zellen, hebt deren Zellzyklus-Arrest aber nicht auf. A1 exprimierende Zellen (pEYZ/FmA1) bzw. entsprechende Kontrollzellen (pEYZ/MCS) wurden mit für Blimp-1 codierenden Retroviren (pEGN/Blimp-1) oder Kontrollviren (pEGN/MCS) infiziert. Zwei Tage nach Infektion wurden EYFP⁺ EGFP⁺ doppelt positive Zellen sortiert und die Verteilung der Zellen auf die Phasen des Zellzyklus in den einzelnen Subpopulationen durch Färbung mit Propidiumjodid analysiert.

Im Gegensatz zu gelben Kontrollzellen mit Blimp-1 sind innerhalb der A1 und Blimp-1 doppelt positiven Zellen kaum subdiploide, tote Zellen vorhanden (Abb. 4.23, 19.4% im Gegensatz zu 2.1%). Allerdings ist der Anteil der tetraploiden (4n) Zellen stark erhöht (16.7% im Gegensatz zu 42.3%), während sich nur wenige Zellen zwischen G1- und G2-Phase, d.h. in der S-Phase, im

Vergleich mit kontrollinfizierten Zellen (pEGN/MCS) befinden. Interessanterweise treten innerhalb der A1-exprimierenden Kulturen Zellen mit Chromosomensätzen größer $4n$ auf, deren Anteil sich nach Blimp-1 Transduktion nochmals erhöht (von hier 14% auf 27.3% innerhalb der sortierten EYFP⁺EGFP⁺ Subpopulationen). Diese Zellen sind auch größer als Zellen mit $2-4n$ und zeigen stärkere Gelbfluoreszenz und damit A1-Expression (A. W. Kuss, Dissertation, in Vorbereitung). A1 begünstigt somit das Überleben Blimp-1 exprimierender WEHI 231 Zellen, hebt aber nicht deren Proliferationsnachteil auf, so dass die Nettoabnahme dieser Zellen in den Kulturen weiterhin bestehen bleibt. Weiterhin zeigt sich anhand der A1 Blimp-1 doppelt positiven Zellen, dass Blimp-1 exprimierende WEHI 231 Zellen in G2 akkumulieren und - wenn kein rettendes A1 vorhanden ist - dann aus der G2-Phase heraus sterben. Zudem hält A1 offensichtlich Zellen mit mit Chromosomensätzen größer $4n$ am Leben, die ohne überexprimiertes A1 wahrscheinlich nicht überlebten.

4.2.1.3 Aufrechterhaltung des Blimp-1 induzierten Differenzierungszustandes bei Überexpression von A1

Wie im vorherigen Abschnitt dargestellt, begünstigt A1 das Überleben Blimp-1 exprimierender WEHI 231 Zellen. Ob nun Blimp-1 auch zur Differenzierung von A1 überexprimierenden WEHI 231 Zellen (FmA1-Zellen) führt, wurde durch Infektion von FmA1-Zellen bzw. entsprechenden Kontrollzellen mit für Blimp-1 codierenden Retroviren bzw. Kontrollviren und nachfolgender Analyse der IgM-Sekretion im ELISA und der mad4-Expression in RNase-Protektionsversuchen bestimmt.

Aus Abb. 4.24A und B geht hervor, dass Blimp-1 transduzierte WEHI 231 Zellen unabhängig von einer A1-Überexpression IgM sezernieren. In A1 überexprimierenden Kulturen war die Sekretionsaktivität sogar noch stärker ausgeprägt, was wahrscheinlich das bessere Überleben und damit die längere zur IgM-Sekretion zur Verfügung stehende Zeit dieser Zellen widerspiegelt (Abb. 4.24B, Tag 4-7 nach Infektion). Weiterhin zeigen auch A1 Blimp-1 doppelt positive Zellen als Indiz stattfindender Differenzierung die Blimp-1 induzierte Erhöhung der mad4 mRNA Konzentration (Abb. 4.24C).

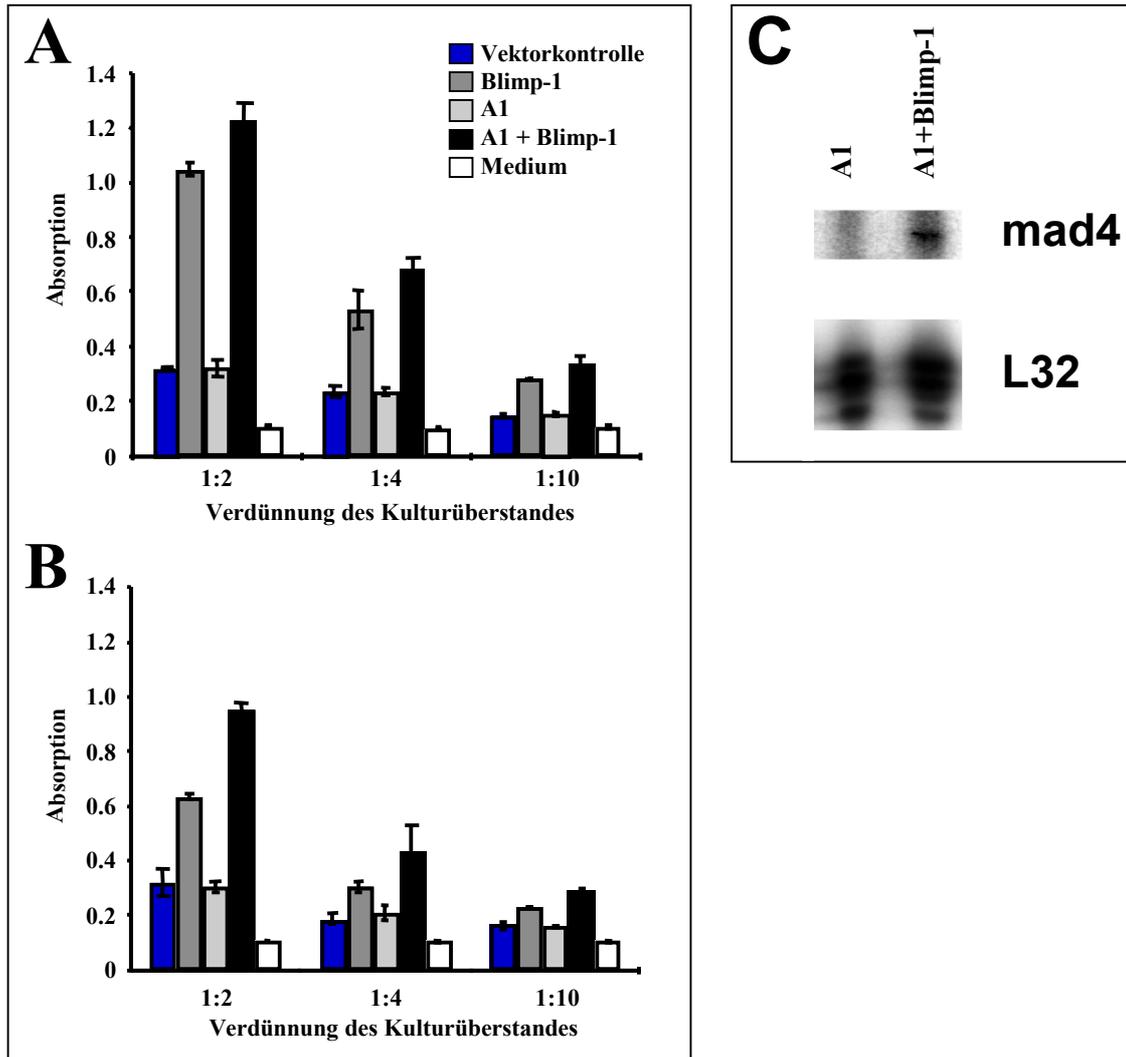


Abb. 4.24: A1⁺ Blimp-1⁺ WEHI 231 Zellen sezernieren IgM und zeigen verstärkte mad4 Expression. A1 exprimierende Zellen bzw. Kontrollzellen wurden mit für Blimp-1 codierenden Retroviren bzw. Kontrollviren wie angegeben infiziert. (A) IgM Sekretion. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 8×10^4 Zellen/ml ausgesät und im Überstand vorhandenes IgM 3 Tage später im ELISA detektiert. (B) IgM Sekretion von Tag 4-7 nach Infektion. An Tag 4 nach Infektion wurden die Zellen gewaschen und in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml ausgesät. 3 Tage später wurde im Überstand vorhandenes IgM erneut im ELISA detektiert. (C) Verstärkte Expression von mad4 in A1⁺ Blimp-1⁺ Zellen. In 3 μ g Gesamt-RNA präpariert von wie angegeben infizierten, G418 selektierten Zellen wurde mad4 mRNA durch RNase-Protektion nachgewiesen. L32 diente als interne Kontrolle.

4.2.1.4 Erhöhung der Lebensdauer Blimp-1⁺ WEHI 231 Zellen durch CD40 Ligation

Wie in den vorstehenden Abschnitten gezeigt, bewirkt die Überexpression von A1 ein besseres Überleben Blimp-1 exprimierender, differenzierender WEHI 231 Zellen. Weiterhin induziert die Signalgebung über CD40 eine Verstärkung der Expression von A1 sowohl in WEHI 231 Zellen als auch in primären B-Zellen, wie in der Arbeitsgruppe um Dr. I. Berberich gezeigt wurde [20]. Vor diesem Hintergrund ergab sich daher die Frage, ob auch ein CD40 Signal das Überleben Blimp-1 exprimierender WEHI 231 Zellen verlängern kann. Zur Klärung dieses Sachverhaltes wurden Blimp-1 transduzierte bzw. kontrolltransduzierte WEHI 231 Zellen in An- oder Abwesenheit von gegen CD40 gerichteten Antikörpern kultiviert, wobei der Zeitpunkt der Antikörpergabe variiert wurde. Der Anteil EGFP exprimierender, lebender Zellen wurde mittels Flußzytometrie bestimmt.

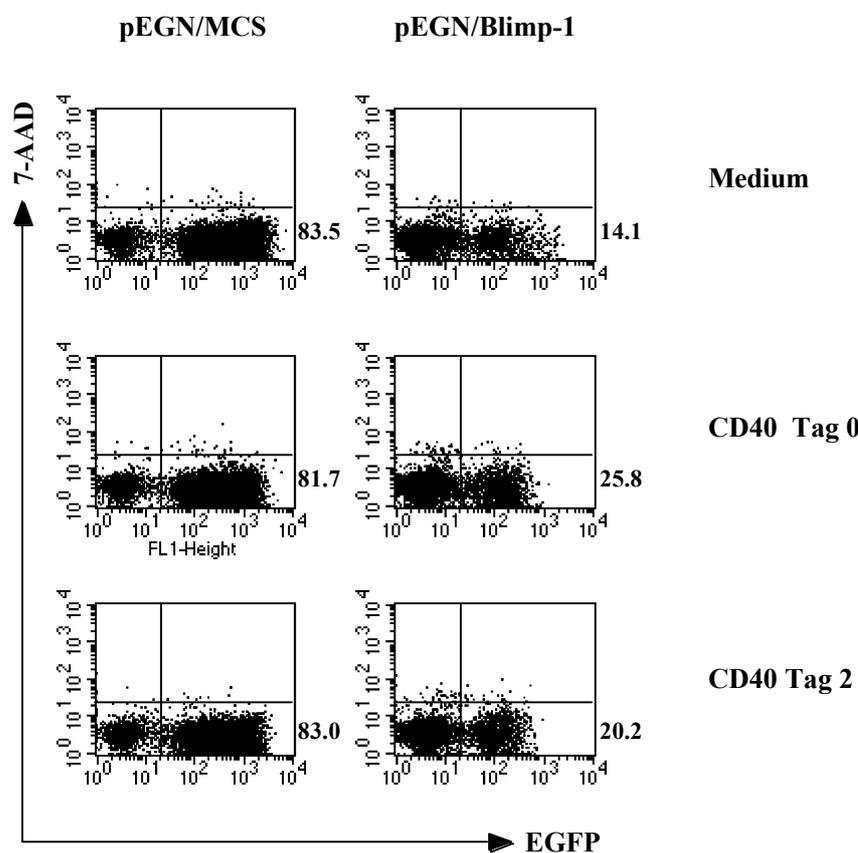


Abb. 4.25: Erhöhung der Lebensdauer Blimp-1⁺ WEHI 231 Zellen durch CD40 Ligation. Dem Medium Blimp-1 transduzierter (rechts) bzw. kontrolltransduzierter Zellen wurde anti-CD40 (10 µg/ml Endkonzentration) direkt nach Infektion (Mitte) bzw. 2 Tage nach Infektion (unten) zugegeben. An Tag 4 nach Infektion wurde der Anteil EGFP exprimierender, lebender (d.h. 7-AAD negativer) Zellen mittels Flußzytometrie bestimmt.

Wie Abb. 4.25 zeigt, ist der Anteil Blimp-1 exprimierender, EGFP⁺ WEHI 231 Zellen nach CD40 Ligation im Vergleich zur Mediumkontrolle deutlich erhöht, wobei ein CD40 Signal direkt nach Infektion den besten Schutz vermittelt (25.8% im Vergleich mit 14.1% EGFP⁺ Zellen). Liegen zwei Tage zwischen Infektion und CD40 Signal, ist der protektive Effekt zwar noch immer vorhanden, aber weniger stark ausgeprägt (20.2% gegenüber 14.1%). Der relative Anteil Blimp-1

verstärkt exprimierender Zellen, gemessen anhand der Intensität der Grünfluoreszenz, ist in Gegenwart des anti-CD40 Antikörpers ebenfalls erhöht. Eine WEHI 231 Zelle, die Signale über CD40 erhält, kann demnach mehr Blimp-1 tolerieren. Auf kontrollinfizierte Zellen hat die CD40 Ligation diesbezüglich erwartungsgemäß keinen Einfluß.

4.2.1.5 Langzeitkultur Blimp-1 transduzierter WEHI 231 Zellen führt zur Reversion des c-myc/max/mad4-Netzwerkes

Wie in Abschnitt 4.1.2.3.3 beschrieben, führt die Selektion und Langzeitkultur Blimp-1⁺ WEHI 231 Zellen zum Verlust des differenzierten Phänotyps. Vor diesem Hintergrund wurde daher auch die Expression von Mitgliedern der myc-Familie in diesen Zellen durch RNase-Protektion analysiert, um festzustellen, ob sich die nicht mehr manifeste Differenzierung im c-myc/max/mad4-Netzwerk widerspiegelt.

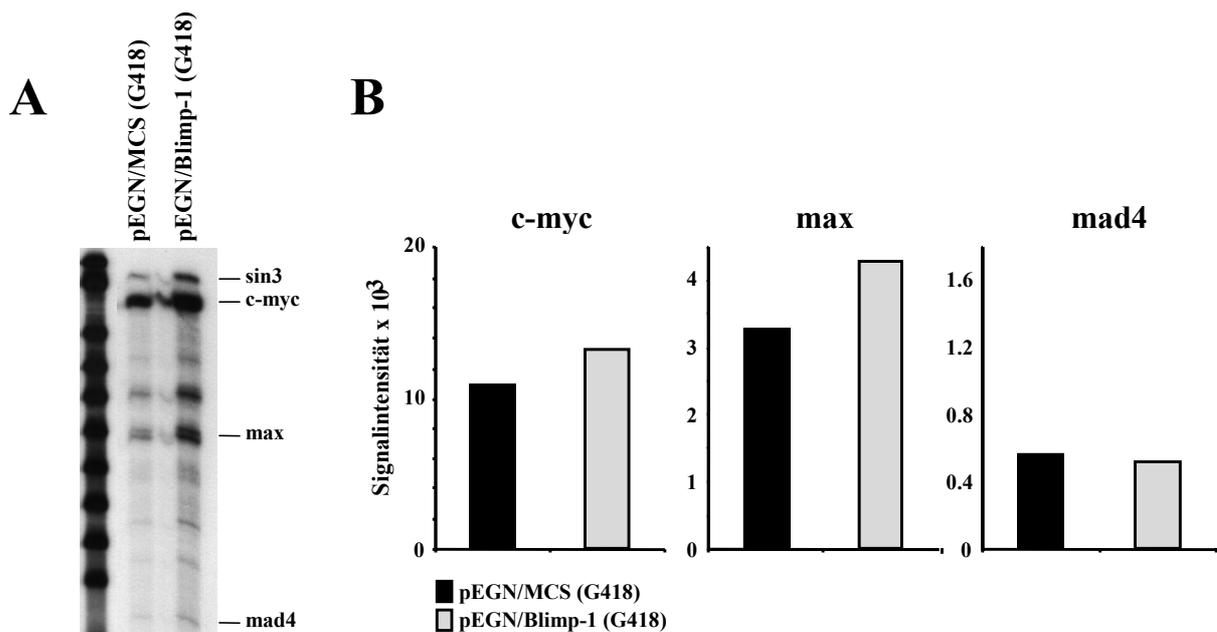


Abb. 4.26: Rückgang der mad4 Expression und Anstieg der c-myc Expression in Blimp-1⁺ WEHI 231 Zellen nach G418 Selektion und Langzeitkultur. In 2 µg Gesamt-RNA von sortierten Blimp-1⁺ EGFP⁺ Zellen (pEGN/Blimp-1) bzw. EGFP⁺ Kontrollzellen (pEGN/MCS) - kultiviert in Gegenwart von G418 (1 mg/ml) - wurden die Transkripte der myc-Familienmitglieder durch RNase-Protektion nachgewiesen (A). (B) zeigt die anhand des Haushaltsgens L32 standardisierte Phosphorimager-Analyse der angegebenen Transkripte.

Wie vermutet, zeigen diese Zellen keine Änderungen im c-myc/max/mad4-Netzwerk mehr (Abb. 4.26). Die Expression von c-myc, max und mad4 unterscheidet sich in Blimp-1 transduzierten, G418 selektierten WEHI 231 Zellen nicht mehr von derjenigen in den entsprechend selektierten Kontrollzellen und korreliert dementsprechend mit dem beobachteten, nicht differenzierten Phänotyp.

4.2.1.6 Zusammenfassung

Die Überexpression von Blimp-1 in WEHI 231 Zellen führt zu charakteristischen Änderungen im c-myc/max/mad4-Netzwerk und zum Verlust von anti-apoptotischem A1. Die Wiederherstellung der A1-Expression begünstigt das Überleben Blimp-1 exprimierender WEHI 231 Zellen, ohne allerdings ihren Proliferationsnachteil aufzuheben. Der Blimp-1 induzierte Differenzierungszustand, gemessen anhand IgM-Sekretion und mad4-Expression, wird dabei aufrechterhalten.

4.2.2 Ektopische Blimp-1 Expression in primären B-Zellen

4.2.2.1 Erhöhung der mad4 Expression nach Blimp-1 Transduktion

Wie bereits gezeigt, führt die Blimp-1 Expression in WEHI 231 Zellen zu Änderungen des für die Zellproliferation relevanten c-myc/max/mad4-Netzwerkes, bedingt durch die Verminderung der c-myc mRNA Konzentration bei gleichzeitiger Erhöhung der mad4 mRNA Konzentration. Zur Überprüfung dieser Ergebnisse in primären B-Zellen wurden LPS stimulierte bzw. LPS/IL-4 kostimierte B-Zellen mit für Blimp-1 codierenden Retroviren (pEGN/Blimp-1) oder entsprechenden Kontrollviren (pEGN/MCS) infiziert. Die RNA der infizierten, anhand ihrer EGFP-Expression sortierten Zellen wurde anschließend in RNase-Protektionsversuchen analysiert.

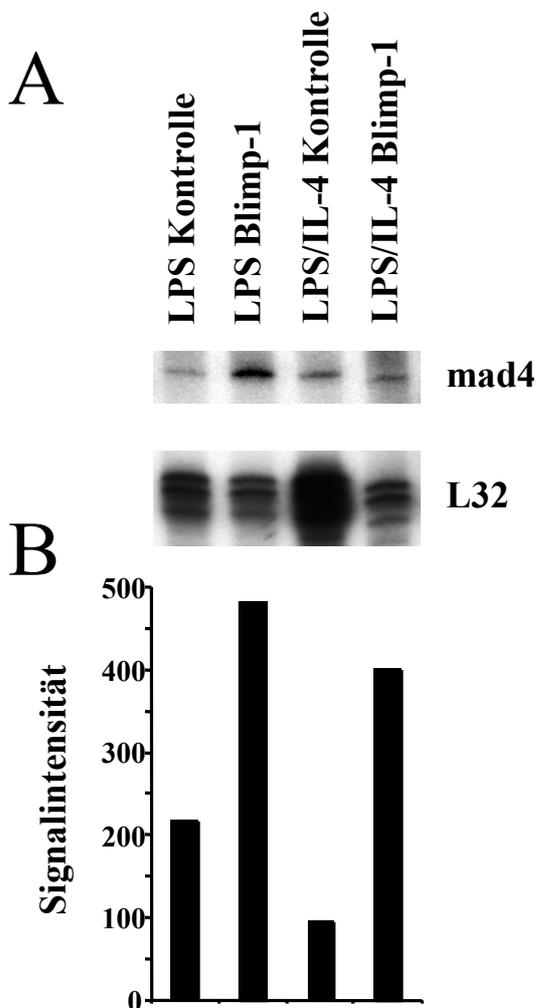


Abb. 4.27: Erhöhung der mad4 mRNA-Konzentration in Blimp-1 exprimierenden, primären B-Zellen. Ruhende, primäre B-Zellen wurden mit LPS in An- und Abwesenheit von IL-4 stimuliert, an Tag 2 der Kultur mit rekombinanten Retroviren wie angegeben infiziert und EGFP⁺ Zellen 3 Tage später sortiert. In 5 µg Gesamt-RNA dieser Zellen wurden mad4 mRNA-Transkripte im RNase-Protektions-versuch nachgewiesen (A), wobei L32 als interne Kontrolle diente. (B) zeigt die anhand des Haushaltgens L32 standardisierte Phosphorimager-Analyse.

Abb. 4.27 zeigt eine strenge Korrelation der Expression von *mad4* und Blimp-1. In kontrollinfizierten LPS-Zellen, die auch Blimp-1 exprimieren, ist eine deutliche *mad4*-Expression nachweisbar (Spur 1). In Gegenwart von IL-4 ist die Expression von Blimp-1 in entsprechend kontrollinfizierten Zellen unterdrückt (vgl. 4.1.1.1), und diese Zellen zeigen auch die geringste Konzentration von *mad4* mRNA (Spur 3). Wird die Blimp-1 Expression durch Infektion mit entsprechenden Retroviren forciert, so zeigt sich sowohl in LPS stimulierten als auch in LPS/IL-4 kostimulierten Zellen eine starke Erhöhung der *mad4* Expression (Spuren 2 und 4). Die in WEHI 231 Zellen beobachtete und in einem anderen System von Lin et al. [80] beschriebene, deutliche Verminderung der Expression von *c-myc* zeigte sich nach Transduktion von primären LPS- bzw. LPS/IL-4-Blasten allerdings nicht (Daten nicht gezeigt).

4.2.2.2 Verminderung der A1-Expression nach Transduktion von Blimp-1

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass das im WEHI 231 System erhaltene Ergebnis der Induktion von *mad4* durch Blimp-1 auch auf primäre B-Zellen übertragen werden kann. Ob die Verminderung der A1-Expression durch Blimp-1 in primären Zellen ebenfalls Gültigkeit besitzt, wurde im folgenden überprüft. Hierfür wurden wiederum LPS stimulierte bzw. LPS/IL-4 kostimulierte B-Zellen mit entsprechenden Retroviren infiziert, EGFP⁺ Zellen sortiert und die RNA dieser Zellen in RNase-Protektionsversuchen analysiert.

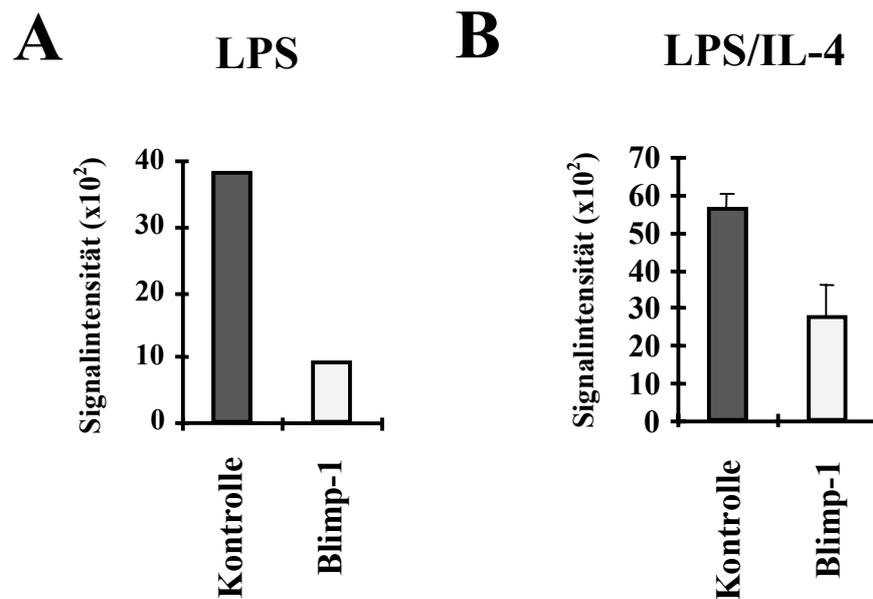


Abb. 4.28: Erniedrigung der A1 mRNA-Konzentration in Blimp-1 exprimierenden, primären B-Zellen. Ruhende, primäre B-Zellen wurden mit LPS stimuliert (A) bzw. mit LPS/IL-4 kostimuliert (B), an Tag 2 der Kultur mit rekombinanten Retroviren wie angegeben infiziert und EGFP⁺ Zellen 2-3 Tage später sortiert. In 2-3 μ g Gesamt-RNA dieser Zellen wurden A1 mRNA-Transkripte im RNase-Protektionsversuch nachgewiesen, wobei L32 als interne Kontrolle diente. Dargestellt ist die anhand des Haushaltsgens L32 standardisierte Phosphorimager-Analyse.

Es zeigte sich, dass Blimp-1 in primären Zellen ebenfalls zu einer Verminderung der A1 Expression führt (Abb. 4.28), der Grad der Verminderung hängt dabei allerdings von der Stimulation der Zellen ab. In mit LPS stimulierten, Blimp-1 superinfizierten Zellen ist A1 kaum noch detektierbar (Abb. 4.28A), während die Reduktion der A1 Expression in LPS/IL-4 kostimulierten Zellen zwar vorhanden, aber weniger stark ausgeprägt ist (Abb. 4.28B).

Hierbei muß allerdings berücksichtigt werden, dass IL-4 selbst die Expression von A1 im LPS-System verstärkt, wie der Vergleich von LPS stimulierten B-Zellen wildtypischer und IL-4 transgener Tiere in An- bzw. Abwesenheit von exogenem IL-4 verdeutlicht (Abb. 4.29).

Die verminderte Expression von A1 führt bei Blimp-1 positiven, primären Zellen allerdings nicht zu dem im WEHI 231-System beobachteten, raschen Zellverlust (Daten nicht gezeigt). Primäre B-Zellen besitzen möglicherweise zusätzliche Überlebensmoleküle oder eine andere Zusammensetzung dieser, so dass ein Verlust von schützendem A1 kompensiert werden kann.

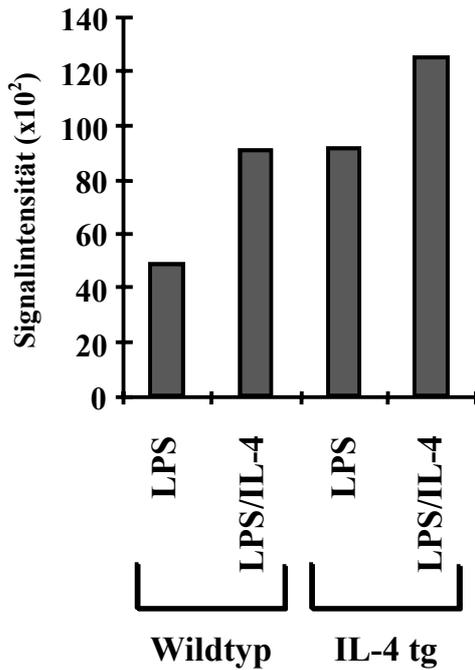


Abb. 4.29: IL-4 unterstützt die Expression von A1 in LPS stimulierten, primären B-Zellen. Ruhende B-Zellen wildtypischer oder IL-4 transgener Mäuse wurden mit LPS in An- bzw. Abwesenheit von zusätzlichem, exogenem IL-4 stimuliert. Nach 3 Tagen wurden A1 mRNA-Transkripte in 4-5 μg Gesamt-RNA durch RNase-Protektion nachgewiesen. Dargestellt ist wiederum die anhand des Haushaltsgens L32 standardisierte Phosphor-imager-Analyse.

4.3.2.4 Zusammenfassung

Im Vergleich mit WEHI 231 Zellen zeigen Blimp-1 exprimierende primäre B-Zellen ebenfalls eine verstärkte Expression von mad4 sowie eine verminderte Expression von A1. Die Verminderung der A1-Expression ist dabei in LPS/IL-4 kostimulierten Zellen weniger stark ausgeprägt, wobei IL-4 selbst die Expression von A1 im LPS-System stimuliert. Der bei WEHI 231 Zellen vorhandene Wachstums- und Überlebensnachteil Blimp-1⁺ Zellen zeigt sich bei primären Zellen in diesem System jedoch nicht. Im beobachtbaren Kulturzeitraum (Tage 4-7 der Kultur, d.h. Tage 2-5 nach Infektion) ergeben sich keine signifikanten Änderungen des prozentualen Anteils EGFP⁺ B-Zellen (Daten nicht gezeigt).

5. Diskussion

5.1 Blimp-1 als zentraler Integrator von Signalen, die das Zellschicksal beeinflussen

Die vorliegende Arbeit bekräftigt die Bedeutung des Transkriptionsfaktors Blimp-1 für die terminale B-Zell-Differenzierung zu Ig-sezernierenden Plasmazellen. Sie wird unter anderem dadurch unterstrichen, dass die Regulation der terminalen Differenzierung durch diverse Stimuli über Suppression oder Induktion von Blimp-1 erfolgt. So wird die Expression von Blimp-1 durch Signalgebung über den BZR [104] und CD40 [50] unterdrückt. Als weiteres, Blimp-1 unterdrückendes Signal konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit IL-4 identifiziert werden. Alle diese Signale sind während der frühen Phase der späten B-Zell-Differenzierung von besonderer Bedeutung und werden als die Differenzierung zur Gedächtniszelle unterstützend betrachtet [14; 49; 50; 59]. Im Keimzentrum hat daher der Gedächtniszell-Differenzierungsweg Priorität, solange die Zelle kein Signal zur terminalen Differenzierung erhält. Auch im verwendeten in vitro Differenzierungssystem zeigen beispielsweise mit LPS und $\alpha\mu\text{F(ab}')_2$ kostimulierte B-Zellen einen Gedächtniszell-assoziierten Phänotyp, charakterisiert als Syndecan-1^{niedrig} HSA^{niedrig} I γ 1 sterile Transkripte⁺ (Schliephake, D., Dissertation und [104]; vgl. auch Knödel, M., Diplomarbeit). Der Zusatz von IL-4 erhöht den Anteil an Syndecan-1^{niedrig} HSA^{niedrig} Zellen in LPS und in LPS/ $\alpha\mu$ -Kulturen noch weiter (vgl. 4.1.1.4). Es wirkt daher ebenfalls der Generierung von Zellen mit Plasmazell-Phänotyp entgegen. Weiterhin induziert IL-4 auch im verwendeten System den Klassensprung nach IgG1, wie unter 4.1.1.6 dargestellt und früher beschrieben [41; 42; 45-47].

Die Induktion von Blimp-1 als Differenzierungsinitiator kann ebenfalls durch verschiedene Signale erfolgen. Turner et al. [30] zeigten, dass IL-2 und/oder IL-5 die Expression von Blimp-1 in BCL1 Lymphomzellen bewirken und zu deren Differenzierung führen. Auch in primären B-Zellen führen diese Zytokine zur Induktion von Blimp-1, so dass die BZR vermittelte Hemmung der Ig-Sekretion aufgehoben wird [104]. Gleiches konnte in der hier vorgelegten Arbeit für die durch IL-4 vermittelte Hemmung der Blimp-1 Expression und der Ig-Sekretion im LPS-System gezeigt werden. Neben der Reversion eines gehemmten LPS-Systems sind IL-2 und IL-5 jedoch auch in der Lage, Blimp-1 und damit Ig-Sekretion in primären Zellen zu induzieren, die über CD40 - d.h. in Abwesenheit von LPS - stimuliert sind. Die Stimulation primärer Zellen über CD40 führt zur Proliferation [157; 158; 186], aber nicht zur Sekretion, da CD40 Signale die Expression von Blimp-1 nicht induzieren, sondern sogar hemmen können [50; 187].

Als weiteres Blimp-1 induzierendes Signal wurde im Humansystem die Interaktion von CD27 auf B-Zellen mit seinem Liganden CD70 identifiziert. In humanen B-Zellen bewirkt diese eine verstärkte Expression von PRDI-BF1 sowie die gesteigerte Sekretion von IgE nach Stimulation mit

anti-CD40 und IL-4 [152]. CD27 gehört zur TNF-Rezeptor-Familie und wird auf B- und T-Zellen exprimiert [153], CD70 ist dementsprechend ein Mitglied der TNF-Familie und ist u.a. auf aktivierten CD4⁺ CD45RO⁺ T-Zellen vorhanden [154; 155]. Auch CD38 in Kombination mit IL-5 wurde in diesem Zusammenhang als die Expression von Blimp-1 positiv in peritonealen B-Zellen regulierend diskutiert [156].

Es zeigt sich also ein wiederkehrendes Prinzip: Signale, die Proliferation und/oder Überleben der Zelle unterstützen, verhindern gleichzeitig deren Differenzierung. Hierfür scheint Blimp-1 eine zentrale Regulationsstelle zu sein. Die Signalgebung über den BZR oder CD40 ist alleine schon ausreichend, B-Zellen in den Zellzyklus eintreten zu lassen [157-159]. IL-4 alleine führt zwar nicht zur Zellproliferation [185; 188], wirkt aber beispielsweise zusammen mit CD40 Signalen synergistisch [158]. Auch fördern alle drei Stimuli das Überleben der Zelle. Für BZR-Signale ist beispielsweise eine Verstärkung der Expression von bcl-xL und die Induktion von FAIM als Schutz vor Fas vermittelter Apoptose gezeigt [24; 25; 28]. CD40 Signale führen zur Erhöhung der Expression der antiapoptotischen Bcl-2 Familienmitglieder A1 und bcl-xL [20]. Auch IL-4 induziert in B Zellen einen Schutz vor Fas vermittelter Apoptose [27], möglicherweise ebenfalls über FAIM in Abhängigkeit von Stat6 [Rothstein, T., Vortrag Keystone Symposium "B lymphocyte biology and disease", Taos 1999]. Zusammen mit BZR-Signalen hat es möglicherweise synergistische Effekte bezüglich der bcl-xL Expression [28], und in primären LPS-Blasten ist in Gegenwart von IL-4 mehr A1 mRNA nachweisbar (vgl. 4.2.2.2).

5.2 Förderung der Sekretion von Nicht-IgM-Isotypen durch Blimp-1

Im Rahmen der Untersuchung von Signalen, die die Expression von Blimp-1 manipulieren, wurde noch ein anderer, wichtiger Aspekt deutlich. Blimp-1 ist nicht nur für die Sekretion von IgM von zentraler Bedeutung, es fördert auch die Sekretion späterer Ig-Isotypen. Im vorliegenden Fall konnte die Sekretion von IgG1 sowohl durch IL-2 und IL-5 als auch direkt durch transduziertes Blimp-1 erheblich gesteigert werden. In Gegenwart von klassensprung-induzierendem IL-4 war die Steigerung sowohl im LPS-System als auch im anti-CD40 System vorhanden. Diese Daten stimmen mit den Ergebnissen von Angelin-Duclos et al. [192] überein, die Blimp-1 für die Plasmazell-Differenzierung während einer T-Zell-abhängigen Immunantwort als von zentraler Bedeutung beschreiben und auch Plasmazellen, die sekundäre Immunglobulin-Isotypen sezernieren, als Blimp-1⁺ identifizieren. Dies ist insofern von Bedeutung, da Soro et al. [105] eine unterschiedliche Bedeutung von Blimp-1 im Rahmen T-Zell-unabhängiger (simuliert im LPS System) und T-Zell-abhängiger Plasmazell-Differenzierung (simuliert im anti-CD40 System) postulieren. Sie ziehen ihren Schluß aus der Tatsache, dass die durch einen Th2-Zellklon induzierte Sekretion von IgG1 primärer B-Zellen nach Stimulation über CD40 nicht durch

Oligonukleotide hemmbar ist, die gegen Blimp-1 mRNA gerichtet sind. Im Gegensatz dazu blockieren diese Oligonukleotide aber die Sekretion von IgM und IgG nach LPS Stimulation. Wie in den Abschnitten 4.1.1.9 und 4.1.2.2.1 dargestellt, sezernieren anti-CD40/IL-4 kostimulierten Zellen allerdings nur sehr wenig IgM und IgG1. Entsprechend ist auch nur sehr wenig Blimp-1 mRNA nachweisbar. Möglicherweise ist diese basale Sekretion von IgG1 unabhängig von Blimp-1 und damit auch nicht durch antisense-Blimp-1 Oligonukleotide hemmbar, sie wird allerdings durch verstärkte Expression von Blimp-1 sehr wohl gesteigert. Auch Nagumo et al. [152] diskutieren PRDI-BF1 als von positiver Bedeutung für die verstärkte IgE-Sekretion anti-CD40/IL-4 kostimulierter humaner B-Zellen nach CD27 Ligation.

5.3 Synergismus zwischen Blimp-1 und weiteren Transkriptionsfaktoren

Wie bereits dargestellt, führt die Transduktion primärer B-Zellen mit Blimp-1 zur Ig-Sekretion. Dabei ist allerdings von Bedeutung, wie die Zellen stimuliert waren. Während die Ig-Sekretion in einer durch $\alpha\mu$, anti-CD40 oder IL-4 gehemmten LPS-Kultur nach Transduktion von Blimp-1 mindestens zu 50% - verglichen mit der LPS-Referenzkultur - wiederhergestellt wurde, erreichten anti-CD40 stimulierte Blimp-1⁺ EGFP⁺ B-Zellen nur ca. 10% des LPS-Vergleichswertes. Die Untersuchung der Expression weiterer Transkriptionsfaktoren ergab eine verminderte Expression von Bob-1 und Oct-2 in Abwesenheit von LPS. Dies könnte insofern von Bedeutung sein, als dass Oct-2 von zentraler Bedeutung für die Aktivität der Immunglobulin-Promotoren betrachtet wird [149; 160]. Oct-2 bindet an konservierte Sequenzen (Oktamer-Motive) sowohl im Enhancer der schweren Ig-Kette als auch in den Promotoren der schweren und leichten Ig-Kette [161; 162]. Interessanterweise ist auch in Zelllinien, die späte Entwicklungsstadien einer B-Zelle repräsentieren, mehr Oct-2 mRNA vorhanden als in Zelllinien, die frühe Entwicklungsstadien darstellen [163]. Daher erscheint es möglich, dass die Blimp-1 und Oct-2 synergistisch im Hinblick auf die Ig-Sekretion wirken. Während Blimp-1 als Mastergen die gesamte Zelle auf Sekretion und Differenzierung umschaltet, könnte Oct-2 gezielt die Transkription der Ig-Ketten verstärken und damit die Synthese von Immunglobulin-Molekülen unterstützen. Weniger Oct-2 könnte diesbezüglich in CD40 stimulierten, Blimp-1 exprimierenden B-Zellen ein limitierender Faktor sein. Zur Überprüfung dieser Theorie sind weitere Experimente nötig. Eine erste Antwort könnte beispielsweise die ektopische Expression von Blimp-1 und Oct-2 in anti-CD40 stimulierten B-Zellen geben, da die Expression von Oct-2 nach CD40-Stimulation zu späten Zeitpunkten stärker beeinflusst als diejenige von Bob-1 erscheint.

In diesem Zusammenhang ergab die Analyse der Expression von mit Oct-2 interagierenden Bob-1 [127], einem u.a. für die Keimzentribildung essentiellen Transkriptionsfaktor [164], dass diese nach Aktivierung der B-Zelle ansteigt, und zwar sowohl in An- als auch in Abwesenheit von LPS.

In Anwesenheit von LPS scheint die Expression von Bob-1 allerdings schneller anzusteigen, wie die Analyse früher Zeitpunkte verdeutlicht. Zu späten Zeitpunkten bestehen zwar ebenfalls Expressionsunterschiede nach unterschiedlicher Stimulation der B-Zellen, sie lassen sich aber zu diesen Zeitpunkten nicht so deutlich in Übereinstimmung mit der unterschiedlichen Sekretionseffizienz nach Blimp-1 Transduktion bringen, wie dies für Oct-2 der Fall ist. So wurde beispielsweise in LPS/ $\alpha\mu$ stimulierten Zellen und anti-CD40 stimulierten Zellen eine nahezu vergleichbare Bob-1 Expression gemessen, wobei die Ig-Sekretion in LPS/ $\alpha\mu$ Blimp-1⁺ Kulturen - im Gegensatz zu anti-CD40 Blimp-1⁺ Kulturen - zu mindestens 60% wiederhergestellt ist. Diese Daten passen sehr gut mit den Befunden von Qin et al. [165] zusammen, die beschreiben, dass Signale über den BZR, CD40 und IL-4R synergistisch Bob-1 positiv regulieren. Das sind genau diejenigen Signale, die die Expression von Blimp-1 hemmen und die Gedächtniszell-Differenzierung, d.h. Keimzentrumsbildung, unterstützen. Allerdings ist durchaus wahrscheinlich, dass eine etwas verminderte Expression von Bob-1 doch Auswirkungen hat, da Bob-1 mit Oct-2 interagiert - d.h. beide Faktoren synergistisch wirken - und sich daher mehrere kleine Einzeleffekte aufsummieren könnten.

Bezüglich der Auswirkung von Pax-5/BSAP auf die unterschiedliche Sekretionseffizienz verschieden stimulierter B-Zellen nach Blimp-1 Transduktion legen vorläufige Daten eine untergeordnete Rolle nahe. Die Analyse früher Zeitpunkte (Tage 2 und 3 nach Stimulation) ergab keine Unterschiede im Expressionsmuster (nicht gezeigt). Zur endgültigen Klärung des Sachverhaltes sind jedoch noch umfangreichere Analysen nötig, die auch auf spätere Zeitpunkte ausgedehnt werden müssen.

5.4 Molekulare Auswirkung der Expression von Blimp-1

Auf molekularer Ebene manifestiert sich ebenfalls die Balance zwischen Proliferation und Überleben auf der einen und Blimp-1 vermittelter, terminaler Differenzierung auf der anderen Seite. Lin et al. [80] identifizierten Blimp-1 als den im c-myc Promotor bindenden "plasmacytoma repressor factor" und beschrieben Blimp-1 somit als transkriptionellen Repressor von c-myc. c-myc ist daher das erste bekannte, direkte Zielgen von Blimp-1. Der Gegensatz Proliferation-Differenzierung zeigt sich hier direkt an einem zentralen Regulator der Zellproliferation. Auch für WEHI 231 Zellen liegt dieser Sachverhalt nahe: Die Expression von Blimp-1 führt zur Differenzierung der Zellen auf Kosten der Proliferation und des Überlebens, begleitet von einer deutlichen Verminderung der Expression von c-myc. c-myc ist für die Proliferation und das Überleben von WEHI 231 Zellen essentiell [18; 87], seine Überexpression führt allerdings zum Zelltod im WEHI 231 System (Berberich, I., nicht veröffentlichte Ergebnisse). Interessanterweise zeigen mit G418 selektionierte Blimp-1⁺ WEHI 231 Zellen wieder eine normale c-myc Expression

bei gleichzeitigem Verlust des differenzierten Phänotyps. Dies unterstützt das Modell der Unvereinbarkeit von Proliferation und Differenzierung, da nur Zellen wachsen dürfen, die der Blimp-1 induzierten Differenzierung "entkommen sind". Denkbar wäre beispielsweise, dass ein gewisser Schwellenwert von Blimp-1 zur irreversiblen Initiation der Differenzierung überschritten werden muß und eben dies in diesen Zellen nicht der Fall war. Alternativ konnten diese Zellen gegenregulatorische, die Differenzierung unterdrückende, Mechanismen auf transkriptioneller oder translatorischer Ebene aktiviert haben.

Allerdings konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Proliferationsnachteil zumindest teilweise vom Überlebensnachteil im WEHI 231-Differenzierungsmodell entkoppelt werden, da Blimp-1 auch antiapoptotische Moleküle negativ reguliert. Blimp-1 vermindert die Expression von A1 sowohl in WEHI 231 Zellen als auch in primären Zellen. Die ektopische Expression von A1 in Blimp-1⁺ WEHI 231 Zellen fördert entsprechend deren Überleben, führt aber nicht zur Aufhebung ihres Proliferationsnachteiles. A1⁺ Blimp-1⁺ WEHI 231 Zellen zeigen noch immer einen Zellzyklus-Arrest, und A1 scheint die Expression relevanter Myc-Familienmitglieder auch nicht zu beeinflussen (A. W. Kuss, Dissertation und [20]). Für CD40 Signale konnte gezeigt werden, dass sie eine Verstärkung der A1 Expression in WEHI 231 Zellen und primären B-Zellen bewirken [20]. In Übereinstimmung mit diesen Befunden können Blimp-1 exprimierende WEHI 231 Zellen sowohl durch Überexpression von A1 als auch durch CD40 Signale länger am Leben gehalten werden. CD40 Signale regulieren gleichzeitig aber wiederum Blimp-1 negativ. Analog führt IL-4 in primären LPS-Blasten zu verstärkter Expression von A1, hemmt jedoch diejenige von Blimp-1.

In primären Zellen ist die Situation allerdings komplizierter als im WEHI 231 Modell, da primäre Zellen nach Transduktion von Blimp-1 ebenfalls Plasmazell-Differenzierungsmerkmale zeigen, aber nicht in dem Maße wie WEHI 231 Zellen absterben. Im beobachtbaren Kulturzeitraum (Tage 4-7 der Kultur, d.h. Tage 2-5 nach Infektion) ergeben sich keine so signifikanten Änderungen des prozentualen Anteils EGFP⁺ B-Zellen, wie es bei WEHI 231 Zellen der Fall ist (Daten nicht gezeigt). Blimp-1 führt zwar auch zur Erniedrigung der A1 Expression in primären B-Zellen, die aber offensichtlich kompensiert werden kann. Ein mögliches antiapoptotisches Molekül, das in diesem Zusammenhang von Bedeutung sein könnte, ist bcl-xL. Bcl-xL ist in WEHI 231 Zellen nahezu überhaupt nicht vorhanden ([20] und Feoktistova, L., persönliche Mitteilung). In primären Zellen ist es aber stärker als in WEHI 231 Zellen exprimiert und bislang deutet alles darauf hin, dass es durch Blimp-1 nicht negativ beeinflusst wird. Weiterhin ist beschrieben, dass bcl-xL durch BZR- und CD40-Signale positiv reguliert wird [20; 24] und gemeinsam mit BZR-Signalen hat IL-4 möglicherweise ebenfalls synergistische Effekte bezüglich der bcl-xL Expression [28]. Eine Beteiligung weiterer antiapoptotischer Moleküle ist natürlich ebenfalls möglich.

Auch bezüglich der Expression von c-myc scheint die Situation in primären Zellen komplizierter, da sich eine vergleichbare Abnahme der Expression durch Blimp-1, wie sie in WEHI 231 Zellen beobachtet und von Lin et al. [80] beschrieben wurde, zumindest im überprüften LPS- und LPS/IL-4-System nicht zeigte. Die mit den Blimp-1 vermittelten Differenzierungsprozessen einhergehende Verstärkung der mad4 Expression war allerdings trotzdem vorhanden, so dass der mögliche Differenzierungsmechanismus erhalten bleibt (siehe 5.6). Diese Befunde unterstützen die fundamentale Rolle von Blimp-1 für die terminale Differenzierung, zeigen aber ebenso, dass weitere Faktoren zusätzlich von Bedeutung sein müssen.

Sowohl die Expression von proliferationsinduzierendem c-myc und antiapoptotischem A1 sind auf transkriptioneller Ebene als NF-kB abhängig beschrieben worden [18]. Im WEHI 231 Lymphom ist c-myc außerdem auch für das Überleben der Zelle notwendig [76; 87]. Interessanterweise sind es genau diese beiden Gene, deren Expression durch Blimp-1 im WEHI 231 System vermindert wird. Dies wirft die Frage auf, ob eine etwaige negative Regulation der Aktivität des NF-kB Systems durch Blimp-1 bei der verminderten Expression von c-myc und A1 eine Rolle spielt. Zur endgültigen Klärung dieser Fragestellung sind sicherlich weitergehende Untersuchungen mit NF-kB abhängigen Reporterkonstrukten nötig. Gegen eine Beteiligung des NF-kB Systems spricht, dass Blimp-1 durch direkte Bindung im c-myc Promotor dessen Aktivität hemmen kann [80]. Analog existieren im A1 Promotor zwei DNA-Motive mit hoher Homologie zum Blimp-1 Bindemotiv des c-myc Promotors (Berberich, I., persönliche Mitteilung), an die Blimp-1 prinzipiell binden kann, wie Präzipitationsversuche innerhalb der Arbeitsgruppe um Dr. I. Berberich mit spezifischen Oligonukleotiden zeigen. Die funktionelle Bindung von Blimp-1 im A1 Promotor und eine damit verbundene negative Regulation desselben ist bislang allerdings nicht gezeigt. Auf der anderen Seite könnte das NF-kB System doch insofern von Bedeutung zu sein, dass die A1 Expression von c-Rel, einer Komponente des NF-kB Systems, abhängig ist [22; 166]. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass CD40 Signale in WEHI 231 Zellen sowohl NF-kB [167] als auch A1 [20] positiv regulieren und auch das Überleben Blimp-1⁺ WEHI 231 Zellen unterstützen, erscheint eine Beteiligung von NF-kB durchaus möglich. Formal gezeigt ist dieser Sachverhalt bislang allerdings nicht. Zudem besteht natürlich die Möglichkeit, dass beide Komponenten - direkte Hemmung und Modulation von NF-kB - von Bedeutung sind und daher ein Synergismus besteht.

Wie unter 4.1.2.2.3 und 4.1.2.3.2 dargestellt, führt die Expression von Blimp-1 zum Verlust von B7.2 (CD86) auf der Zelloberfläche primärer B-Zellen als auch auf WEHI 231 B-Lymphomzellen. Blimp-1 exprimierende, terminal differenzierende B-Zellen verlieren daher die Möglichkeit zur Kostimulation von T-Zellen. Dies erscheint unter dem Aspekt, dass Plasmazellen "nur Antikörper-Produktionsfabriken" sein sollen und sich demnach nicht mehr als antigenpräsentierende Zellen an der Immunantwort beteiligen sollen, auch durchaus sinnvoll.

An B7.2 defizienten Mäusen ist weiterhin gezeigt, dass B7.2 wichtig für die Bildung von Keimzentren und die Produktion sekundärer Ig-Isotypen ist [168]. Die negative Regulation der Expression von B7.2 durch Blimp-1 wäre somit auch als Beitrag zu sehen, das Differenzierungsprogramm der Zelle von Gedächtniszelle auf Plasmazelle umzuschalten. In Übereinstimmung mit dieser Theorie konnte in der vorliegenden Arbeit weiterhin gezeigt werden, dass Blimp-1 auch den durch IL-4 induzierten Klassensprung nach IgG1 hemmt.

Die Ergebnisse von Rathmell et al. [169] lassen allerdings noch eine weitere Spekulation zu: Sie zeigen, dass die Unterdrückung der B-7.2 Expression auf peripheren, toleranten B-Zellen notwendig ist, um diese Fas abhängig zu eliminieren und damit einer Autoimmunreaktion vorzubeugen. Übertragen auf die vorliegende Arbeit könnte die Blimp-1 vermittelte Erniedrigung der B7.2 Expression dazu beitragen, die nicht dauerhaft benötigte Plasmazelle vorbereitend für die Apoptose zu sensitivieren.

5.5 Pax-5 als möglicher Gegenspieler zu Blimp-1

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der für die Proliferation reifer B-Zellen nach Aktivierung als wichtig beschrieben ist, ist Pax-5/BSAP ([122], vgl. auch 1.4.4). Es wird weiterhin als die Differenzierung zur Gedächtniszelle fördernd betrachtet [170]. Übereinstimmend nimmt die Expression der meisten Pax-5 Isoformen in terminal differenzierenden B-Zellen ab [115]. In BSAP überexprimierenden B-Zelllinien ist die Plasmazellbildung beeinträchtigt, so dass die Verminderung der Pax-5 Expression eine Voraussetzung für die terminale Differenzierung scheint [124]. Vor diesem Hintergrund wäre es daher möglich, dass reziprok Blimp-1 die Expression von Pax-5 vermindert. Zumindest in differenzierenden WEHI 231 Zellen wird die Expression von CD19, welche als direkt abhängig von Pax-5 beschrieben ist [116; 120; 121], durch Blimp-1 allerdings nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Der vorläufige Stand der Untersuchungen argumentiert daher - unter Vorbehalt - wenigstens in WEHI 231 Zellen eher gegen eine negative Beeinflussung von Pax-5 durch Blimp-1. Zur endgültigen Klärung dieser Frage sind allerdings umfassendere Untersuchungen mit direktem Nachweis von BSAP nötig, die auch auf andere zelluläre Systeme als WEHI 231 Zellen ausgeweitet werden müssten. Aufgrund der gegensätzlichen Bedeutungen von Pax-5 und Blimp-1 für die späte B-Zell-Differenzierung sollten diese Daten allerdings nicht unerwähnt bleiben. Umgekehrt ist es aber sehr gut möglich, dass die Blimp-1 initiierte Plasmazell-Differenzierung auch in WEHI 231 Zellen durch Pax-5 (negativ) beeinflusst wird. WEHI 231 Zellen sind CD19⁺ Pax-5⁺ (Knödel, M., Diplomarbeit) und somit würde aufgrund einer nicht verminderten Pax-5 Expression in Analogie zu Usui et al. [124] keine

"high level secretion" durch Blimp-1 erreicht werden. Zudem wird die J-Kette durch Pax-5 negativ reguliert [171], die aber wiederum für eine effiziente Sekretion von IgM nötig ist.

5.6 Argumente gegen einen Blimp-1 abhängigen, absoluten Kontrollpunkt

Die Untersuchung der Auswirkung von Blimp-1 im WEHI 231 System ist noch hinsichtlich eines zweiten Aspektes von Bedeutung. Messika et al. [106] postulierten unterschiedliche Wirkungen von Blimp-1 in Abhängigkeit des Reifungsstadiums der B-Zelle. So könnten vollständig aktivierte B-Zellen mit Hilfe von Blimp-1 weiter zur Plasmazelle differenzieren, wohingegen Blimp-1 in unreiferen Entwicklungsstadien zum Tod der Zelle führe. Wie die vorliegende Arbeit zeigt, führt die Expression in WEHI 231 Zellen, einem Modellsystem unreifer B-Zellen [172], aber nicht sofort zum Tod der Zelle, sondern induziert den Phänotyp kurzlebiger Plasmazellen. Blimp-1⁺ WEHI 231 Zellen sezernieren IgM, zeigen ein geändertes Verhältnis zwischen sezernierter und membranständiger Form der μ -Kette und exprimieren die J-Kette. Weiterhin zeigen sie eine erhöhte Oberflächenexpression des Plasmazellmarkers Syndecan-1 bei gleichzeitiger Verminderung des Oberflächen-IgM. Zellzyklus-Arrest und Blimp-1 induzierter Zelltod sind daher als Teil des Differenzierungsprogrammes zu werten. Auch die Tatsache, dass das Überleben Blimp-1⁺ WEHI 231 Zellen durch ektopische Expression von A1 bei Aufrechterhaltung des differenzierten Phänotyps verlängert wird, unterstützt diese Interpretation. Gleichzeitig legt es die Vermutung nahe, dass die Lebensdauer einer Plasmazelle durch Manipulation der Expression von antiapoptischen Molekülen verlängerbar ist. Die Langlebigkeit einer Subpopulation Ig-sezernierender Plasmazellen im Knochenmark [54-56; 173; 174] könnte somit auf eine wie auch immer bewirkte Aufrechterhaltung der A1 Expression in Gegenwart von Blimp-1 zurückzuführen sein. Inzwischen wurden auch diese langlebigen Plasmazellen von Angelin-Duclos et al. [192] als Blimp-1⁺ beschrieben. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass neben A1 weitere antiapoptische Moleküle involviert sind.

5.7 Wirkungsmechanismus von Blimp-1 und die Rolle von mad4

Zum jetzigen Zeitpunkt werden mehrere Möglichkeiten diskutiert, wie Blimp-1 wirkt. Dabei ist allen gemeinsam, dass die Hemmung der Transkription diverser Gene - entsprechend solcher, die die Nicht-Differenzierung, d.h. Proliferation und Überleben, unterstützen - durch Blimp-1 ein zentraler Bestandteil der von Blimp-1 induzierten Differenzierung zur Plasmazelle ist. Die Frage ist daher, welcher Mechanismus der Blimp-1 vermittelten Transkriptionshemmung zugrunde liegt. Denkbar sind diesbezüglich sowohl aktive als auch passive, kompetitive Mechanismen.

Ein aktivier Mechanismus wurde von Yu et al. [107] im murinen System und Ren et al. [110] im Humansystem identifiziert. Yu et al. [107] zeigten, dass Histon-Deacetylierung an der Hemmung

der c-myc Expression zumindest beteiligt ist. Blimp-1 kann demnach über zwei Domänen direkt mit Histon-Deacetylasen 1 und 2 (HDAC1/2) interagieren. Blimp-1-HDAC-Komplexe binden in vitro an das Blimp-1-Motiv des c-myc Promotors und führen zur Deacetylierung des Histons H3. Histon-Deacetylierung und die damit einhergehende Änderung der Nukleosomenstruktur wird derzeit generell als wichtiger Mechanismus der Transkriptionshemmung betrachtet. Allerdings postulieren Yu et al. weitere Mechanismen der Blimp-1 abhängigen Transkriptionshemmung, da eine Blockade der Histon-Deacetylaseaktivität mit Trichostatin A (TSA) nicht ausreichend ist, die Hemmung des c-myc Promotors durch Blimp-1 vollständig zu revertieren. Weiterhin sind Blimp-1 Deletionsmutanten, die noch Domänen für die Interaktion mit den HDACs besitzen, nicht in der Lage, die c-myc Promotoraktivität in dem Maße wie wildtypisches Blimp-1 zu hemmen.

Ren et al. [110] zeigten für PRDI-BF1, dem humanen Blimp-1 Homolog, dass die Interaktion von PRDI-BF1 mit transkriptionellen Korepressoren der Groucho-Proteinfamilie und Rekrutierung dieser zum β -Interferonpromotor notwendig für dessen Hemmung ist. Proteine der Groucho-Familie fungieren als eukaryotische Korepressoren [175], wobei für die Groucho-vermittelte Transkriptionshemmung mehrere Mechanismen – von Histon-Deacetylasen abhängig und unabhängig - beschrieben sind [189; 190; 191]. Auch in Hefen werden aufgrund von Homologien zwischen Groucho und einem generellen transkriptionellen Repressor der Hefe, Tup1 [176; 177], wiederum Histone als Angriffspunkt betrachtet: Tup-1 interagiert im Komplex mit anderen Komponenten direkt mit den Histonen H3 und H4 und beeinflusst damit die Chromatinstruktur [178]. Allerdings ist auch die Möglichkeit einer direkten Wechselwirkung von Tup-1 mit Komponenten der generellen Transkriptionsmaschinerie beschrieben [179; 180].

Beide bislang diskutierten, aktiven Mechanismen der transkriptionellen Hemmung durch Blimp-1/PRDI-BF1 schließen allerdings passive Mechanismen, d.h. die Kompetition von Blimp-1/PRDI-BF1 mit transkriptionellen Aktivatoren um Promotor-Bindungsstellen, nicht aus. Im Falle des β -Interferonpromotors bindet PRDI-BF1 beispielsweise an eine Sequenz, die auch von Transkriptionsaktivatoren der IRF ("interferon regulatory factor")-Familie erkannt wird [110; 181]. Die Blimp-1 Bindungssequenz im c-myc Promotor ist zwar ebenfalls sehr ähnlich zu diesen sog. ISRE ("interferon-stimulated response element")-Motiven, in B-Zell-Linien wurde bislang allerdings kein anderes an dieses Element bindendes Molekül außer Blimp-1 identifiziert [107; 182].

Die vorliegende Arbeit beschreibt nun einen allgemeineren, indirekten Mechanismus einer Blimp-1 bewirkten Transkriptionshemmung, die mit der Differenzierung zur Plasmazelle einhergeht. Blimp-1 selbst hemmt hierbei nicht, sondern stimuliert die Expression von mad4 sowohl in WEHI 231 Zellen als auch in primären B-Zellen. Im B-Zell-Lymphom wird die verstärkte mad4-

Expression noch von einer verminderten c-myc Expression begleitet. Somit ist folgende Situation denkbar: Blimp-1 führt zu einer Verschiebung im c-myc/max/mad-Netzwerk von proliferationsfördernden c-Myc/Max-Komplexen zu differenzierungsassoziierten Mad/Max-Komplexen. Wie unter 1.4.1 beschrieben, binden Mad/Max-Heterodimere u.a. an die gleichen regulatorischen DNA-Sequenzen wie Myc/Max-Heterodimere, unterdrücken aber die Transkription unter Einbeziehung von Histon-Deacetylasen und damit Änderung der Nukleosomenstruktur. Aufgrund der vorliegenden Daten könnte Blimp-1 der zentrale Initiator dieses Systems sein. Differenzierung aufgrund der Inhibition von Myc-abhängigen, proliferationsfördernden Genen durch Mad1/Max-Komplexe ist bereits für Granulozyten [92], Monozyten [93] und Erythroleukämiezellen [94] beschrieben. Eine wichtige Funktion des c-myc/max/mad-Netzwerkes für Proliferation, Differenzierung und Apoptose in B-Zellen wurde bereits von Melchers [29] diskutiert. In diesem Fall übernehme mad4 in B-Zellen die Rolle von mad1 in den oben genannten Zellsystemen. Weiteren Aufschluß über die Bedeutung dieses Sachverhaltes für die terminale Differenzierung könnten Experimente bringen, in denen die Auswirkungen einer Überexpression von mad4 auf Proliferation, Differenzierung und Überleben von B-Zellen untersucht werden.

Zusammengefaßt ist es wahrscheinlich die Kombination mehrerer Mechanismen, die die B-Zelle zur Plasmazelle differenzieren lassen. Blimp-1 erscheint hierbei als die zentrale Schaltstelle, die die Zelle von Proliferation auf Differenzierung umschaltet. Für diesen Prozeß ist die Änderung der Nukleosomenstruktur durch Histon-Deacetylierung wahrscheinlich von entscheidender Bedeutung, da Blimp-1 direkt mit Histon-Deacetylasen wechselwirkt, diese über Groucho-Korepressoren rekrutieren kann und zusätzlich auch Mad/Max-Heterodimere zur Rekrutierung von Histon-Deacetylasen führen.

5.8 Modellvorstellung

Nach den vorliegenden Daten dieser Arbeit ergibt sich abschließend folgendes Modell der späten B-Zell-Differenzierung (Abb.5.1): Nach Aktivierung durch Antigen und T-Zell-Hilfe durchläuft die B-Zelle eine Proliferationsphase. Die meisten Signale während dieser frühen Phase, die die B-Zelle aufgrund der vorhandenen Rezeptoren bekommt (über BZR, CD40 und IL-4R), unterstützen Proliferation und Überleben bei gleichzeitiger Unterdrückung der terminalen Differenzierung durch Unterdrückung der Expression von Blimp-1. Die nun aktivierte und klonal expandierte B-Zelle exprimiert dann zusätzliche Rezeptoren wie diejenigen für IL-2 und IL-5. Eine Signalgebung über diese Rezeptoren würde nun die Differenzierung zur Plasmazelle ermöglichen. Allerdings bestimmt die Summe aller Signale und deren Integration auf molekularer Ebene, ob die Zelle jetzt Blimp-1 exprimiert oder nicht. Die Expression von Blimp-1 führt zur irreversiblen Initiation des terminalen Differenzierungsprogrammes und damit zur IgM-sezernierenden Plasmazelle als früher Quelle niederaffiner Antikörper. Führt die Summe aller Signale jedoch zur Nicht-Expression von Blimp-1, durchläuft die B-Zelle den Gedächtniszell-Differenzierungsweg. Dieser hat daher Priorität, solange die Zelle kein Blimp-1 induzierendes Signal zur terminalen Differenzierung erhält. Entsprechend der Mikroumgebung des Keimzentrums finden nun somatische Hypermutationen sowie der Klassensprung statt. Weiterhin exprimiert die B-Zelle noch weitere kostimulatorische Moleküle wie CD27, deren Quervernetzung ebenfalls positiv auf die Blimp-1 Expression wirken würde. Die B-Zelle durchläuft nun einen weiteren Kontrollpunkt, an dem wiederum die Summe aller Signale und deren Integration auf molekularer Ebene bestimmt, ob es zur Expression von Blimp-1 kommt oder nicht. Wird Blimp-1 gebildet, differenziert die B-Zelle irreversibel zur Plasmazelle, die nun höheraffine Antikörper der sekundären Isotypen (IgG, IgA, IgE) sezerniert. Wird Blimp-1 durch Nicht-Induktion oder Unterdrückung weiterhin nicht exprimiert, differenziert die Zelle weiter zur ruhenden Gedächtniszelle.

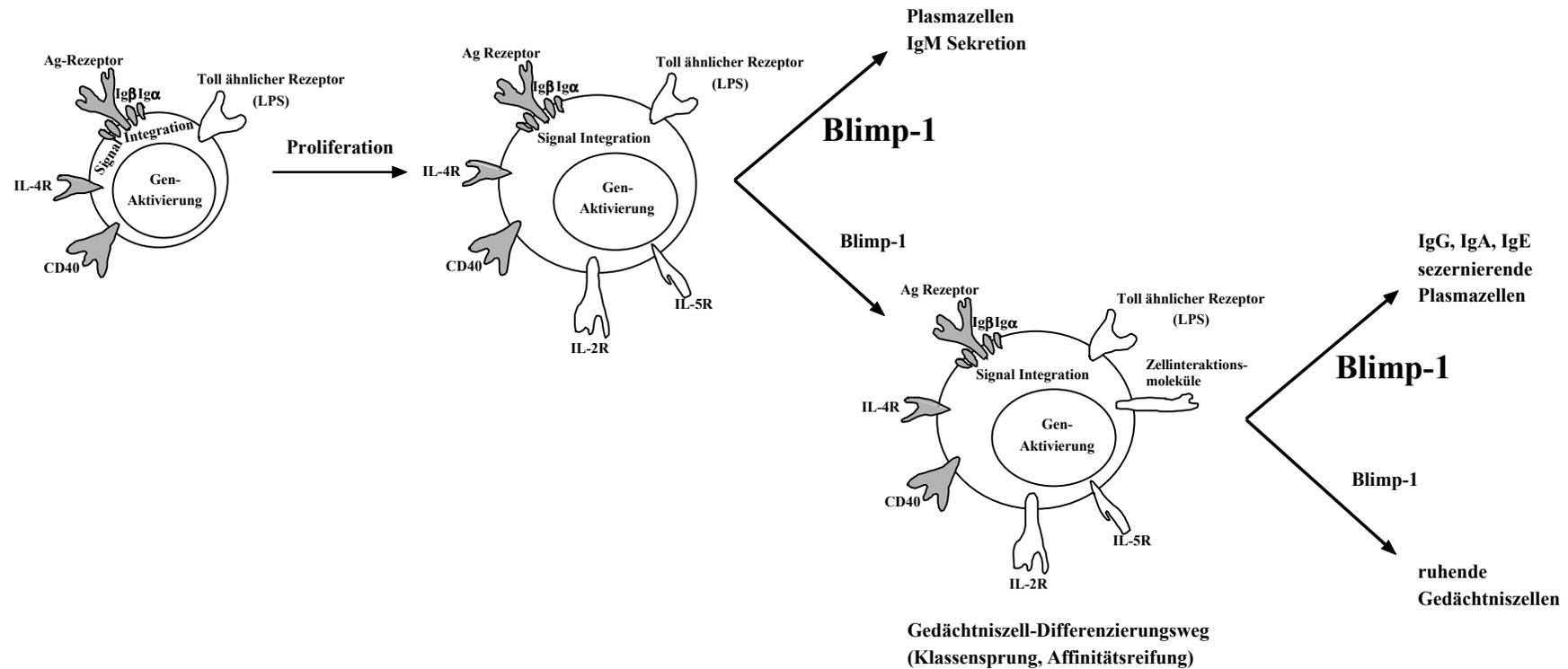


Abb. 5.1: Vereinfachtes Modell der späten B-Zell-Differenzierung. Blimp-1 fungiert als zentraler Integrator diverser Signale, die das weitere Schicksal der B-Zelle beeinflussen. Nähere Erläuterungen im Text.

6. Zusammenfassung

Gegenstand der hier vorliegenden Arbeit ist die Regulation der terminalen B-Zell-Differenzierung durch den Zink-Finger Transkriptionsfaktor Blimp-1 („B lymphocyte-induced maturation protein 1“). Nach Aktivierung differenzieren B-Zellen entweder direkt zu IgM sezernierenden Plasmazellen oder treten in den Differenzierungsweg zur Gedächtniszelle ein, der sowohl durch die Affinitätsreifung als auch den Klassensprung zu sekundären Immunglobulin-Isotypen gekennzeichnet ist. Welchen Weg die B-Zelle durchläuft, ist abhängig von der Intensität und der Dauer des BZR-Signals, von der Verfügbarkeit und der Art der T-Zell-Hilfe und von weiteren Signalen in der speziellen Mikroumgebung des Keimzentrums. Der Transkriptionsfaktor Blimp-1 wird als ein „Mastergen“ der terminalen B-Zell-Differenzierung betrachtet und ist in der Lage, die komplexen Differenzierungsprozesse zu Ig-sezernierenden Plasmazellen auszulösen und voranzutreiben. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit identifizieren Blimp-1 als wichtigen Regulator, der bestimmt, ob eine B-Zelle zur Plasmazelle oder zur Gedächtniszelle differenziert. Unter Verwendung ruhender, primärer B-Zellen der Maus, die *in vitro* mit Interleukin-4 (IL-4), anti- μ F(ab')₂ oder anti-CD40 in verschiedenen Kombinationen sowohl in An- als auch in Abwesenheit von LPS stimuliert wurden, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die IgM-Sekretion und die Expression von Blimp-1 durch Signalgebung über den BZR oder CD40 und durch IL-4 entweder nicht induziert oder sogar unterdrückt wird. Die Zugabe von IL-2 und IL-5 induziert die Expression von Blimp-1 und erleichtert die Sekretion von IgM und IgG1 in diesem System. Gleiches kann durch direkte Transduktion der B-Zellen mit rekombinanten Retroviren erreicht werden, die für Blimp-1 codieren. Auf der anderen Seite wird der durch IL-4 induzierte Klassensprung nach IgG1 durch Blimp-1 gehemmt. Blimp-1 bewirkt daher ein Umschalten des B-Zell-Differenzierungsweges von der Gedächtniszelle zur Plasmazelle. Die Unterdrückung der Expression von Blimp-1 sowohl durch Antigen-BZR-Wechselwirkungen als auch durch die von T-Helferzellen abhängige Signalgebung über CD40 und IL-4 unterdrückt die terminale Differenzierung zur Plasmazelle und ist für den Eintritt und das Durchlaufen des Gedächtniszell-Differenzierungsweges notwendig.

Zur Identifikation von Genen, deren Expression durch Blimp-1 direkt oder indirekt beeinflusst wird, wurde Blimp-1 in WEHI 231 B-Lymphomzellen unter Verwendung rekombinanter Retroviren überexprimiert. Messika et al. [106] zeigten, dass die Überexpression von Blimp-1 in B-Lymphomzellen in Abhängigkeit vom Reifungsstadium der Zelle entweder einen Wachstumsnachteil, gefolgt vom Zelltod, induziert oder zur terminalen Differenzierung führt. Obwohl WEHI 231 Zellen unreife, d.h. sIgM⁺ B-Zellen repräsentieren, exprimieren Blimp-1 transduzierte WEHI 231 Zellen die J-Kette, zeigen eine erhöhte Konzentration der für die sekretorische Form der μ -Kette codierenden mRNA, exprimieren den Plasmazellmarker Syndecan-

1 auf ihrer Oberfläche und sezernieren für kurze Zeit IgM. Diese Differenzierungsprozesse gehen allerdings mit einem Wachstumsnachteil und Zellzyklus-Arrest, gefolgt vom Zelltod, einher. Blimp-1 exprimierende WEHI 231 Zellen zeigen somit den Phänotyp kurzlebiger Plasmazellen. Eine Langzeitkultur Blimp-1⁺ WEHI 231 Zellen führt zum Verlust des differenzierten Phänotyps, d.h. der Erhalt IgM-sezernierender WEHI 231 Zellen ist nicht ohne weitere Maßnahmen möglich.

Auf molekularer Ebene hemmt Blimp-1 die Expression von c-myc und diejenige des antiapoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedes A1, stimuliert aber die Expression von mad4. Die Verschiebung des Verhältnisses von Myc/Max- zu Mad/Max-Heterodimeren zugunsten von Mad/Max-Komplexen und die daraus resultierende Inhibition der Transkription von Myc-abhängigen, proiliferationsfördernden Genen ist in vielen Systemen als von zentraler Bedeutung für die Initiation von Differenzierungsprozessen beschrieben [92-94] und wurde auch bereits für B-Zellen diskutiert [29]. Auch in primären B-Zellen führt Blimp-1 zu einer verstärkten Expression von mad4.

Wird der durch Blimp-1 bewirkte Verlust der Expression von A1 durch dessen Überexpression in Blimp-1⁺ WEHI 231 Zellen kompensiert, so überleben diese Zellen wieder erheblich länger, bleiben aber weiterhin im Zellzyklus arretiert. Der differenzierte Phänotyp, charakterisiert durch die verstärkte Expression von mad4 und der Sekretion von IgM, wird dabei aufrechterhalten. Wachstumsnachteil und Zelltod können in diesem System daher entkoppelt werden. In primären Zellen führt Blimp-1 ebenfalls zur Erniedrigung der A1 Expression. Da diese Zellen aber nicht in dem Maße wie WEHI 231 Zellen absterben, kann der Verlust von A1 offensichtlich besser kompensiert werden. Die Lebensdauer einer Blimp-1⁺ Plasmazelle ist somit durch Manipulation der Expression von antiapoptotischen Molekülen wie A1 verlängerbar.

7. Summary

Blimp-1 (“B lymphocyte-induced maturation protein 1”) is a zinc-finger containing transcription factor that drives B-cell terminal differentiation to immunoglobulin-secreting plasma cells. Following stimulation, primary B cells either directly undergo terminal differentiation to IgM secreting plasma cells, thus providing a rapidly established source of neutralizing antibodies, or enter the memory pathway characterized by affinity maturation and isotype switching. Which of the various fates is adopted by the B cells is determined by the strength and the duration of the BCR-signal, the availability and the quality of T cell help and other signals derived from the microenvironment of the germinal center. High rate secretion is correlated with endogenous Blimp-1 levels and can be caused by ectopic expression of Blimp-1, suggesting that Blimp-1 is a master gene which is able to initiate and maintain the complex terminal differentiation program. Using cultures of resting primary mouse B cells stimulated *in vitro* in various combinations with interleukin-4 (IL-4), anti- μ F(ab')₂ or anti-CD40 in the absence or presence of LPS, it is shown that IgM secretion and the expression of Blimp-1 is either not induced or even suppressed by BCR or CD40 ligation and by IL-4. Additional treatment with IL-2 and IL-5 induces Blimp-1 expression and facilitates IgM and IgG1 secretion, which can also be achieved by retroviral transduction of Blimp-1. In contrast, the increase in sIgG1⁺ cells with time in presence of IL-4 is greatly diminished in cells forced to express Blimp-1, suggesting that Blimp-1 inhibits further class-switching. Therefore, Blimp-1 expression takes B cells out of the memory pathway and initiates the terminal differentiation program. On the other hand, suppression of Blimp-1 by antigen-BCR interaction and T helper cell dependent CD40 and IL-4 signalling is necessary to facilitate entrance into the memory pathway and to prevent terminal differentiation.

To identify genes whose expression is influenced by Blimp-1, WEHI 231 B lymphoma cells were retrovirally transduced with Blimp-1. Overexpression of Blimp-1 in B lymphoma cells has been reported to induce either growth arrest and cell death or immunoglobulin secretion and terminal differentiation, depending on the developmental stage of the recipient lymphomas [106]. Surprisingly, Blimp-1 transduced immature WEHI 231 cells produce J chain, increased levels of the secretory form of μ heavy chain mRNA, express the plasma cell marker syndecan-1 on their surface and secrete IgM for a short period of time. Concomitantly, they exhibit a distinct growth disadvantage with cell cycle arrest, followed by cell death. Thus, Blimp-1⁺ WEHI 231 cells acquire the phenotype of short-lived plasma cells. However, this differentiated phenotype of Blimp-1⁺ WEHI 231 cells was transient and not longer observed after long term culture.

On the molecular level, Blimp-1 transduced WEHI 231 cells exhibit altered ratios of c-myc/mad4 mRNA levels and a reduction in the expression of the anti-apoptotic bcl-2 family member A1. It is known from several experimental systems that induction of transcripts of the mad family and therefore a change in favor of mad/max rather than myc/max complexes favors differentiation over proliferation [92-94]. An important role for the myc/max/mad network in B cell proliferation, differentiation and apoptosis has recently been discussed by Melchers [29]. The upregulation of mad4 expression by Blimp-1 is also observed in primary B cells.

To determine whether A1 down-regulation is causally involved in the short live span of Blimp-1⁺ WEHI 231 cells, sublines overexpressing A1 were established by retroviral transduction. Additional ectopic expression of A1 greatly extends the life span of Blimp-1 expressing WEHI 231 cells but does not overcome their block in cell cycle transition. Therefore, the proliferative disadvantage of Blimp-1 transduced cells can be separated from cell death in this system. A1⁺ Blimp-1⁺ WEHI 231 cells still show the differentiated phenotype characterized by IgM secretion and increased mad4 expression. In primary B cells, Blimp-1 also leads to a decrease in the expression of A1. However, the loss of A1 can be compensated in primary B cells since Blimp-1 expression does not lead to a comparable cell death as observed in WEHI 231 cells. These data suggest that levels of A1 and other anti-apoptotic molecules may determine the checkpoint between death and survival of Blimp-1 expressing B cells.

8. Literatur

8.1 Originalarbeiten

- 1 Brewer, J.W., Randall, T.D., Parkhouse, R.M. and Corley, R.B.,** IgM hexamers? *Immunol Today* 1994. **15:** 165-8.
- 2 Hardy, R.R. and Hayakawa, K.,** B-lineage differentiation stages resolved by multiparameter flow cytometry. *Ann N Y Acad Sci* 1995. **764:** 19-24.
- 3 Hardy, R.R. and Malissen, B.,** Lymphocyte development. The (knock-) ins and outs of lymphoid development. *Curr Opin Immunol* 1998. **10:** 155-7.
- 4 Osmond, D.G., Rolink, A. and Melchers, F.,** Murine B lymphopoiesis: towards a unified model. *Immunol Today* 1998. **19:** 65-8.
- 5 Ghia, P., ten Boekel, E., Rolink, A.G. and Melchers, F.,** B-cell development: a comparison between mouse and man. *Immunol Today* 1998. **19:** 480-5.
- 6 Hardy, R.R., Carmack, C.E., Shinton, S.A., Kemp, J.D. and Hayakawa, K.,** Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med* 1991. **173:** 1213-25.
- 7 Osmond, D.G.,** B cell development in the bone marrow. *Semin Immunol* 1990. **2:** 173-80.
- 8 Oettinger, M.A.,** Activation of V(D)J recombination by RAG1 and RAG2. *Trends Genet* 1992. **8:** 413-6.
- 9 Melchers, F., Karasuyama, H., Haasner, D., Bauer, S., Kudo, A., Sakaguchi, N., Jameson, B. and Rolink, A.,** The surrogate light chain in B-cell development. *Immunol Today* 1993. **14:** 60-8.
- 10 Parker, D.C.,** The functions of antigen recognition in T cell-dependent B cell activation. *Semin Immunol* 1993. **5:** 413-20.
- 11 Parker, D.C.,** T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* 1993. **11:** 331-60.
- 12 Noelle, R.J., Ledbetter, J.A. and Aruffo, A.,** CD40 and its ligand, an essential ligand-receptor pair for thymus- dependent B-cell activation. *Immunol Today* 1992. **13:** 431-3.
- 13 Noelle, R.J., Roy, M., Shepherd, D.M., Stamenkovic, I., Ledbetter, J.A. and Aruffo, A.,** A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992. **89:** 6550-4.

- 14 **Liu, Y.J. and Banchereau, J.**, Regulation of B-cell commitment to plasma cells or to memory B cells. *Semin Immunol* 1997. **9**: 235-40.
- 15 **Klaus, G.G., Choi, M.S., Lam, E.W., Johnson Leger, C. and Cliff, J.**, CD40: a pivotal receptor in the determination of life/death decisions in B lymphocytes. *Int Rev Immunol* 1997. **15**: 5-31.
- 16 **Neumann, M., Wohlleben, G., Chuvpilo, S., Kistler, B., Wirth, T., Serfling, E. and Schimpl A.**, CD40, but not lipopolysaccharide and anti-IgM stimulation of primary B lymphocytes, leads to a persistent nuclear accumulation of RelB. *J Immunol* 1996. **157**: 4862-9.
- 17 **Hsing, Y., Hostager, B.S. and Bishop, G.A.**, Characterization of CD40 signaling determinants regulating nuclear factor-kappa B activation in B lymphocytes. *J Immunol* 1997. **159**: 4898-906.
- 18 **Siebelt, F., Berberich, I., Shu, G., Serfling, E. and Clark, E.A.**, Role for CD40-mediated activation of c-Rel and maintenance of c-myc RNA levels in mitigating anti-IgM-induced growth arrest. *Cell Immunol* 1997. **181**: 13-22.
- 19 **Fang, W., Nath, K.A., Mackey, M.F., Noelle, R.J., Mueller, D.L. and Behrens, T.W.**, CD40 inhibits B cell apoptosis by upregulating bcl-xL expression and blocking oxidant accumulation. *Am J Physiol* 1997. **272**: C950-6.
- 20 **Kuss, A.W., Knodel, M., Berberich-Siebelt, F., Lindemann, D., Schimpl, A. and Berberich, I.**, A1 expression is stimulated by CD40 in B cells and rescues WEHI 231 cells from anti-IgM-induced cell death. *Eur J Immunol* 1999. **29**: 3077-88.
- 21 **Tuscano, J.M., Druey, K.M., Riva, A., Pena, J., Thompson, C.B. and Kehrl, J.H.**, Bcl-x rather than Bcl-2 mediates CD40-dependent centrocyte survival in the germinal center. *Blood* 1996. **88**: 1359-64.
- 22 **Grumont, R.J., Rourke, I.J. and Gerondakis, S.**, Rel-dependent induction of A1 transcription is required to protect B cells from antigen receptor ligation-induced apoptosis [In Process Citation]. *Genes Dev* 1999. **13**: 400-11.
- 23 **Lee, H.H., Dadgostar, H., Cheng, Q., Shu, J. and Cheng, G.**, NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999. **96**: 9136-41.
- 24 **Schneider, T.J., Grillot, D., Foote, L.C., Nunez, G.E. and Rothstein, T.L.**, Bcl-x protects primary B cells against Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* 1997. **159**: 4834-9.

- 25 **Schneider, T.J., Fischer, G.M., Donohoe, T.J., Colarusso, T.P. and Rothstein, T.L.,** A Novel Gene Coding for a Fas Apoptosis Inhibitory Molecule (FAIM) Isolated from Inducibly Fas-resistant B Lymphocytes. *J Exp Med* 1999. **189**: 949-956.
- 26 **Klemsz, M.J., Justement, L.B., Palmer, E. and Cambier, J.C.,** Induction of c-fos and c-myc expression during B cell activation by IL-4 and immunoglobulin binding ligands. *J Immunol* 1989. **143**: 1032-9.
- 27 **Foote, L.C., Howard, R.G., Marshak Rothstein, A. and Rothstein, T.L.,** IL-4 induces Fas resistance in B cells. *J Immunol* 1996. **157**: 2749-53.
- 28 **Koizumi, T., Wang, J., Suzuki, Y., Masuda, K. and Watanabe, T.,** Regulation of bcl-xL expression and Fas susceptibility in mouse B cells by CD40 ligation, surface IgM crosslinking and IL-4. *Mol Immunol* 1996. **33**: 1247-53.
- 29 **Melchers, F.,** B-lymphocyte-lineage cells from early precursors to Ig-secreting plasma cells: targets of regulation by the myc/mad/max families of genes? *Curr Top Microbiol Immunol* 1997. **224**: 19-30.
- 30 **Turner, C.A., Jr., Mack, D.H. and Davis, M.M.,** Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell* 1994. **77**: 297-306.
- 31 **Takatsu, K.,** Interleukin-5. *Curr Opin Immunol* 1992. **4**: 299-306.
- 32 **Takatsu, K.,** Cytokines involved in B-cell differentiation and their sites of action. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997. **215**: 121-33.
- 33 **Liu, Y.J. and Arpin, C.,** Germinal center development. *Immunol Rev* 1997. **156**: 111-26.
- 34 **Gray, D., Bergthorsdottir, S., van Essen, D., Wykes, M., Poudrier, J. and Siepmann, K.,** Observations on memory B-cell development. *Semin Immunol* 1997. **9**: 249-54.
- 35 **Tarlinton, D.,** Germinal centers: form and function. *Curr Opin Immunol* 1998. **10**: 245-51.
- 36 **Liu, Y.J., de Bouteiller, O. and Fugier-Vivier, I.,** Mechanisms of selection and differentiation in germinal centers. *Curr Opin Immunol* 1997. **9**: 256-62.
- 37 **Liu, Y.J., Mason, D.Y., Johnson, G.D., Abbot, S., Gregory, C.D., Hardie, D.L., Gordon, J. and MacLennan, I.C.,** Germinal center cells express bcl-2 protein after activation by signals which prevent their entry into apoptosis. *Eur J Immunol* 1991. **21**: 1905-10.
- 38 **Liu, Y.J., Malisan, F., de Bouteiller, O., Guret, C., Lebecque, S., Banchereau, J., Mills, F.C., Max, E.E. and Martinez-Valdez, H.,** Within germinal centers, isotype switching of immunoglobulin genes occurs after the onset of somatic mutation. *Immunity* 1996. **4**: 241-50.

- 39 **von Schwedler, U., Jack, H.M. and Wabl, M.,** Circular DNA is a product of the immunoglobulin class switch rearrangement. *Nature* 1990. **345:** 452-6.
- 40 **Iwasato, T., Shimizu, A., Honjo, T. and Yamagishi, H.,** Circular DNA is excised by immunoglobulin class switch recombination. *Cell* 1990. **62:** 143-9.
- 41 **Snapper, C.M. and Paul, W.E.,** B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) prepares resting murine B cells to secrete IgG1 upon subsequent stimulation with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 1987. **139:** 10-7.
- 42 **Snapper, C.M. and Paul, W.E.,** Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 1987. **236:** 944-7.
- 43 **Stevens, T.L., Bossie, A., Sanders, V.M., Fernandez-Botran, R., Coffman, R.L., Mosmann, T.R. and Vitetta, E.S.,** Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* 1988. **334:** 255-8.
- 44 **Coffman, R.L., Ohara, J., Bond, M.W., Carty, J., Zlotnik, A. and Paul, W.E.,** B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. *J Immunol* 1986. **136:** 4538-41.
- 45 **Vitetta, E.S., Ohara, J., Myers, C.D., Layton, J.E., Krammer, P.H. and Paul, W.E.,** Serological, biochemical, and functional identity of B cell-stimulatory factor 1 and B cell differentiation factor for IgG1. *J Exp Med* 1985. **162:** 1726-31.
- 46 **Berton, M.T. and Vitetta, E.S.,** IL-4-induced expression of germline gamma 1 transcripts in B cells following cognate interactions with T helper cells. *Int Immunol* 1992. **4:** 387-96.
- 47 **Kepron, M.R., Chen, Y.W., Uhr, J.W. and Vitetta, E.S.,** IL-4 induces the specific rearrangement of gamma 1 genes on the expressed and unexpressed chromosomes of lipopolysaccharide-activated normal murine B cells. *J Immunol* 1989. **143:** 334-9.
- 48 **Berton, M.T., Uhr, J.W. and Vitetta, E.S.,** Synthesis of germ-line gamma 1 immunoglobulin heavy-chain transcripts in resting B cells: induction by interleukin 4 and inhibition by interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989. **86:** 2829-33.
- 49 **Gray, D., Siepmann, K. and Wohlleben, G.,** CD40 ligation in B cell activation, isotype switching and memory development. *Semin Immunol* 1994. **6:** 303-10.
- 50 **Randall, T.D., Heath, A.W., Santos-Argumedo, L., Howard, M.C., Weissman, I.L. and Lund, F.E.,** Arrest of B lymphocyte terminal differentiation by CD40 signaling: mechanism for lack of antibody-secreting cells in germinal centers. *Immunity* 1998. **8:** 733-42.
- 51 **Liu, Y.J., Cairns, J.A., Holder, M.J., Abbot, S.D., Jansen, K.U., Bonnefoy, J.Y., Gordon, J. and MacLennan, I.C.,** Recombinant 25-kDa CD23 and interleukin 1 alpha promote

the survival of germinal center B cells: evidence for bifurcation in the development of centrocytes rescued from apoptosis. *Eur J Immunol* 1991. **21**: 1107-14.

52 Lalor, P.A., Nossal, G.J., Sanderson, R.D. and McHeyzer-Williams, M.G., Functional and molecular characterization of single, (4-hydroxy-3- nitrophenyl)acetyl (NP)-specific, IgG1+ B cells from antibody-secreting and memory B cell pathways in the C57BL/6 immune response to NP. *Eur J Immunol* 1992. **22**: 3001-11.

53 Smith, K.G., Hewitson, T.D., Nossal, G.J. and Tarlinton, D.M., The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci. *Eur J Immunol* 1996. **26**: 444-8.

54 Slifka, M.K., Matloubian, M. and Ahmed, R., Bone marrow is a major site of long-term antibody production after acute viral infection. *J Virol* 1995. **69**: 1895-902.

55 Manz, R.A., Thiel, A. and Radbruch, A., Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 1997. **388**: 133-4.

56 Manz, R.A., Lohning, M., Cassese, G., Thiel, A. and Radbruch, A., Survival of long-lived plasma cells is independent of antigen. *Int Immunol* 1998. **10**: 1703-11.

57 Cann, G.M., Zaritsky, A. and Koshland, M.E., Primary structure of the immunoglobulin J chain from the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982. **79**: 6656-60.

58 Zikan, J., Novotny, J., Trapani, T.L., Koshland, M.E., Urry, D.W., Bennett, J.C. and Mestecky, J., Secondary structure of the immunoglobulin J chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985. **82**: 5905-9.

59 Vitetta, E.S., Berton, M.T., Burger, C., Kepron, M., Lee, W.T. and Yin, X.M., Memory B and T cells. *Annu Rev Immunol* 1991. **9**: 193-217.

60 Kraal, G., Weissman, I.L. and Butcher, E.C., Memory B cells express a phenotype consistent with migratory competence after secondary but not short-term primary immunization. *Cell Immunol* 1988. **115**: 78-87.

61 Coico, R.F., Bhogal, B.S. and Thorbecke, G.J., Relationship of germinal centers in lymphoid tissue to immunologic memory. VI. Transfer of B cell memory with lymph node cells fractionated according to their receptors for peanut agglutinin. *J Immunol* 1983. **131**: 2254-7.

62 Bruce, J., Symington, F.W., McKearn, T.J. and Sprent, J., A monoclonal antibody discriminating between subsets of T and B cells. *J Immunol* 1981. **127**: 2496-501.

63 Yin, X.M., Lee, W.T. and Vitetta, E.S., Changes in expression of J11d on murine B cells during activation and generation of memory. *Cell Immunol* 1991. **137**: 448-60.

64 Potter, M. and Marcu, K.B., The c-myc story: where we've been, where we seem to be going. *Curr Top Microbiol Immunol* 1997. **224**: 1-17.

- 65 Hurlin, P.J., Queva, C., Koskinen, P.J., Steingrimsson, E., Ayer, D.E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Eisenman, R.N., Mad3 and Mad4: novel Max-interacting transcriptional repressors that suppress c-myc dependent transformation and are expressed during neural and epidermal differentiation. *Embo J* 1995. **14**: 5646-59.
- 66 Blackwood, E.M. and Eisenman, R.N., Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* 1991. **251**: 1211-7.
- 67 Sommer, A., Bousset, K., Kremmer, E., Austen, M. and Luscher, B., Identification and characterization of specific DNA-binding complexes containing members of the Myc/Max/Mad network of transcriptional regulators. *J Biol Chem* 1998. **273**: 6632-42.
- 68 Prendergast, G.C., Lawe, D. and Ziff, E.B., Association of Myn, the murine homolog of max, with c-Myc stimulates methylation-sensitive DNA binding and ras cotransformation. *Cell* 1991. **65**: 395-407.
- 69 Prendergast, G.C. and Ziff, E.B., Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region. *Science* 1991. **251**: 186-9.
- 70 Blackwell, T.K., Huang, J., Ma, A., Kretzner, L., Alt, F.W., Eisenman, R.N. and Weintraub, H., Binding of myc proteins to canonical and noncanonical DNA sequences. *Mol Cell Biol* 1993. **13**: 5216-24.
- 71 Kato, G.J., Lee, W.M., Chen, L.L. and Dang, C.V., Max: functional domains and interaction with c-Myc. *Genes Dev* 1992. **6**: 81-92.
- 72 Dang, C.V., c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol* 1999. **19**: 1-11.
- 73 Blackwood, E.M. and Eisenman, R.N., Regulation of Myc: Max complex formation and its potential role in cell proliferation. *Tohoku J Exp Med* 1992. **168**: 195-202.
- 74 Luscher, B. and Eisenman, R.N., New light on Myc and Myb. Part I. Myc. *Genes Dev* 1990. **4**: 2025-35.
- 75 DePinho, R.A., Schreiber-Agus, N. and Alt, F.W., myc family oncogenes in the development of normal and neoplastic cells. *Adv Cancer Res* 1991. **57**: 1-46.
- 76 Wu, M., Arsura, M., Bellas, R.E., FitzGerald, M.J., Lee, H., Schauer, S.L., Sherr, D.H. and Sonenshein, G.E., Inhibition of c-myc expression induces apoptosis of WEHI 231 murine B cells. *Mol Cell Biol* 1996. **16**: 5015-25.
- 77 Kelly, K., Cochran, B.H., Stiles, C.D. and Leder, P., Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell* 1983. **35**: 603-10.

- 78 **Marcu, K.B., Bossone, S.A. and Patel, A.J.**, myc function and regulation. *Annu Rev Biochem* 1992. **61**: 809-60.
- 79 **Larsson, L.G., Schena, M., Carlsson, M., Sallstrom, J. and Nilsson, K.**, Expression of the c-myc protein is down-regulated at the terminal stages during in vitro differentiation of B-type chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 1991. **77**: 1025-32.
- 80 **Lin, Y., Wong, K. and Calame, K.**, Repression of c-myc transcription by Blimp-1, an inducer of terminal B cell differentiation. *Science* 1997. **276**: 596-9.
- 81 **Shim, H., Chun, Y.S., Lewis, B.C. and Dang, C.V.**, A unique glucose-dependent apoptotic pathway induced by c-Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998. **95**: 1511-6.
- 82 **Evan, G.I., Wyllie, A.H., Gilbert, C.S., Littlewood, T.D., Land, H., Brooks, M., Waters, C.M., Penn, L.Z. and Hancock, D.C.**, Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 1992. **69**: 119-28.
- 83 **Askew, D.S., Ashmun, R.A., Simmons, B.C. and Cleveland, J.L.**, Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene* 1991. **6**: 1915-22.
- 84 **Bissonnette, R.P., Echeverri, F., Mahboubi, A. and Green, D.R.**, Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature* 1992. **359**: 552-4.
- 85 **Hermeking, H. and Eick, D.**, Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. *Science* 1994. **265**: 2091-3.
- 86 **Juin, P., Hueber, A.O., Littlewood, T. and Evan, G.**, c-Myc-induced sensitization to apoptosis is mediated through cytochrome c release. *Genes Dev* 1999. **13**: 1367-81.
- 87 **Wu, M., Yang, W., Bellas, R.E., Schauer, S.L., FitzGerald, M.J., Lee, H. and Sonenshein, G.E.**, c-myc promotes survival of WEHI 231 B lymphoma cells from apoptosis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1997. **224**: 91-101.
- 88 **Ayer, D.E., Kretzner, L. and Eisenman, R.N.**, Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell* 1993. **72**: 211-22.
- 89 **Ayer, D.E. and Eisenman, R.N.**, A switch from Myc:Max to Mad:Max heterocomplexes accompanies monocyte/macrophage differentiation. *Genes Dev* 1993. **7**: 2110-9.
- 90 **Hassig, C.A., Fleischer, T.C., Billin, A.N., Schreiber, S.L. and Ayer, D.E.**, Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A. *Cell* 1997. **89**: 341-7.
- 91 **Heinzel, T., Lavinsky, R.M., Mullen, T.M., Soderstrom, M., Laherty, C.D., Torchia, J., Yang, W.M., Brard, G., Ngo, S.D., Davie, J.R., Seto, E., Eisenman, R.N., Rose, D.W.,**

- Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G.**, A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature* 1997. **387**: 43-8.
- 92 Foley, K.P., McArthur, G.A., Queva, C., Hurlin, P.J., Soriano, P. and Eisenman, R.N.**, Targeted disruption of the MYC antagonist MAD1 inhibits cell cycle exit during granulocyte differentiation. *EMBO J* 1998. **17**: 774-85.
- 93 Larsson, L.G., Bahram, F., Burkhardt, H. and Luscher, B.**, Analysis of the DNA-binding activities of Myc/Max/Mad network complexes during induced differentiation of U-937 monoblasts and F9 teratocarcinoma cells. *Oncogene* 1997. **15**: 737-48.
- 94 Cultraro, C.M., Bino, T. and Segal, S.**, Function of the c-Myc antagonist Mad1 during a molecular switch from proliferation to differentiation. *Mol Cell Biol* 1997. **17**: 2353-9.
- 95 Chao, D.T. and Korsmeyer, S.J.**, BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 1998. **16**: 395-419.
- 96 Adams, J.M. and Cory, S.**, The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998. **281**: 1322-6.
- 97 Gross, A., McDonnell, J.M. and Korsmeyer, S.J.**, BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999. **13**: 1899-911.
- 98 Lin, E.Y., Orlofsky, A., Berger, M.S. and Prystowsky, M.B.**, Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2. *J Immunol* 1993. **151**: 1979-88.
- 99 Lu, L., Chaudhury, P. and Osmond, D.G.**, Regulation of cell survival during B lymphopoiesis: apoptosis and bcl-2/Bax content of precursor B cells in bone marrow of mice with altered expression of IL-7 and recombinaase-activating gene-2 [In Process Citation]. *J Immunol* 1999. **162**: 1931-40.
- 100 Merino, R., Ding, L., Veis, D.J., Korsmeyer, S.J. and Nunez, G.**, Developmental regulation of the Bcl-2 protein and susceptibility to cell death in B lymphocytes. *EMBO J* 1994. **13**: 683-91.
- 101 Grillot, D.A., Merino, R., Pena, J.C., Fanslow, W.C., Finkelman, F.D., Thompson, C.B. and Nunez, G.**, bcl-x exhibits regulated expression during B cell development and activation and modulates lymphocyte survival in transgenic mice. *J Exp Med* 1996. **183**: 381-91.
- 102 Lang, J., Arnold, B., Hammerling, G., Harris, A.W., Korsmeyer, S., Russell, D., Strasser, A. and Nemazee, D.**, Enforced Bcl-2 expression inhibits antigen-mediated clonal elimination of peripheral B cells in an antigen dose-dependent manner and promotes receptor editing in autoreactive, immature B cells. *J Exp Med* 1997. **186**: 1513-22.

- 103 Tomayko, M.M. and Cancro, M.P.,** Long-lived B cells are distinguished by elevated expression of A1. *J Immunol* 1998. **160:** 107-11.
- 104 Schliephake, D.E. and Schimpl, A.,** Blimp-1 overcomes the block in IgM secretion in lipopolysaccharide/anti- mu F(ab')₂-co-stimulated B lymphocytes. *Eur J Immunol* 1996. **26:** 268-71.
- 105 Soro, P.G., Morales-A, P., Martinez-M, J.A., Morales-A, S., Copin, S.G., Marcos, M.A. and Gaspar, M.L.,** Differential involvement of the transcription factor Blimp-1 in T cell-independent and -dependent B cell differentiation to plasma cells. *J Immunol* 1999. **163:** 611-7.
- 106 Messika, E.J., Lu, P.S., Sung, Y.J., Yao, T., Chi, J.T., Chien, Y.H. and Davis, M.M.,** Differential effect of B lymphocyte-induced maturation protein (Blimp- 1) expression on cell fate during B cell development. *J Exp Med* 1998. **188:** 515-25.
- 107 Yu, J., Angelin-Duclos, C., Greenwood, J., Liao, J. and Calame, K.,** Transcriptional repression by blimp-1 (PRDI-BF1) involves recruitment of histone deacetylase. *Mol Cell Biol* 2000. **20:** 2592-603.
- 108 Huang, S.,** Blimp-1 is the murine homolog of the human transcriptional repressor PRDI-BF1. *Cell* 1994. **78:** 9.
- 109 Keller, A.D. and Maniatis, T.,** Identification and characterization of a novel repressor of beta- interferon gene expression. *Genes Dev* 1991. **5:** 868-79.
- 110 Ren, B., Chee, K.J., Kim, T.H. and Maniatis, T.,** PRDI-BF1/Blimp-1 repression is mediated by corepressors of the Groucho family of proteins. *Genes Dev* 1999. **13:** 125-37.
- 111 Buyse, I.M., Shao, G. and Huang, S.,** The retinoblastoma protein binds to RIZ, a zinc-finger protein that shares an epitope with the adenovirus E1A protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995. **92:** 4467-71.
- 112 Huang, S., Shao, G. and Liu, L.,** The PR domain of the Rb-binding zinc finger protein RIZ1 is a protein binding interface and is related to the SET domain functioning in chromatin-mediated gene expression. *J Biol Chem* 1998. **273:** 15933-9.
- 113 Chittka, A. and Chao, M.V.,** Identification of a zinc finger protein whose subcellular distribution is regulated by serum and nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999. **96:** 10705-10.
- 114 Busslinger, M. and Urbanek, P.,** The role of BSAP (Pax-5) in B-cell development. *Curr Opin Genet Dev* 1995. **5:** 595-601.
- 115 Zwollo, P., Arrieta, H., Ede, K., Molinder, K., Desiderio, S. and Pollock, R.,** The Pax-5 gene is alternatively spliced during B-cell development. *J Biol Chem* 1997. **272:** 10160-8.

- 116 Nutt, S.L., Thevenin, C. and Busslinger, M.,** Essential functions of Pax-5 (BSAP) in pro-B cell development. *Immunobiology* 1997. **198:** 227-35.
- 117 Urbanek, P., Wang, Z.Q., Fetka, I., Wagner, E.F. and Busslinger, M.,** Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP [see comments]. *Cell* 1994. **79:** 901-12.
- 118 Tian, J., Okabe, T., Miyazaki, T., Takeshita, S. and Kudo, A.,** Pax-5 is identical to EBB-1/KLP and binds to the VpreB and lambda5 promoters as well as the KI and KII sites upstream of the Jkappa genes. *Eur J Immunol* 1997. **27:** 750-5.
- 119 Okabe, T., Bauer, S.R. and Kudo, A.,** Pre-B lymphocyte-specific transcriptional control of the mouse VpreB gene. *Eur J Immunol* 1992. **22:** 31-6.
- 120 Morrison, A.M., Nutt, S.L., Thevenin, C., Rolink, A. and Busslinger, M.,** Loss- and gain-of-function mutations reveal an important role of BSAP (Pax-5) at the start and end of B cell differentiation. *Semin Immunol* 1998. **10:** 133-42.
- 121 Nutt, S.L., Morrison, A.M., Dorfler, P., Rolink, A. and Busslinger, M.,** Identification of BSAP (Pax-5) target genes in early B-cell development by loss- and gain-of-function experiments. *Embo J* 1998. **17:** 2319-33.
- 122 Wakatsuki, Y., Neurath, M.F., Max, E.E. and Strober, W.,** The B cell-specific transcription factor BSAP regulates B cell proliferation. *J Exp Med* 1994. **179:** 1099-108.
- 123 Liao, F., Birshtein, B.K., Busslinger, M. and Rothman, P.,** The transcription factor BSAP (NF-HB) is essential for immunoglobulin germ-line epsilon transcription. *J Immunol* 1994. **152:** 2904-11.
- 124 Usui, T., Wakatsuki, Y., Matsunaga, Y., Kaneko, S., Koseki, H. and Kita, T.,** Overexpression of B cell-specific activator protein (BSAP/Pax-5) in a late B cell is sufficient to suppress differentiation to an Ig high producer cell with plasma cell phenotype. *J Immunol* 1997. **158:** 3197-204.
- 125 Reya, T. and Grosschedl, R.,** Transcriptional regulation of B-cell differentiation. *Curr Opin Immunol* 1998. **10:** 158-65.
- 126 Baldwin, A.S., Jr.,** The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996. **14:** 649-83.
- 127 Luo, Y. and Roeder, R.G.,** Cloning, functional characterization, and mechanism of action of the B- cell-specific transcriptional coactivator OCA-B. *Mol Cell Biol* 1995. **15:** 4115-24.

- 128 Strubin, M., Newell, J.W. and Matthias, P.,** OBF-1, a novel B cell-specific coactivator that stimulates immunoglobulin promoter activity through association with octamer-binding proteins. *Cell* 1995. **80:** 497-506.
- 129 Corcoran, L.M., Karvelas, M., Nossal, G.J., Ye, Z.S., Jacks, T. and Baltimore, D.,** Oct-2, although not required for early B-cell development, is critical for later B-cell maturation and for postnatal survival. *Genes Dev* 1993. **7:** 570-82.
- 130 Opitz, H.G., Opitz, U., Hewlett, G. and Schlumberger, H.D.,** A new model for investigations of T-cell functions in mice: differential immunosuppressive effects of two monoclonal anti-Thy-1.2 antibodies. *Immunobiology* 1982. **160:** 438-53.
- 131 MacDonald, N.J., Kuhl, D., Maguire, D., Naf, D., Gallant, P., Goswamy, A., Hug, H., Bueler, H., Chaturvedi, M., de la Fuente, J., et al.,** Different pathways mediate virus inducibility of the human IFN-alpha 1 and IFN-beta genes. *Cell* 1990. **60:** 767-79.
- 132 Lamers, M.C., Heckford, S.E. and Dickler, H.B.,** Hybridoma 2.4G2: dissociation of the B-lymphocyte-triggering activity from the monoclonal anti-Fc IgG receptor antibody. *Mol Immunol* 1984. **21:** 1237-42.
- 133 Erb, K.J., Holtschke, T., Muth, K., Horak, I. and Schimpl, A.,** T cell subset distribution and B cell hyperreactivity in mice expressing interleukin-4 under the control of major histocompatibility complex class I regulatory sequences. *Eur J Immunol* 1994. **24:** 1143-7.
- 134 Berberich, I. and Schimpl, A.,** Regulation of immunoglobulin gene expression in normal lymphocytes. II. Mechanisms of down-regulation of immunoglobulin secretion after engagement of the B cell antigen receptor. *Eur J Immunol* 1992. **22:** 525-9.
- 135 Karasuyama, H. and Melchers, F.,** Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified cDNA expression vectors. *Eur J Immunol* 1988. **18:** 97-104.
- 136 Soneoka, Y., Cannon, P.M., Ramsdale, E.E., Griffiths, J.C., Romano, G., Kingsman, S.M. and Kingsman, A.J.,** A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res* 1995. **23:** 628-33.
- 137 Lyons, A.B. and Parish, C.R.,** Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1994. **171:** 131-7.
- 138 Weston, S.A. and Parish, C.R.,** New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy. *J Immunol Methods* 1990. **133:** 87-97.
- 139 Sedgwick, J.D. and Holt, P.G.,** A solid-phase immunoenzymatic technique for the enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods* 1983. **57:** 301-9.

- 140 Wenger, R.H., Rochelle, J.M., Seldin, M.F., Kohler, G. and Nielsen, P.J.,** The heat stable antigen (mouse CD24) gene is differentially regulated but has a housekeeping promoter. *J Biol Chem* 1993. **268**: 23345-52.
- 141 Freeman, G.J., Borriello, F., Hodes, R.J., Reiser, H., Hathcock, K.S., Laszlo, G., McKnight, A.J., Kim, J., Du, L., Lombard, D.B., et al.,** Uncovering of functional alternative CTLA-4 counter-receptor in B7- deficient mice. *Science* 1993. **262**: 907-9.
- 142 Inaba, K., Witmer-Pack, M., Inaba, M., Hathcock, K.S., Sakuta, H., Azuma, M., Yagita, H., Okumura, K., Linsley, P.S., Ikehara, S., et al.,** The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J Exp Med* 1994. **180**: 1849-60.
- 143 Larsen, C.P., Ritchie, S.C., Hendrix, R., Linsley, P.S., Hathcock, K.S., Hodes, R.J., Lowry, R.P. and Pearson, T.C.,** Regulation of immunostimulatory function and costimulatory molecule (B7- 1 and B7-2) expression on murine dendritic cells. *J Immunol* 1994. **152**: 5208-19.
- 144 Lenschow, D.J., Su, G.H., Zuckerman, L.A., Nabavi, N., Jellis, C.L., Gray, G.S., Miller, J. and Bluestone, J.A.,** Expression and functional significance of an additional ligand for CTLA- 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993. **90**: 11054-8.
- 145 Bluestone, J.A.,** New perspectives of CD28-B7-mediated T cell costimulation. *Immunity* 1995. **2**: 555-9.
- 146 de Boer, M., Kasran, A., Kwekkeboom, J., Walter, H., Vandenberghe, P. and Ceuppens, J.L.,** Ligation of B7 with CD28/CTLA-4 on T cells results in CD40 ligand expression, interleukin-4 secretion and efficient help for antibody production by B cells. *Eur J Immunol* 1993. **23**: 3120-5.
- 147 Freeman, G.J., Borriello, F., Hodes, R.J., Reiser, H., Gribben, J.G., Ng, J.W., Kim, J., Goldberg, J.M., Hathcock, K., Laszlo, G., et al.,** Murine B7-2, an alternative CTLA4 counter-receptor that costimulates T cell proliferation and interleukin 2 production. *J Exp Med* 1993. **178**: 2185-92.
- 148 Moon, H.B., Severinson, E., Heusser, C., Johansson, S.G., Moller, G. and Persson, U.,** Regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin 4 in mouse B cells. *Scand J Immunol* 1989. **30**: 355-61.
- 149 Wirth, T., Staudt, L. and Baltimore, D.,** An octamer oligonucleotide upstream of a TATA motif is sufficient for lymphoid-specific promoter activity. *Nature* 1987. **329**: 174-8.
- 150 Lee, H., Arsura, M., Wu, M., Duyao, M., Buckler, A.J. and Sonenshein, G.E.,** Role of Rel-related factors in control of c-myc gene transcription in receptor-mediated apoptosis of the murine B cell WEHI 231 line. *J Exp Med* 1995. **181**: 1169-77.

- 151 Schauer, S.L., Wang, Z., Sonenshein, G.E. and Rothstein, T.L.,** Maintenance of nuclear factor-kappa B/Rel and c-myc expression during CD40 ligand rescue of WEHI 231 early B cells from receptor-mediated apoptosis through modulation of I kappa B proteins. *J Immunol* 1996. **157:** 81-6.
- 152 Nagumo, H., Agematsu, K., Shinozaki, K., Hokibara, S., Ito, S., Takamoto, M., Nikaido, T., Yasui, K., Uehara, Y., Yachie, A. and Komiyama, A.,** CD27/CD70 interaction augments IgE secretion by promoting the differentiation of memory B cells into plasma cells. *J Immunol* 1998. **161:** 6496-502.
- 153 Camerini, D., Walz, G., Loenen, W.A., Borst, J. and Seed, B.,** The T cell activation antigen CD27 is a member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor gene family. *J Immunol* 1991. **147:** 3165-9.
- 154 Agematsu, K., Kobata, T., Sugita, K., Hirose, T., Schlossman, S.F. and Morimoto, C.,** Direct cellular communications between CD45R0 and CD45RA T cell subsets via CD27/CD70. *J Immunol* 1995. **154:** 3627-35.
- 155 Agematsu, K., Kobata, T., Yang, F.C., Nakazawa, T., Fukushima, K., Kitahara, M., Mori, T., Sugita, K., Morimoto, C. and Komiyama, A.,** CD27/CD70 interaction directly drives B cell IgG and IgM synthesis. *Eur J Immunol* 1995. **25:** 2825-9.
- 156 Yasue, T., Baba, M., Mori, S., Mizoguchi, C., Uehara, S. and Takatsu, K.,** IgG1 production by sIgD+ splenic B cells and peritoneal B-1 cells in response to IL-5 and CD38 ligation. *Int Immunol* 1999. **11:** 915-23.
- 157 Nomura, J., Inui, S., Yamasaki, T., Kataoka, S., Maeda, K., Nakanishi, K. and Sakaguchi, N.,** Anti-CD40 monoclonal antibody induces the proliferation of murine B cells as a B-cell mitogen through a distinct pathway from receptors for antigens or lipopolysaccharide. *Immunol Lett* 1995. **45:** 195-203.
- 158 Heath, A.W., Chang, R., Harada, N., Santos-Argumedo, L., Gordon, J., Hannum, C., Campbell, D., Shanafelt, A.B., Clark, E.A., Torres, R., et al.,** Antibodies to murine CD40 stimulate normal B lymphocytes but inhibit proliferation of B lymphoma cells. *Cell Immunol* 1993. **152:** 468-80.
- 159 Sakata, A., Kuwahara, K., Ohmura, T., Inui, S. and Sakaguchi, N.,** Involvement of a rapamycin-sensitive pathway in CD40-mediated activation of murine B cells in vitro. *Immunol Lett* 1999. **68:** 301-9.
- 160 Dreyfus, M., Doyen, N. and Rougeon, F.,** The conserved decanucleotide from the immunoglobulin heavy chain promoter induces a very high transcriptional activity in B-cells when introduced into an heterologous promoter. *Embo J* 1987. **6:** 1685-90.

- 161 Parslow, T.G., Blair, D.L., Murphy, W.J. and Granner, D.K.,** Structure of the 5' ends of immunoglobulin genes: a novel conserved sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984. **81:** 2650-4.
- 162 Falkner, F.G. and Zachau, H.G.,** Correct transcription of an immunoglobulin kappa gene requires an upstream fragment containing conserved sequence elements. *Nature* 1984. **310:** 71-4.
- 163 Wirth, T., Priess, A., Annweiler, A., Zwilling, S. and Oeler, B.,** Multiple Oct2 isoforms are generated by alternative splicing. *Nucleic Acids Res* 1991. **19:** 43-51.
- 164 Kim, U., Qin, X.F., Gong, S., Stevens, S., Luo, Y., Nussenzweig, M. and Roeder, R.G.,** The B-cell-specific transcription coactivator OCA-B/OBF-1/Bob-1 is essential for normal production of immunoglobulin isotypes. *Nature* 1996. **383:** 542-7.
- 165 Qin, X.F., Reichlin, A., Luo, Y., Roeder, R.G. and Nussenzweig, M.C.,** OCA-B integrates B cell antigen receptor-, CD40L- and IL 4-mediated signals for the germinal center pathway of B cell development. *Embo J* 1998. **17:** 5066-75.
- 166 Grumont, R.J., Rourke, I.J., O'Reilly, L.A., Strasser, A., Miyake, K., Sha, W. and Gerondakis, S,** B lymphocytes differentially use the Rel and nuclear factor kappaB1 (NF-kappaB1) transcription factors to regulate cell cycle progression and apoptosis in quiescent and mitogen-activated cells. *J Exp Med* 1998. **187:** 663-74.
- 167 Berberich, I., Shu, G.L. and Clark, E.A.,** Cross-linking CD40 on B cells rapidly activates nuclear factor-kappa B. *J Immunol* 1994. **153:** 4357-66.
- 168 Borriello, F., Sethna, M.P., Boyd, S.D., Schweitzer, A.N., Tivol, E.A., Jacoby, D., Strom, T.B., Simpson, E.M., Freeman, G.J. and Sharpe, A.H.,** B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 1997. **6:** 303-13.
- 169 Rathmell, J.C., Fournier, S., Weintraub, B.C., Allison, J.P. and Goodnow, C.C.,** Repression of B7.2 on self-reactive B cells is essential to prevent proliferation and allow Fas-mediated deletion by CD4(+) T cells. *J Exp Med* 1998. **188:** 651-9.
- 170 Neurath, M.F., Stuber, E.R. and Strober, W.,** BSAP: a key regulator of B-cell development and differentiation. *Immunol Today* 1995. **16:** 564-9.
- 171 Rinkenberger, J.L., Wallin, J.J., Johnson, K.W. and Koshland, M.E.,** An interleukin-2 signal relieves BSAP (Pax5)-mediated repression of the immunoglobulin J chain gene. *Immunity* 1996. **5:** 377-86.
- 172 Hasbold, J. and Klaus, G.G.,** Anti-immunoglobulin antibodies induce apoptosis in immature B cell lymphomas. *Eur J Immunol* 1990. **20:** 1685-90.

- 173 Slifka, M.K. and Ahmed, R.,** Long-term antibody production is sustained by antibody-secreting cells in the bone marrow following acute viral infection. *Ann N Y Acad Sci* 1996. **797:** 166-76.
- 174 Slifka, M.K. and Ahmed, R.,** Long-lived plasma cells: a mechanism for maintaining persistent antibody production. *Curr Opin Immunol* 1998. **10:** 252-8.
- 175 Fisher, A.L. and Caudy, M.,** Groucho proteins: transcriptional corepressors for specific subsets of DNA-binding transcription factors in vertebrates and invertebrates. *Genes Dev* 1998. **12:** 1931-40.
- 176 Keleher, C.A., Redd, M.J., Schultz, J., Carlson, M. and Johnson, A.D.,** Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast. *Cell* 1992. **68:** 709-19.
- 177 Johnson, A.D.,** The price of repression. *Cell* 1995. **81:** 655-8.
- 178 Cooper, J.P., Roth, S.Y. and Simpson, R.T.,** The global transcriptional regulators, SSN6 and TUP1, play distinct roles in the establishment of a repressive chromatin structure. *Genes Dev* 1994. **8:** 1400-10.
- 179 Herschbach, B.M., Arnaud, M.B. and Johnson, A.D.,** Transcriptional repression directed by the yeast alpha 2 protein in vitro. *Nature* 1994. **370:** 309-11.
- 180 Redd, M.J., Arnaud, M.B. and Johnson, A.D.,** A complex composed of tup1 and ssn6 represses transcription in vitro. *J Biol Chem* 1997. **272:** 11193-7.
- 181 Miyamoto, M., Fujita, T., Kimura, Y., Maruyama, M., Harada, H., Sudo, Y., Miyata, T. and Taniguchi, T.,** Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements. *Cell* 1988. **54:** 903-13.
- 182 Kakkis, E., Riggs, K.J., Gillespie, W. and Calame, K.,** A transcriptional repressor of c-myc. *Nature* 1989. **339:** 718-21.
- 183 Snapper, C.M., Finkelman, F.D. and Paul, W.E.,** Differential regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin 4. *J Exp Med* 1988. **167:** 183-96
- 184 Ogata, H., Su, I., Miyake, K., Nagai, Y., Akashi, S., Mecklenbrauker, I., Rajewsky, K., Kimoto, M. and Tarakhovsky, A.,** The toll-like receptor protein RP105 regulates lipopolysaccharide signaling in B cells. *J Exp Med* 2000. **192:** 23-9
- 185 Paul, W.E., Mizuguchi, J., Brown, M., Nakanishi, K., Hornbeck, P., Rabin, E. and Ohara, J.,** Regulation of B-lymphocyte activation, proliferation, and immunoglobulin secretion. *Cell Immunol* 1986. **99:** 7-13

- 186 Wohlleben, G., Gray, D. and Schimpl, A.,** In vitro immunization of naive mouse B cells: establishment of IgM secreting hybridomas specific for soluble protein or hapten from B cells cultured on CD40 ligand transfected mouse fibroblasts. *Int Immunol* 1996. **8:** 343-9
- 187 Axcrone, K., Akerblad, P., Leanderson, T.,** Phenotypic convergence and divergence of surface immunoglobulin and CD40 signals. *Scand J Immunol* 1998. **47:** 210-17
- 188 Oliver, K., Noelle, R.J., Uhr, J.W., Krammer, P.H., Vitetta, E.S.,** B-cell growth factor (B-cell growth factor I or B-cell-stimulating factor, provisional 1) is a differentiation factor for resting B cells and may not induce cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985. **82:** 2465-7
- 189 Chen, G. and Courney, A.J.,** Groucho/TLE family proteins and transcriptional repression. *Gene* 2000. **249:** 1-16
- 190 Guenther, M.G., Lane, W.S., Fischle, W., Verdin, E., Lazar, M.A. and Shiekhhattar, R.,** A core SMRT corepressor complex containing HDAC3 and TBL1, a WD40-repeat protein linked to deafness. *Genes Dev* 2000. **14:** 1048-57
- 191 Sun, H. and Taneja, R.,** Stra13 expression is associated with growth arrest and represses transcription through histone deacetylase (HDAC)-dependent and HDAC-independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000. **97:** 4058-63
- 192 Angelin-Duclos, C., Cattoretti, G., Lin, K.I. and Calame, K.,** Commitment of B Lymphocytes to a Plasma Cell Fate Is Associated with Blimp-1 Expression In Vivo. *J Immunol* 2000. **165:** 5462-5471
- 193 Shaffer, A.L., Yu, X., He, Y., Boldrick, J., Chan, E.P. and Staudt, L.M.,** BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity* 2000. **13:** 199-212

8.2 Weitere Literatur

- (1) **Janeway, C. A., Travers, P.**, Immunobiology – The Immune System in Health and Disease. Current Biology Ltd./Garland Publishing Inc., 1994
- (2) **Janeway, C. A., Rosen, F. S., Merler, E. and Alper, C. A.**, The gamma globulins. 2nd edn, Boston, Little, Brown and Co., 1967
- (3) **Schliephake, D. E.**, Plasmazelle oder Gedächtnis-B-Zelle? Regulation der terminalen B-Zelldifferenzierung durch Antigen-Rezeptor-Ligation und Interleukine. Dissertation, Würzburg, 1996
- (4) **Knödel, M.**, Regulation der späten B-Zell-Differenzierung der Maus. Diplomarbeit, Würzburg, 1997

9. Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

$\alpha\mu$ bzw. $\alpha\mu F(ab')_2$	F(ab') ₂ -Fragment eines Ziege-anti-Maus IgM-Antikörpers
Ag	Antigen
AMP	2-Amino-2-Methyl-1-Propanol
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCIP	Brom-Chlor-Indolylphosphat
bio	Biotin
Blimp-1	B lymphocyte-induced maturation protein 1
bp	Basenpaare
BSAP	B cell specific activator protein
BSA	Rinderserumalbumin
BSS	balancierte Salzlösung
BZR	B-Zell-Rezeptor
CD	cluster of differentiation: Oberflächenantigene von Leukozyten und Thrombozyten
CFSE	Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester
cpm	Zählereignisse pro Minute (counts per minute)
Cy	Cychrom
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxyribonucleotid-Triphosphate
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EMCV	Enzephalo-Myocarditisvirus
EtOH	Ethanol
EYFP	enhanced yellow fluorescent protein

FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfat
HSA	heat stable antigen (CD24)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRES	internal ribosomal entry site
LPS	Lipopolysaccharid
MCS	multiple cloning site
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute(n)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehungen pro Minute
SAP	shrimp alkaline phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
tg	transgen
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
wt	Wildtyp

9.2 Publikationsliste

1. Originalarbeiten:

- **Knödel, M., Kuss, A. W., Lindemann, D., Berberich, I. and Schimpl, A.,** Reversal of Blimp-1-mediated apoptosis by A1, a member of the Bcl-2 family. *European Journal of Immunology* 1999. **29:** 2988-2998
- **Kuss, A. W., Knödel, M., Berberich-Siebelt, F., Lindemann, D., Schimpl, A. and Berberich, I.,** A1 expression is stimulated by CD40 in B cells and rescues WEHI 231 cells from anti-IgM induced cell death. *European Journal of Immunology* 1999. **29:** 3077-3088
- **Knödel, M., Kuss, A. W., Berberich, I. and Schimpl, A.,** Blimp-1 over-expression abrogates IL-4 and CD40 mediated suppression of terminal B cell differentiation but arrests isotype switching. *Eingereicht am 28.08.2000, European Journal of Immunology*

2. Publikationen auf Kongressen / Tagungen

- **Knödel, M., Berberich, I., Lindemann, D. and Schimpl, A.,** Blimp-1 induces IgM-secretion in immature WEHI 231 murine B lymphoma cells. *Keystone Symposia Conference "B- Lymphocyte Biology and Disease"*, Taos, New Mexico, USA, 07.02.-15.02.1999
- **Knödel, M., Berberich, I., Lindemann, D. and Schimpl, A.,** Reversal of Blimp-1 induced apoptosis by A1, a member of the Bcl-2 family. *Gordon Conference, Il Ciocco, Italien,* 30.05.-04.06.1999
- **Knödel, M., Kuss, A. W., Lindemann, D., Berberich, I. and Schimpl, A.,** Reversal of Blimp-1-mediated apoptosis by A1, a member of the Bcl-2 family. *30. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Hannover,* 29.09.-02.10.1999

- **Knödel, M., Schliephake, D., Kuss, A. W., Berberich, I. and Schimpl, A.**, Suppression of acute terminal differentiation of primary mouse B cells by BCR- or CD40-ligation and IL4: Reversal by IL-2, IL-5 and retrovirally transduced Blimp-1. *7th Annual Conference of the International Cytokine Society*, Hilton Head Island, South Carolina, USA, 05.12.-09.12.1999
- **Knödel, M., Kuss, A. W., Berberich, I. and Schimpl, A.**, Blimp-1 over-expression abrogates suppression of acute terminal differentiation of primary B cells by IL-4 and CD40 ligation but arrests isotype switching. *31. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie*, Düsseldorf, 29.11.-02.12.2000
- **Kuss, A. W., Knödel, M., Schimpl, A. and Berberich, I.**, A1 inhibits B cell antigen receptor-induced activation of caspases in WEHI 231 lymphoma cells. *31. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie*, Düsseldorf, 29.11.-02.12.2000

3. Diplomarbeit:

- **Knödel, M.**, Regulation der späten B-Zell-Differenzierung der Maus“, Würzburg, 1997

9.3 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 11. April 1970
 Geburtsort: Crailsheim, Landkreis Schwäbisch Hall
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

Schulbildung: 08.76-08.80 Eichendorff-Grundschule, Crailsheim
 09.80-07.89 Albert-Schweitzer-Gymnasium, Crailsheim
 05.89 Abschluss: Abitur

Zivildienst: 10.89-02.91 Zivildienst bei der Arbeiterwohlfahrt Schwäbisch-Hall

Hochschulstudium: 04.91-10.92 Studium des Lehramtes für Realschulen, Pädagogische Hochschule Ludwigsburg (Mathematik, Biologie, Musik)
 11.92-06.97 Studium der Biologie, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Hauptfach: Biochemie; Nebenfächer: Zell- und Entwicklungsbiologie, Virologie und Immunologie)
 Diplomarbeit: 09.96-06.97 Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg, AG Prof. Dr. A. Schimpl: „Regulation der späten B-Zell-Differenzierung der Maus“
 06.97 Abschluss: Diplom-Biologe
 Promotion: 07.97-06.00 Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg, AG Prof. Dr. A. Schimpl: „Regulation der terminalen B-Zell-Differenzierung durch Blimp-1“

Arbeitsverhältnis: seit 07.00 Investitionsbank Berlin: Traineeprogramm für den Bereich Wirtschaftsförderung