

Generierung von chimären Mäusen mit Mutationen in der Signalleitungs-Domäne von CD22 und Untersuchungen zur Funktion von CD22 in Knockout-Mäusen

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

vorgelegt von
Claus-Peter Danzer
aus Mannheim-Neckarau

Würzburg, 2002

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Herr Dr. rer. nat. habil. Lars Nitschke

Gutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. Gert Pflugfelder

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, daß ich die Dissertation „Generierung von chimären Mäusen mit Mutationen in der Signalleitungs-Domäne von CD22 und Untersuchungen zur Funktion von CD22 in Knockout-Mäusen“ selbstständig angefertigt, und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, daß diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt wurde.

Außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden habe ich früher keine weiteren akademischen Grade erworben, oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Claus-Peter Danzer

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 15. Januar 1998 bis zum 31.01.2002 am Institut für Virologie und Immunbiologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Anleitung von Dr. rer. nat. habil. Lars Nitschke angefertigt.

Für Catherine und Lina

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt...

... Herrn Dr. rer. nat. habil. Lars Nitschke für die interessante Aufgabenstellung, die ausgezeichnete Betreuung, stete Bereitschaft zur Diskussion, und viel Menschlichkeit.

... Herrn Prof. Dr. Gert Plugfelder dafür, daß er sich bereit erklärt hat, für diese Arbeit als Gutachter seitens der Fakultät für Biologie zu fungieren.

... Herrn Prof. Dr. Thomas Hünig für die Bereitstellung eines ausgezeichneten Arbeitsumfeldes und weiterhin für die Bereitwilligkeit, vor der abgeschlossenen Habilitation von Herrn Dr. rer. nat. habil. Lars Nitschke das Referat für meine Doktorarbeit zu übernehmen.

... allen anderen Mitgliedern in der Arbeitsgruppe Nitschke (Judith Gerlach, Astrid Heiter und Jörg Klein) und außerdem Frau Dr. Ursula Bommhardt und ihrer Arbeitsgruppe für die fortwährende Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

... allen jetzigen und früheren Mitarbeitern im Institut für Virologie und Immunologie für die Schaffung eines stets inspirierenden und reizvollen Umfeldes.

... Herrn Dr. Burkhard Kneitz für die Injektion vieler Blastozysten, die stete Hilfs- und Kooperationsbereitschaft, und die Zeit und Geduld bei der Vermittlung der Blastozystenisolation.

... Frau Dr. Birgit Ledermann für ihre Kooperation und die Injektion von Blastozysten

... den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Stuart Siddell für viele sehr wertvolle Tips rund ums Klonieren

1. Einleitung	1
1.1 Kurzer Überblick über das Immunsystem.....	1
1.2 Entwicklung und Funktion von B-Lymphozyten.....	2
1.3 Signalleitung über den B-Zell Antigen-Rezeptor.....	4
1.4 Feinregulation des BCR-Signals - Einfluss von Korezeptoren.....	6
1.5 CD22.....	8
1.5.1 Überblick über Struktur und Funktion von CD22.....	8
1.5.2 Interaktionspartner und intrazelluläre Signaltransduktion von CD22.....	9
1.5.3 Bindung von CD22 an seinen Liganden α 2,6-Sialinsäure.....	10
1.6 Zielsetzungen der Arbeit.....	12
2. Materialien und Methoden	14
2.1 Materialien	14
2.1.1 Bakterienstämme.....	14
2.1.2 Chemikalien.....	14
2.1.3 Mehrfach verwendete Puffer und Lösungen.....	14
2.1.3 Oligonukleotide.....	15
2.1.4 Enzyme für die Klonierung.....	15
2.1.5 Nährmedien und Lösungen für die Zellkultur.....	15
2.1.6 Zelllinien.....	16
2.1.7 ES-Zelllinien.....	16
2.1.8 Versuchstiere.....	16
2.1.9 Farbe-Reagenzien für die Durchflußcytometrie.....	16
2.2 Methoden	17
2.2.1 Arbeiten mit DNA.....	17
2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab.....	17
2.2.1.2 Präparation von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab.....	17
2.2.1.3 DNA-Gelelektrophorese.....	17
2.2.1.4 Fällung von DNA.....	18
2.2.1.5 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	18
2.2.1.6 Restriktionsverdau von DNA.....	18
2.2.1.7 Dephosphorylierung von DNA-Enden mit alkalischer Phosphatase.....	18
2.2.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten.....	18
2.2.1.9 Transformation von Bakterien.....	19
2.2.1.10 Anlegen von Glycerinkulturen von Bakterien.....	19
2.2.1.11 Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR).....	19
2.2.1.12 Reinigung von DNA mittels Ionenaustauscher-Säulen (Qiagen).....	20
2.2.1.13 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	20
2.2.1.14 Reinigung von PCR-Produkten.....	20
2.2.1.15 Auffüllen von überhängenden DNA-Enden mit Klenow-Polymerase.....	20
2.2.1.16 Hybridisierung von Oligonukleotiden.....	20
2.2.1.17 PCR-Screening von Bakterienkolonien.....	20
2.2.1.18 Ortsgerichtete Mutagenese klonierter DNA-Abschnitte.....	21
2.2.1.19 Sequenzierung von DNA.....	21
2.2.1.20 Direkte Sequenzierung von Abschnitten von Plasmid-DNA oder genomischer DNA.....	21
2.2.1.21 PCR-Screening zur Identifikation homolog rekombinierter ES-Zell Klone.....	22
2.2.1.22 Präparation von genomischer DNA von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen).....	23

2.2.1.23 Southern-Blot zum Nachweis homologer Rekombination von Targetingkonstrukten in ES-Zellen.....	23
2.2.2 Allgemeine Methoden der Zellkultur.....	24
2.2.2.1 Kultivieren von Säugerzellen (Lymphocyten-Zelllinien).....	24
2.2.2.2 Pelletieren von Zellen.....	24
2.2.2.3 Kryopreservation von Zellen.....	24
2.2.3 Kultur und Manipulation embryonaler Stammzellen (ES-Zellen).....	25
2.2.3.1 Präparation primärer embryonaler Fibroblasten (EMFIs) von Mäusen.....	25
2.2.3.2 Kultur und Expansion von EMFIs.....	25
2.2.3.3 Gewinnung von LIF (Leukaemia Inhibitory Factor) aus einer stabil transfizierten CHO-Zelllinie.....	25
2.2.3.4 Testen von fötalem Kälberserum (FCS).....	26
2.2.3.5 Kultur von ES-Zellen.....	26
2.2.3.6 Kryopreservation von ES-Zellen.....	26
2.2.3.7 Transfektion von ES-Zellen.....	26
2.2.3.8 Selektion von transfizierten ES-Zell-Klonen und Isolation einzelner Klone.....	27
2.2.3.9 Vorbereiten von ES-Zellen zur Blastozysteninjektion.....	27
2.2.3.10 Isolation von Blastozysten aus trächtigen Mäusen.....	27
2.2.3.11 Injektion und Reimplantation von trächtigen Mäusen.....	28
2.2.4 Präparation von Organen und Zellen aus Mäusen.....	28
2.2.4.1 Isolation aus Milz-Zellen.....	28
2.2.4.2 Isolation von Knochenmark-Zellen.....	28
2.2.4.3 Isolation von Zellen aus der Peritonealhöhle.....	28
2.2.4.4 Gewinnung von Blut und Serum von Mäusen.....	28
2.2.3.5 In vitro Aktivierung von B-Zellen.....	28
2.2.5 Durchflußcytometrie (fluorescence activated cell sorting, FACS).....	29
2.2.6 Transfektion von B-Zell Lymphom-Zellen der Linie J558L und Isolation stabiler Transfektanten.....	29
2.2.7 Stimulation von J558L μ m3-Zellen mit NP-BSA und Herstellung von Protein-Rohextrakten.....	29
2.2.8 Proteinbiochemische Methoden.....	30
2.2.8.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	30
2.2.8.2 Transfer und Detektion von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen (Western-Blot).....	30
2.2.8.3 Immunpräzipitation von Proteinen aus Zelllysaten.....	30
2.2.9 ELISA.....	31
3. Ergebnisse.....	32
3.1 Generierung chimärer Mäuse mit CD22 Knockin-Konstrukten.....	32
3.1.1 Überblick.....	32
3.1.2 Die Targeting-Vektoren zur Generierung von CD22-ITIM-KO und CD22-Tailless ...	32
3.1.3 Klonierung des Vektors pCD22-ITIM-KO.....	33
3.1.4 pCD22-ex12-Stop.....	34
3.1.5 Etablierung der Screening-PCRs mit Hilfe der Kontroll-Konstrukte.....	37
3.1.6 Transfektion der Targeting-Konstrukte und Screening zur Identifikation positiver Klone.....	40
3.1.7 Bestätigung der homologen Rekombination im Southern Blot.....	42
CD22-Tailless.....	42
CD22-ITIM-KO.....	44
3.1.8 Bestätigung der Mutationen durch Sequenzierung.....	46
3.1.9 Deletion der neo/tk-Kassette in ES-Zellen durch transiente Expression von Cre-Rekombinase.....	47

3.1.10 Blastozysteninjektion vollständig charakterisierter ES-Zell Klone	48
3.1.11 Neue Transfektionen der Targeting-Konstrukte	49
3.1.12 Transfektionen mit anderen Zelllinien – BALB/c-I	50
3.1.13 Änderung der Kulturbedingungen für ES-Zellen	51
3.1.14 Deletion der Selektionskassette in dem CD22-ITIM-KO Klon YFtar12B5	52
3.1.15 Neue Transfektionen in C57BL/6-III	53
3.1.16 Blastozysteninjektion von CD22-ITIM-KO Klonen nach Cre-Deletion	53
3.1.17 Transfektionen in anderen Zelllinien – E14Tg2a	54
3.1.18 Transfektionen in nicht-isogene Zelllinien mit umgebauten Targeting-Vektoren	54
3.1.19 Ein Ausblick	56
3.2 Transfektionsexperimente mit einem CD22-ITIM-KO cDNA-Konstrukt in einer B-Zelllinie	60
3.2.1 Klonierung eines CD22-ITIM-KO Expressionsvektors für die B-Zelllinie J558L μ m3	61
3.2.2 Erzeugung stabiler Transfektanten	61
3.2.3 Tyrosinphosphorylierung und SHP-1 Assoziation in CD22 ITIM KO	61
3.3 Maskierung und Demaskierung von CD22	64
3.3.1 CD22 auf Subpopulationen von B Zellen ist demaskiert	66
3.3.2 Milz-B-Zellen mit demaskiertem CD22 sind im IgM ^{hi} CD21 ^{hi} -Kompartiment angereichert	69
3.3.3 Milz-B-Zellen mit demaskiertem CD22 sind aktiviert	72
3.3.4 In vitro Aktivierung und Demaskierung	73
3.4 Marginalzonen B Zellen in CD22 defizienten Mäusen	78
3.4.1 Reduktion von Marginalzonen (MZ) B Zellen in CD22 defizienten Mäusen	78
3.4.2 Reduzierte Immunantwort gegen intravenös applizierte thymusunabhängige Antigene in CD22 defizienten Mäusen	80
4. Diskussion	83
4.1 Generierung chimärer Mäuse mit CD22 Knockin-Konstrukten	83
4.1.1 Die verwendeten Targeting Konstrukte	83
4.1.2 Zur verwendeten Zelllinie und den Kulturbedingungen	85
4.2 Transfektionsexperimente mit einem CD22-ITIM-KO cDNA-Konstrukt in einer B-Zelllinie	88
4.3 B-Zell Populationen mit demaskiertem CD22	90
4.3.1 B-Zell Populationen mit demaskiertem CD22 in vivo	90
4.3.2 Anreicherung demaskierter Zellen im IgM ^{hi} CD21 ^{hi} Kompartiment	91
4.3.3 Demaskierung nach in vitro Aktivierung	92
4.4 Marginalzonen B-Zellen in CD22-/- Mäusen	95
4.4.1 Marginalzonen B-Zellen in CD22-/- Mäusen sind reduziert	95
4.4.2 Die schwachen Thymus-unabhängigen Immunantworten in CD22-/- Mäusen könnten auf das verkleinerte MZ B-Zell Kompartiment zurückzuführen sein	96
5. Zusammenfassung	98
6. Summary	100
7. Literatur	102
7.1 Originalarbeiten	102

7.2 Publikationsliste	111
7.2.1 Originalarbeiten aus dieser Doktorarbeit	111
7.2.2 Publikationen auf Kongressen/Tagungen	111
8. Anhang	113
8.1 Abkürzungen	113
8.2 Primersequenzen	115
8.3 Vektorkarten	117
9. Lebenslauf	120

1. Einleitung

1.1 Kurzer Überblick über das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein System von Zellen und Organen, das der Unterscheidung von eigen und fremd dient, und uns aufgrund dieser Fähigkeit und einer Reihe von Effektormechanismen wirksam vor Infektionen mit Bakterien, Viren, Pilzen, und Parasiten schützt.

Die unterschiedlichen Komponenten des Immunsystems treten im Verlauf einer Immunantwort konzentriert miteinander in Aktion. Eine typische Immunabwehr, z.B. gegen die Infektion eines Pathogens, wird aufgrund ihres zeitlichen Verlaufs in eine frühe unspezifische, eine frühe induzierte, und eine spätere adaptive Phase unterteilt.

Makrophagen und Neutrophile (phagozytierende Zellen = „Fresszellen“) bilden die erste Abwehrreihe gegen Krankheitserreger, die eine epitheliale Barriere durchdringen. Sie können Mikroben in sich aufnehmen (Phagozytose) oder Parasiten durch Freisetzung des Inhalts von Lysosomen zerstören, und außerdem die nachfolgende Immunabwehr durch Ausschüttung von Cytokinen initiieren. Cytokinfreisetzung und Phagozytose werden dabei durch eine Reihe von Oberflächenrezeptoren vermittelt, die konservierte mikrobielle Strukturen erkennen. Diese unspezifischen zellulären Mechanismen werden durch lösliche Faktoren, wie z.B. das Komplementsystem, unterstützt.

Eine Reihe von Lymphozyten mit Antigen-Rezeptoren limitierter Diversität überbrücken die Zeitspanne bis die adaptive Immunantwort wirksam wird. Zu ihnen gehören die natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen), die $\gamma:\delta$ T-Zellen, und zwei spezielle B-Zell Subpopulationen, nämlich die B1-Zellen und die Marginalzonen B-Zellen (engl.: marginal zone B-cells, MZ B-Zellen). Auf NK-Zellen und $\gamma:\delta$ T-Zellen wird im Rahmen dieser Kurzeinführung nicht eingegangen werden, eine ausführlichere Beschreibung von B1 und MZ B-Zellen als den Trägern der frühen T-Zell unabhängigen Immunantwort folgt später in diesem Kapitel, und in 1.6, 3.4 und 4.4. MZ, B1, NK, und $\gamma:\delta$ T-Zellen bieten einen limitierten frühen Schutz gegen eine Reihe von Pathogenen, aber keine dauerhafte Immunität.

Die adaptive Immunantwort wird von T-Zellen und B-Zellen getragen. Sowohl T- als auch B-Zellen zeichnen sich durch eine sehr große Diversität und Spezifität ihrer Antigen-Rezeptoren aus. Durch Antigen-Kontakt werden einzelne Zellen mit Spezifität für das jeweilige Pathogen zunächst klonal expandiert, es folgt Differenzierung der expandierten Klone zu Effektorzellen bzw. Gedächtniszellen. Gedächtniszellen bieten Schutz bei späterem erneuten Kontakt mit dem gleichen Antigen.

T-Zellen vermitteln die zelluläre Immunität. Bei T-Zellen unterscheidet man je nach Art ihres Korezeptors zwei große Klassen: CD4 und CD8 T-Zellen. CD8 T-Zellen differenzieren nach Aktivierung zu cytotoxischen T-Zellen, die infizierte Zellen töten. CD4 T-Zellen dagegen entwickeln sich zu T-Helfer-Zellen (T_H -Zellen) zweier verschiedener Subtypen. T_H1 -Zellen aktivieren Makrophagen direkt und beeinflussen über die Ausschüttung von Cytokinen, u.a. $IFN-\gamma$, andere Zellen des Immunsystems. T_H2 -Zellen aktivieren B-Zellen in thymusabhängigen (engl.: thymus dependent, TD) Immunantworten.

B-Zellen sind die Träger der humoralen Immunantwort. Sie differenzieren nach Aktivierung zu Antikörper-sezierenden Plasmazellen. Antikörper (Immunglobuline) sind lösliche Proteine, die Pathogene oder Toxine durch spezifische Bindung neutralisieren, oder als Adaptoren dienen, und andere Effektorzellen rekrutieren und aktivieren können. Entwicklung und Funktion von B-Zellen werden im nächsten Abschnitt ausführlicher erläutert.

Antikörper können Antigene durch Bindung mit ihrer variablen Domäne neutralisieren. Dadurch werden z.B. Toxine inaktiviert, oder die Verbreitung extrazellulärer Pathogene verhindert. Der nicht-variable Teil (Fc-Teil) eines Immunglobulins dient als Adaptor, der die Bindung an Effektorzellen vermittelt. Die Fc-Teile der verschiedenen Antikörper-Isotypen (IgM, IgG, IgE, IgA) vermitteln dabei Bindung an verschiedene Effektorzellen mit verschiedenen Effektor-Funktionen.

(Janeway 1999)

1.2 Entwicklung und Funktion von B-Lymphozyten

Wie im vorhergehenden Abschnitt kurz angerissen, sind B-Zellen als die Produzenten von Immunglobulinen (Ig) verantwortlich für die nicht-zelluläre (humorale) Immunantwort. Immunglobuline sind Proteine, die aus zwei miteinander durch Disulfid-Brücken verbundenen schweren Ketten, und zwei jeweils mit einer schweren Kette verbundenen leichten Ketten bestehen. Ein variabler Teil einer leichten Kette bildet zusammen mit dem variablen Teil einer schweren Kette die Antigen-Bindungsstelle. Über die Antigen-Bindungsstelle werden Antigene, z.B. Komponenten von Pathogenen, spezifisch erkannt. Den Teil des Antigens, der von einem Antikörper erkannt wird, nennt man antigene Determinante oder Epitop.

Immunglobuline kommen in verschiedenen Unterformen mit unterschiedlichen Funktionen vor. Membrangebundene Igs des Isotyps IgM und/oder IgD dienen als B-Zell Antigen-Rezeptor (engl.: B-cell receptor, BCR) auf der Oberfläche von B-Zellen. Die Ig-Isotypen IgM, IgG, IgE, und IgA, die sich in ihren nicht-variablen Teilen (Fc-Teile) unterscheiden, werden dagegen sezerniert, und erfüllen die eigentlichen Effektorfunktionen. Sezernierte Igs können Antigen entweder durch Bindung neutralisieren, oder vermittelt durch ihre Fc-Teile unterschiedliche Effektorzellen, wie z.B. NK-Zellen, Makrophagen oder Mastzellen, bzw. das Komplementsystem aktivieren.

Jedes nur denkbare Antigen wird durch B-Zellen erkannt, was eine riesige Vielfalt des reifen B-Zell-Repertoires voraussetzt. Diese enorme Vielfalt begründet sich in der B-Zell-Entwicklung, dem Rearrangement von Ig-Genen, und der Selektion von Zellen mit funktionalem Rezeptor ohne Autoreaktivität. Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über diese Prozesse gegeben.

B-Zellen entwickeln sich im Knochenmark aus lymphoiden Vorläuferzellen. Während ihrer Differenzierung durchlaufen sie Stufen, die vor allem durch das Rearrangement von Immunglobulin-Gensegmenten zu funktionalen schweren bzw. leichten Immunglobulin-Ketten gekennzeichnet sind. Mit abgeschlossenem Rearrangement einer funktionalen schweren Immunglobulin-Kette aus V_H , D_H , und J_H Gensegmenten (H: engl.: heavy = schwer) erfolgt der Übergang von der Pro B-Zelle zur Pre B-Zelle. Die schwere Kette bildet zusammen mit den Pseudo-leichten-Ketten V_{preB} und λ_5 den Pre B-Zell-Rezeptor. Signale, die der Zelle von diesem Rezeptor übermittelt werden, sind für die allelische Exklusion und für die Initiierung des Rearrangements der V_L und J_L Gensegmente für die leichte Immunglobulin-Kette (L: engl.: light = leicht) nötig. Ist auch die rearrangierte leichte Kette funktional, so resultiert das in der Expression eines vollständigen Oberflächen-IgM-Moleküls (mIgM), das zusammen mit zwei signaltransduzierenden Molekülen, $Ig\alpha$ und $Ig\beta$, den B-Zell Antigen-Rezeptor-Komplex bildet.

Mit der Expression eines B-Zell Rezeptors ist die Stufe der unreifen B-Zelle erreicht. Die BCRs auf unreifen B-Zellen besitzen alle erdenklichen Spezifitäten. Manche dieser Spezifitäten sind gegen körperfremde, andere aber auch gegen körpereigene Strukturen gerichtet. Bindung des jeweiligen Liganden an den BCR führt bei unreifen B-Zellen zum Zelltod (klonale Deletion) oder zu einem Zustand von Nicht-Reaktivität (Anergie) gegenüber

dem jeweiligen Antigen. Da B-Zellen im unreifen Stadium nur Zugang zu Autoantigenen, aber nicht zu Fremdanitigenen haben, führt dieser als negative Selektion bezeichnete Vorgang zur Deletion der autoreaktiven B-Zellen. Negative Selektion findet zum Teil bereits im Knochenmark statt. Unreife B-Zellen (IgM^+IgD^-) entwickeln sich im Knochenmark zu Transitionalen B-Zellen Typ 1 (T1-Zellen). Diese exprimieren IgM stark, es erscheint aber auch bereits IgD auf der Zelloberfläche ($\text{IgM}^{\text{hi}}\text{IgD}^{\text{lo}}$). T1-Zellen wandern in die Milz. Dort vervollständigen sie ihre Reifung über mehrere Zwischenstufen, die anhand ihrer Oberflächenmarker voneinander unterscheidbar sind (Loder et al. 1999). Transitionale B-Zellen Typ 2 (T2-Zellen) sind $\text{IgM}^{\text{hi}}\text{IgD}^{\text{hi}}$. Auch die Transitionalen B-Zellen der Milz sind der negativen Selektion durch Bindung von Autoantigenen unterworfen (Carsetti et al. 1995).

B-Zellen mit autoreaktiven Rezeptoren werden, wie geschildert, auf der Stufe der unreifen oder der Transitionalen B-Zellen eliminiert. Aber auch positive Selektion von B-Zellen in verschiedene Subkompartimente reifer B-Zellen wird auf bis jetzt nur unzureichend verstandene Weise von Interaktionen zwischen dem BCR und Auto- oder Umwelt-Antigenen angetrieben (z.B. (Hayakawa et al. 1999)). Zellen aus dem T2-Kompartiment entwickeln sich so weiter zu reifen B-Zellen (B2-Zellen, $\text{IgM}^{\text{lo}}\text{IgD}^{\text{hi}}$), zu B1-Zellen, oder zu Marginalzonen B-Zellen (MZ B-Zellen) (Cariappa and Pillai 2002). Etwa 70% aller Milz-B-Zellen sind B2-Zellen, 3-5% MZ B-Zellen. Nur ein verschwindend geringer Anteil der Milz-B-Zellen sind B1-Zellen, sie stellen dagegen die dominierende Population der Peritonealhöhle (ca. 50-80%) dar.

Ist eine B-Zelle selektioniert, und hat sie ihre Reifung in der Peripherie abgeschlossen, vermittelt der BCR-Komplex T-Zell Antigen-abhängige Aktivierung. Je nach Klasse des Antigens spielen T-Zellen dabei eine tragende Rolle (s. nächster Abschnitt). Nach Aktivierung und klonaler Expansion differenziert ein Großteil der B-Zellen zu Effektorzellen, und ein kleiner Teil zu Gedächtniszellen. Auch für die Persistenz peripherer B-Zellen ist der BCR essentiell. Vom BCR geht ein Überlebenssignal aus, daß zwar nicht zur Proliferation einzelner Klone führt, aber den Erhalt des peripheren B-Zell-Repertoires sichert (Lam et al. 1997).

Verschiedene reife periphere B-Zell Populationen sind spezialisiert auf bestimmte Aufgaben. B1-Zellen und MZ B-Zellen sind hauptverantwortlich für Immunantworten gegen Thymusunabhängige Antigene Typ 2 (TI2-Antigene) (Lane et al. 1986; Martin and Kearney 2000). Bei TI2-Immunantworten aktivieren polyvalente Antigene die B-Zelle durch BCR-Kreuzvernetzung ohne Unterstützung von $\text{T}_{\text{H}2}$ -Zellen. Repetitive Elemente bakterieller Zellwände stellen beispielsweise solche TI2-Antigene dar. Immunglobuline werden sehr früh sezerniert (nach ca. 3-5 Tagen), und sind auf bestimmte Isotypen (IgM, IgG3, IgG1) beschränkt. Bei Thymusabhängigen Antworten (TD-Antworten), die hauptsächlich von B2-Zellen getragen werden, wird zunächst das gebundene Antigen nach der Bindung an den BCR internalisiert, und Peptid-Bruchstücke des Antigens auf MHC-II Molekülen (engl.: major histocompatibility complex) präsentiert. T-Helfer-Zellen ($\text{T}_{\text{H}2}$ -Zellen) erkennen diese Peptid-MHC-Komplexe, geben der B-Zelle Proliferationssignale über kostimulatorische Moleküle wie CD28, und schütten Cytokine aus, die die Produktion anderer Isotypen als IgM und IgD bewirken. Diese Vorgänge finden ebenso wie die Affinitätsreifung, bei der durch Mutation bereits rearrangierter variabler Domänen besser Antigen-bindende Varianten des von der Zelle exprimierten Immunglobulins erzeugt werden, in sog. Keimzentren statt.

Bei allen eben beschriebenen Vorgängen nehmen Signale, die über den B-Zell Rezeptor vermittelt werden, eine zentrale Rolle ein. Einen Überblick über einige wichtige molekulare Abläufe bei der Aktivierung des BCR gibt der nächste Abschnitt.

(Janeway 1999)

1.3 Signalleitung über den B-Zell Antigen-Rezeptor

Wie bereits kurz geschildert, erfüllt der BCR wichtige Aufgaben in der B-Zell-Entwicklung, dem Erhalt peripherer B-Zellen, und in der Aktivierung reifer B-Zellen durch Antigen. Kreuzvernetzung des B-Zell Rezeptors durch Antigen resultiert in der Aktivierung einer Reihe von Kinasen, Phosphatasen und Adaptorproteinen, und letztlich zu einer durch Transkriptionsfaktoren vermittelten Änderung der Genexpression. Im folgenden wird versucht, einen Überblick über einige wichtige und zentrale Abläufe der BCR-Signaltransduktion zu vermitteln. Einige der im Text beschriebenen Vorgänge sind in Abb. 1 schematisiert wiedergegeben. Eine gute Übersicht über BCR-Signaltransduktion bieten folgende Artikel: (Gold et al. 1991; Justement 2000; Wienands 2000).

Der BCR-Komplex auf reifen, ruhenden B-Zellen besteht aus einem membrangebundenen Immunglobulin (mIgM und mIgD), und einem nicht kovalent assoziierten disulfidverbundenen Heterodimer von $Ig\alpha$ (CD79a) und $Ig\beta$ (CD79b) (Cambier et al. 1994; Reth and Wienands 1997). Die Aufgabe des mIgs ist die Erkennung des Antigens, es besitzt aber selbst nur einen sehr kurzen cytoplasmatischen Schwanz, der im Fall von mIgM und mIgD keine eigene Kapazität zur Signalweiterleitung besitzt. Die Signalweiterleitung geschieht durch das Heterodimer $Ig\alpha/Ig\beta$, daß mit mIgM und mIgD interagiert (Blum et al. 1993; Michnoff et al. 1994).

$Ig\alpha$ und $Ig\beta$ sind eng miteinander verwandt, besitzen jeweils eine extrazelluläre Ig-ähnliche Domäne, und einen cytoplasmatischen Schwanz mit einem Immunrezeptor Tyrosin-haltigen aktivierenden Motiv (ITAM) mit der Sequenz D/Ex₇D/ExxYxxI/Lx₇YxxI/L. In einem funktionellen BCR-Komplex sind bereits im Ruhezustand die Src-Familien Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK) Lyn, Fyn, und Blk mit $Ig\alpha/Ig\beta$ assoziiert. Nach Antigen-Kontakt werden die Tyrosine der ITAMs von diesen Src-Kinasen phosphoryliert. Das führt zur weiteren Rekrutierung von Src-Kinasen, und zu deren vollständiger Aktivierung.

In der Folge kommt es zur Assoziation und Aktivierung der PTK Syk. Die zwei aufeinanderfolgenden SH2-Domänen dieser PTK interagieren dabei mit den vollständig phosphorylierten ITAMs. Durch Autophosphorylierung und Phosphorylierung durch Src-Kinasen wird Syk aktiviert (Kurosaki et al. 1995).

Zusätzlich zu den PTKs der Src-Familie und Syk spielt Btk, eine PTK der Tec-Familie, eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion des BCR (Desiderio 1997). Diese trägt am N-Terminus eine Pleckstrin-Homologie (PH) Domäne, gefolgt von einer Tec-Homologie (TH) Domäne, und einer SH3, einer SH2, und einer SH1-Domäne. Die PH-Domäne interagiert bevorzugt mit Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP₃), dem Produkt der aktiven PI3-Kinase (PI3K). Membranassoziation über die PH-Domäne ist neben der Aktivierung durch Src-Kinasen (Park et al. 1996) die Voraussetzung für die Aktivierung von Btk. PI3K wird ebenfalls über den BCR, aber auch durch den Korezeptor CD19 (s. unten) aktiviert.

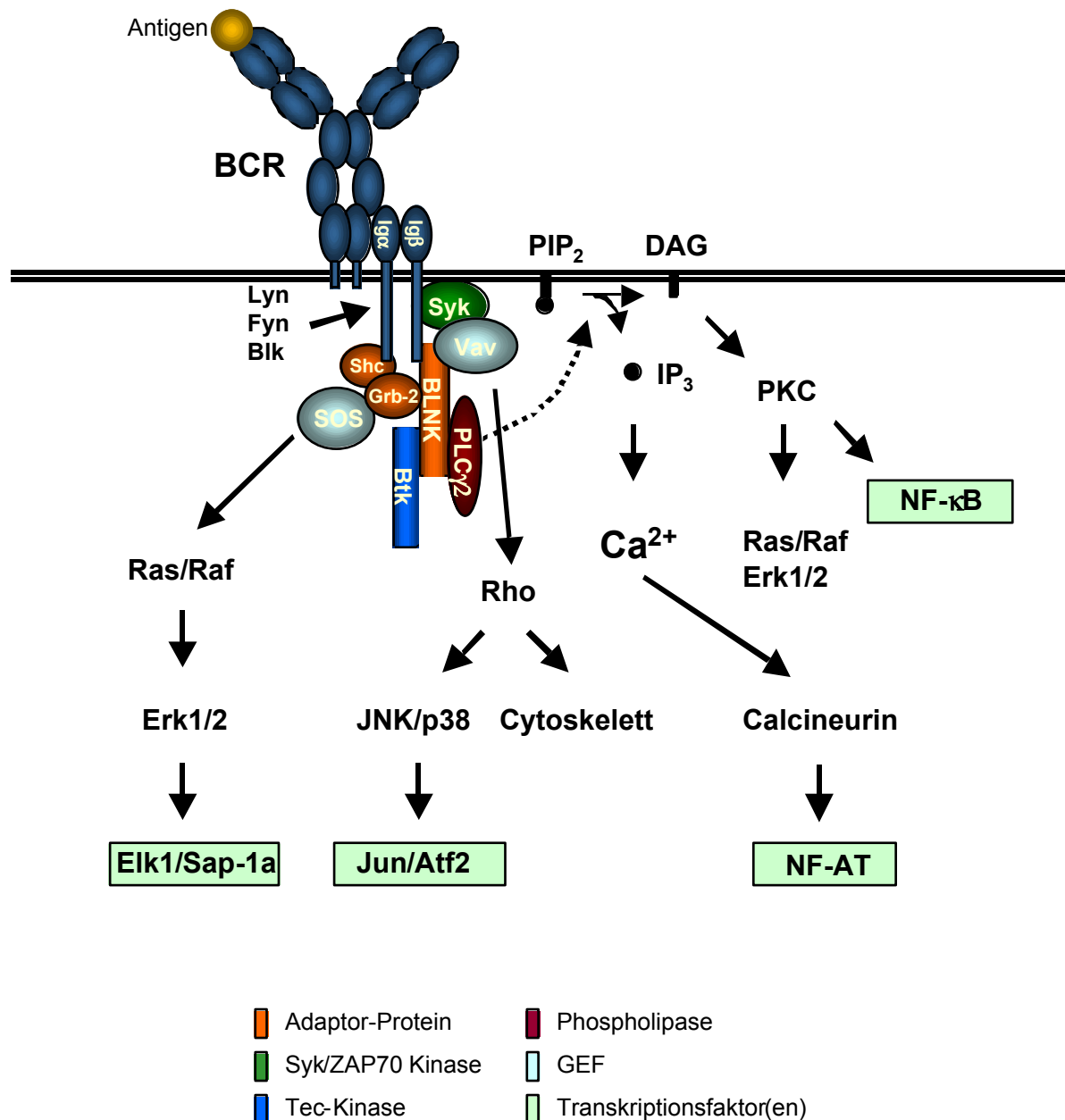


Abb. 1: Hauptsignalwege der BCR-Signaltransduktion. Nach Stimulation des B-Zell Rezeptors mit Antigen werden eine Reihe von Prozessen in Gang gesetzt, die letztendlich veränderte Genexpression und Reorganisation des Cytoskeletts zur Folge haben. Ca²⁺-Mobilisierung, Ras/Raf-Aktivierung, und der Rho-Signalweg sind schematisch dargestellt. Nicht im Bild gezeigt ist die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K), deren Produkt PIP₃ wichtig für die Interaktion von Signalmolekülen mit PH-Domäne wie z.B. Btk ist. Details s. Text.. GEF: Guanin Nukleotid Austauschfaktor (engl.: guanyl nucleotide exchange factor, GEF)

Die Aktivierung von Src-Kinasen, Syk und Btk resultiert schließlich in der Aktivierung von mindestens drei Haupt-Signalleitungswegen in der B-Zelle: Die Phosphorylierung von Phospholipase C_γ (PLC_γ) führt zur Ca²⁺-Mobilisierung, die Assoziation des Adaptors Shc zur Ras/Raf-Aktivierung. Von Vav vermittelte Signale haben Rho-GTPasen-Aktivierung und eine Reorganisation des Cytoskeletts zur Folge.

Eine zentrale Rolle bei der Initiierung der Ca²⁺-Mobilisierung durch den B-Zell Rezeptor spielt das Adaptormolekül BLNK (SLP-65, BASH) (Wienands et al. 1998). Nach Stimulation des B-Zell Rezeptors wird BLNK von Syk phosphoryliert, und assoziiert mit Igα/β (Engels et al. 2001; Kabak et al. 2002). BLNK in seiner phosphorylierten Form interagiert dort mit Btk und

mit PLC γ . PLC γ wird dann durch Btk und Syk phosphoryliert, und dadurch aktiviert (Takata and Kurosaki 1996). Aktive PLC γ hydrolysiert membranständiges Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat (PIP $_2$) zu Diacylglycerol (DAG), das in der Membran verbleibt, und Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP $_3$), das ins Cytoplasma diffundiert (Carter et al. 1991). DAG aktiviert die Protein Kinase C (PKC), während IP $_3$ die transiente Freisetzung von Ca $^{2+}$ aus speziellen Speichern im ER, gefolgt von lange anhaltendem Einstrom von Ca $^{2+}$ aus dem Extrazellulärraum bewirkt. Ein wichtiger Effekt des Ca $^{2+}$ -Signals in B-Zellen ist z.B. die Aktivierung der cytosolischen Phosphatase Calcineurin, und daraus resultierend die nukleäre Lokalisation der cytosolischen Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF-AT. Im Zellkern bindet NF-AT an die nukleäre Komponente des NF-AT, AP-1, und reguliert so die Transkription einer Reihe von Genen (Rao et al. 1997).

Das Adaptormolekül Shc interagiert mit Phospho-ITAMs in Ig α /Ig β und wird dann seinerseits von Syk phosphoryliert, was zur Rekrutierung des Grb-2/SOS-Komplexes und damit zur Aktivierung des Ras/Raf-Signalweges führt (Saxton et al. 1994; Smit et al. 1994; Nagai et al. 1995; D'Ambrosio et al. 1996). Ein alternativer Weg der Ras-Aktivierung durch den B-Zell-Rezeptor führt über die Rekrutierung des Adaptormoleküls BLNK/SLP-65 an die Membran. Grb-2 ist mit BLNK konstitutiv assoziiert (Wienands et al. 1998), SOS wird daher wiederum in die Nähe seines Substrates Ras gebracht. Der Ras/Raf-Signalweg führt letztlich über die Aktivierung der ERK1/2 MAP-Kinasen zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Elk1 und Sap-1a (Su and Karin 1996).

Vav interagiert über seine SH2-Domäne mit phosphoryliertem Syk, und wird vermutlich von dieser PTK phosphoryliert, und damit aktiviert (Deckert et al. 1996). Vav assoziiert aber auch wie Grb-2 konstitutiv und induzierbar mit BLNK (Wienands et al. 1998). Tyrosinphosphoryliertes Vav ist ein Guanin Nukleotid Austauschfaktor (engl.: guanyl nucleotide exchange factor, GEF) für die kleine GTPase Rho. Rho spielt eine entscheidende Rolle in der rezeptorinduzierten Neuorganisation des Aktin-Zytoskeletts, und in der Aktivierung der JNK und p38 MAP-Kinasen, die wiederum die Jun und Atf2 Transkriptionsfaktoren regulieren (Su and Karin 1996).

1.4 Feinregulation des BCR-Signals - Einfluss von Korezeptoren

Das BCR-Signal wird abhängig vom Entwicklungsstadium der B-Zelle und abhängig von der momentanen Umgebung der Zelle durch eine Reihe zusätzlicher Oberflächenrezeptoren fein reguliert. Diese sind in der Lage, das BCR-Signal entweder zu verstärken, oder es negativ zu beeinflussen. Durch diese Rezeptoren kann die Zelle Informationen aus ihrer Umgebung integrieren, und entsprechend der jeweiligen Situation auf eine Stimulation ihres Antigen-Rezeptors reagieren. Die Antwort der Zelle auf Stimulation des BCRs kann dann situationsabhängig von der Induktion von Toleranz über die Initiierung des programmierten Zelltodes (Apoptose), bis hin zur Proliferation und Differenzierung zur Effektorzelle reichen (Tsubata 1999).

Ein Beispiel für einen aktivierenden Korezeptor ist CD19. CD19 gehört zur Immunglobulin-Superfamilie und wird ausschließlich auf B-Zellen exprimiert. Zusammen mit CD21, CD81, und Leu 13 bildet es einen trimeren Komplex. Die cytoplasmatische Domäne von CD19 assoziiert mit den positiven Modulatoren des BCR-Signals PI3K und Vav, außerdem mit den Src-Kinasen Lyn und Fyn (Tuveson et al. 1993; van Noesel et al. 1993; Weng et al. 1994; Chalupny et al. 1995). Kreuzvernetzt man CD19 mit dem BCR, so führt das zu verstärkter Aktivierung der MAP-Kinasen ERK, JNK und p38 und zu verstärkter Synthese von PIP $_2$. Dadurch kommt es zu einem höheren Ca $^{2+}$ -Signal und zu verstärkter B-Zell-Proliferation (Carter et al. 1991; Li et al. 1997; Tooze et al. 1997). In der Folge mikrobieller Infektionen kommt es zur Assoziation von Antigen mit der Komplement-Komponente C3d. Durch die Interaktion von C3d mit CD21 können solche Komplexe den BCR in räumliche Nähe mit

CD19 bringen (Dempsey et al. 1996). Da der Phänotyp CD19-defizienter Mäuse aber schwerwiegender ist als der CD21-defizienter Mäuse, liegt es nahe, daß noch mindestens ein zusätzlicher natürlicher Ligand für CD19 oder den Korezeptor-Komplex existiert (Engel et al. 1995; Rickert et al. 1995; Ahearn et al. 1996; Molina et al. 1996).

Eine Vielzahl von inhibitorischen Rezeptoren regulieren die B-Zell Signaltransduktion auf komplexe, nur zum Teil verstandene Weise. Beispiele für inhibitorische Rezeptoren auf B-Zellen sind CD72, LAIR-1, PIR-B (entsprechend den humanen ILT-Rezeptoren). Ein sehr wichtiger B-Zell spezifischer inhibitorischer Rezeptor ist CD22, der Gegenstand dieser Doktorarbeit. CD22 wird später in dieser Einleitung ausführlich vorgestellt (s.u.). Andere inhibitorische Rezeptoren wie PD-1, CD5, oder CD66a werden auf B-Zellen, aber auch auf anderen Zellen exprimiert. Inhibitorische Rezeptoren erzielen ihren Effekt durch Bindung und Aktivierung von Phosphatasen wie SHP-1 oder SHIP. Diese assoziieren mit phosphorylierten sog. ITIM-(Immunrezeptor Tyrosin-haltigen Inhibitorischen Motiven)-Motiven mit der Konsensus-Sequenz I/V/LxYxxV/L (Tamir et al. 2000).

SHP-1 ist eine cytosolische Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTP) mit zwei N-terminalen SH-2 Domänen und einer C-terminalen Phosphatasedomäne. Mäuse mit natürlichen SHP-1 Mutationen, *me* und *me'* (motheaten bzw. motheaten viable, engl.: „Mottenzerfressen“ bzw. „Mottenzerfressen lebensfähig“) Mäuse, trugen erheblich dazu bei, die in vivo Rolle von SHP-1 zu untersuchen. Es wurde gezeigt, daß SHP-1 durch Heraufsetzen der Aktivierungsschwelle einer Reihe von Rezeptoren eine wichtige Rolle bei B-Zell Differenzierung, Proliferation und Überleben spielt. Mäuse mit eingeschränkter SHP-1 Funktion haben eine Reduktion peripherer B-Zellen, ein relativ vergrößertes B1 B-Zell Kompartiment, und Zeichen von Autoimmunität wie Hypergammaglobulinämie, Autoantikörper, und Ablagerungen von Immunkomplexen. Zudem sind gereinigte B-Zellen aus *me* Mäusen überempfindlich gegenüber BCR-Stimulation (Siminovitch and Neel 1998).

Anhand der Kristallstruktur der sehr eng verwandten Phosphatase SHP-2 konnte der Mechanismus der Aktivierung von SHP-1/2 durch die Bindung der SH-2 Domänen an Phosphotyrosine aufgeklärt werden. Ohne Phosphotyrosin-Bindungspartner blockiert die N-terminale SH-2 Domäne direkt das aktive Zentrum des Enzyms. Die Phosphotyrosin-Bindungstasche der SH-2 Domäne ist durch diese Interaktion allosterisch verändert, und bindet das entsprechende Phospho-ITIM deshalb nur sehr schwach. Bei Aktivierung erfolgt zuerst Bindung der C-terminalen SH-2 Domäne an ein Phosphotyrosin. Dadurch kann die N-terminale SH-2 Domäne mit einem benachbarten Phosphotyrosin interagieren, dessen lokale Konzentration durch Assoziation von SHP-1/2 stark erhöht ist. Der allosterische Effekt auf die N-terminale SH-2 Domäne, und damit auch der inhibierende Effekt dieser auf das aktive Zentrum, wird damit terminiert. Die Konsequenz aus dieser Studie ist, daß SHP-1/2 für ihre Aktivierung sehr wahrscheinlich zwei phosphorylierte Tyrosinreste in einem bestimmten räumlichen Abstand benötigen (Hof et al. 1998).

Als wahrscheinliche Substrate für SHP-1 in B-Zellen wurden in unterschiedlichen Systemen Ig α /Ig β , Syk, BLNK, und Lyn identifiziert (Dustin et al. 1999; Mizuno et al. 2000; Adachi et al. 2001; Somani et al. 2001).

Eine weitere Phosphatase, die in der Inhibition von B-Zell Rezeptor Signalen eine wichtige Rolle spielt, ist die Phospho-Inositol-Phosphatase SHIP. SHIP entfernt Phosphat 5 von Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP₃), dem Produkt aktivierter PI3K (Damen et al. 1996). Durch Assoziation mit dem Phospho-ITIM des niederaffinen Fc-Rezeptors Fc γ R11b wird SHIP aktiviert, und inhibiert das BCR-Ca²⁺-Signal. Voraussetzung dafür ist die Kreuzvernetzung des Rezeptors mit dem BCR, die unter physiologischen Bedingungen das Resultat einer Antigen-BCR Interaktion mit IgG-haltigen Immunkomplexen ist (Coggeshall 1998). Es wurde gezeigt, daß SHIP für den inhibierenden Effekt von Fc γ R11b auf das BCR-Ca²⁺-Signal nötig ist. Als Mechanismus der Inhibition wurde das Verhindern der Membranassoziation von für das Ca²⁺-Signal wichtigen Molekülen wie z.B. Btk

vorgeschlagen. Die Assoziation von Btk an die Membran ist durch eine Interaktion der PH-Domäne von Btk mit PIP₃, dem Substrat von SHIP, vermittelt (Coggeshall 2000). Es wurde auch über eine ITIM-unabhängige Assoziation von SHIP an CD22 berichtet (s. unten) (Poe et al. 2000).

1.5 CD22

1.5.1 Überblick über Struktur und Funktion von CD22

Ein wichtiger inhibitorischer Modulator des BCR-Signals und der Gegenstand dieser Doktorarbeit ist CD22. CD22 ist ein Klasse-I Transmembranprotein, das ausschließlich von B-Zellen exprimiert wird (Dorken et al. 1986; Stamenkovic and Seed 1990). CD22 wird vom Pre B-Zell Stadium an exprimiert. Die Expression steigt dann über die nachfolgenden B-Zell Entwicklungsstufen an, auf reifen B-Zellen ist sie am stärksten. Alle reifen B-Zell Subpopulationen exprimieren CD22, Plasmazellen jedoch nicht (Campana et al. 1985) (Erickson et al. 1996) (Nitschke et al. 1997) (Stoddart et al. 1997).

CD22 (Siglec-2) ist ein Mitglied der Siglec-Familie (Sialinsäure-bindende Immunglobulin (Ig)-ähnliche Lectine). Das Gen für mCD22 hat 15 Exons und befindet sich auf Chromosom 7. CD22 besitzt sieben extrazelluläre immunglobulinähnliche (Ig) Domänen, eine Transmembrandomäne, und eine intrazelluläre Domäne (Abb. 2). Die distale Ig-Domäne beinhaltet die Bindungsstelle für α 2,6-Sialinsäure, den Liganden von CD22. In der cytoplasmatischen Domäne gibt es sechs konservierte Tyrosinreste, drei davon in ITIMs.

Ursprünglich wurde angenommen, daß CD22 hauptsächlich als Adhäsionsmolekül dient. Aber schon frühe Studien zeigten, daß CD22 in die B-Zell Aktivierung involviert ist. Zunächst wurde angenommen, daß CD22 als Korezeptor das BCR-Signal verstärkt. Hinweise dafür waren die verstärkte Proliferation von B-Zellen nach separater Kreuzvernetzung von CD22 mit Antikörpern (Pezzutto et al. 1987; Pezzutto et al. 1988; Tuscano et al. 1996), die Phosphorylierung von CD22 nach BCR-Kreuzvernetzung (Schulte et al. 1992; Leprince et al. 1993; Peaker and Neuberger 1993), die Assoziation von CD22 mit dem B-Zell Rezeptor (Leprince et al. 1993) (Peaker and Neuberger 1993), und die Assoziation mit Lyn, Syk, PI3K (Tuscano et al. 1996).

Später setzte sich die Erkenntnis durch, daß CD22 hauptsächlich ein negativer Regulator ist. Ein erster Hinweis darauf war, daß CD22 nach BCR-Stimulation mit der Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-1 assoziiert (Campbell and Klinman 1995; Doody et al. 1995). In einem anderen Experiment wurde gezeigt, daß Bindung von CD22 mittels Antikörper-bedeckten Agarosekügelchen vor BCR-Stimulation zu stärkerer B-Zell Aktivierung führte (Doody et al. 1995). Wurde dagegen CD22 mit dem BCR kreuzvernetzt, so führte dies zu verringerter Ca²⁺-Mobilisierung (Smith et al. 1998) und MAP-Kinasen Aktivierung nach B-Zell Aktivierung [Tooze, 1997 #32].

Die Untersuchung des Phänotyps von CD22-Knockout Mäusen bestätigte die Rolle von CD22 als negativem Regulator der B-Zell Signaltransduktion (Otipoby et al. 1996; Sato et al. 1996; Nitschke et al. 1997; O'Keefe et al. 1999). Die B-Zellen von CD22^{-/-} Mäusen zeigen stark erhöhten Ca²⁺-Einstrom nach BCR Stimulation. Der Aktivierungsmarker MHC-II ist 2-fach erhöht auf der Oberfläche exprimiert. Im Vergleich mit Wildtyp-B-Zellen zeigten CD22^{-/-} B-Zellen eine höhere Apoptoseneigung nach BCR-Kreuzvernetzung, wobei das höhere Ca²⁺-Signal der Auslöser für den programmierten Zelltod sein könnte (Cyster and Goodnow 1995). Entsprechend haben die B-Zellen CD22-defizienter Mäuse auch eine geringere Lebensdauer als Wildtyp-Zellen. In einer Studie wurde zwar eine leicht verstärkte Proliferation von CD22^{-/-} B-Zellen infolge von BCR-Kreuzvernetzung gefunden, und eine zusätzliche Rolle für CD22 als positivem Modulator ist deshalb nicht auszuschließen (Sato et

al. 1996). Insgesamt beweisen die Studien an CD22^{-/-} Mäusen aber, daß die primäre Funktion von CD22 die eines negativen Regulators des BCR-Signals ist.

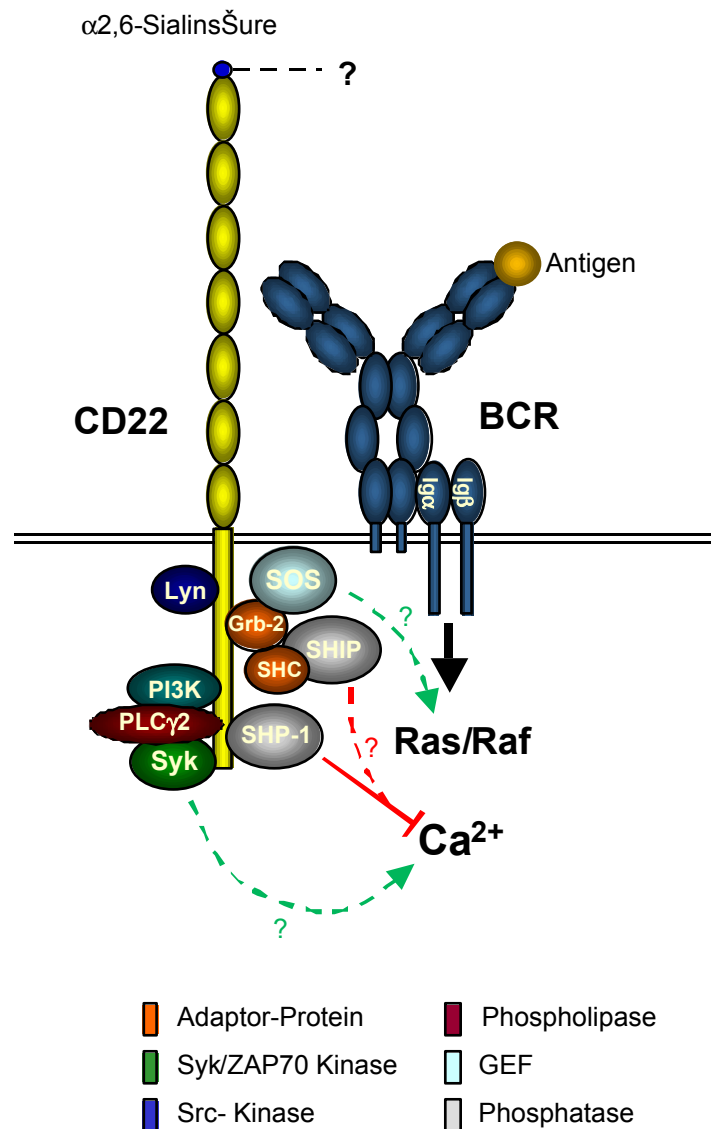


Abb. 2: CD22 ist ein Mitglied der Siglec-Familie (Sialinsäure bindende Ig-ähnliche Lectine). Durch Bindung und Aktivierung von SHP-1 kann CD22 das BCR-Ca²⁺-Signals inhibieren. Auch die positiven Modulatoren der BCR-Signaltransduktion Grb-2, PI3K, Syk und PLCγ binden an CD22. Die Rolle dieser im Zusammenhang mit CD22 ist ungeklärt. Mit der äußersten Ig-Domäne bindet CD22 α2,6-Sialinsäure (blauer Kreis). Die Identität des/der als Ligand(en) (sialylierte Proteine) ist/sind ungeklärt (in der Grafik durch ein Fragezeichen angedeutet).

1.5.2 Interaktionspartner und intrazelluläre Signaltransduktion von CD22

An den cytoplasmatischen Teil von CD22 binden eine Reihe von Molekülen, die in der Signaltransduktion der B-Zelle, insbesondere in der durch den B-Zell Rezeptor initiierten, eine wichtige Rolle spielen. CD22 assoziiert konstitutiv und induzierbar durch BCR-Kreuzvernetzung mit dem BCR selbst, was durch Kopräzipitation gezeigt wurde (Leprince et al. 1993; Peaker and Neuberger 1993). Nach BCR-Stimulation wird das Molekül an Tyrosinen des cytoplasmatischen Schwanzes phosphoryliert. Drei von diesen Tyrosinen liegen innerhalb von ITIM-Motiven. SHP-1 bindet, wie im späteren Verlauf dieser

Doktorarbeit klar wurde, an die phosphorylierten ITIMs, wobei die beiden distalen ITIMs ausreichend sind (Blasioli et al. 1999; Otipoby et al. 2001). Das erhöhte Ca^{2+} -Signal in CD22-/- B Zellen kann aufgrund dieser Assoziation erklärt werden. Dennoch ist eine Rolle für die Inositol-Phosphatase SHIP nicht völlig ausgeschlossen. Es wurde gezeigt, daß SHP-1 und SHIP differenziell die Ca^{2+} -Mobilisierung aus intrazellulären bzw. extrazellulären Speichern regulieren (Ono et al. 1997). Eine Arbeitsgruppe fand, daß CD22 die Freisetzung von Ca^{2+} sowohl aus intrazellulären als auch extrazellulären Speichern reduziert (O'Keefe et al. 1996). SHIP wiederum kann über Assoziation mit den Adaptormolekülen Grb-2 und Shc einen quaternären Komplex mit dem B-Zell Rezeptor bilden. Der Kontakt zwischen CD22 und dem BCR wird dabei hauptsächlich über Grb-2 hergestellt (Poe et al. 2000). Grb-2 bindet an Tyrosin 4, daß sich nicht innerhalb eines ITIM-Motivs befindet (Yohannan et al. 1999; Otipoby et al. 2001). Dies birgt die Möglichkeit, daß die Regulation des Ca^{2+} -Signals durch CD22 zum Teil ITIM unabhängig geschehen könnte.

Neben SHP-1 binden auch die Signalmoleküle Lyn, Syk, $\text{PLC}\gamma$ PI3K, und Grb-2 an CD22. Durch in vitro Phosphopeptid-Bindungsstudien und Untersuchungen in Zelllinien wurden deren Kontaktpunkte mit CD22 bestimmt. Die Src-Familien Kinase Lyn bindet an die Tyrosine 2 und 3, und stärker noch an 4, 5, und 6. Eine basale nicht von Tyrosin-Phosphorylierung abhängige Assoziation von Lyn an einen Bereich in der Nähe von Tyrosin 5 wurde ebenfalls beschrieben (Tuscano et al. 1996). Diese könnte wichtig für die Initiierung einer Phosphorylierungskaskade sein. Ähnlichkeiten in den Phänotypen von Lyn-/-, CD22-/- und SHP-1-/- Mäusen wiesen darauf hin, daß alle drei Moleküle Bestandteile eines einzigen Signalweges sind. Später wurde dies in einer eleganten genetischen Studie bewiesen (Cornall et al. 1998). In Übereinstimmung damit wurde gezeigt, daß Lyn für die Phosphorylierung von CD22 und die nachfolgende Assoziation von SHP-1 nötig ist (Chan et al. 1998; Cornall et al. 1998; Smith et al. 1998; Otipoby et al. 2001).

Die Kinase Syk mit ihren Tandem-SH2-Domänen bindet phosphorylierungsabhängig an die Tyrosine 2, 3, 5, und 6. $\text{PLC}\gamma$ bindet Tyrosin 2, 4, und 6 und PI3K bindet Tyrosin 4 und 6, aber beide binden nur das C-terminale Tyrosin direkt (Tuscano et al. 1996; Yohannan et al. 1999). Grb-2 assoziiert ausschließlich mit Tyrosin 4. Grb-2 Assoziation an CD22 ist, im Gegensatz zur Bindung von SHP-1 sehr wahrscheinlich unabhängig von Src-Kinasen. CD22 könnte auf diese Weise durch unabhängige Kinasen reguliert den MAP-Kinasen bzw. Ca^{2+} -Signalweg beeinflussen (Otipoby et al. 2001).

Es wurde vorgeschlagen, daß CD22 in Antigen-aktivierten B-Zellen durch die Aktivierung von positiven Signalmodulatoren auch kostimulatorische Signale vermitteln kann. Eine Studie berichtet, daß nach Kreuzvernetzung von hCD22 alleine stressaktivierte Protein-Kinasen (SAP-Kinasen) aktiviert werden, die zusammen mit den Signalen des BCRs B-Zell-Proliferation bewirken (Tuscano et al. 1999).

1.5.3 Bindung von CD22 an seinen Liganden $\alpha 2,6$ -Sialinsäure

Wie eingangs erwähnt, zählt CD22 zur Familie der Siglecs, einer Familie von Membranproteinen, die Sialinsäure binden, und hauptsächlich auf hematopoetischen Zellen exprimiert werden (Crocker and Varki 2001). CD22 kann mit seiner extrazellulären Domäne spezifisch mit $\alpha 2,6$ -Sialinsäure interagieren (Powell et al. 1993). Nachdem die Bindungsstelle für $\alpha 2,6$ -Sialinsäure zunächst in den äußeren beiden Ig-Domänen lokalisiert wurde (Engel et al. 1995; Law et al. 1995), zeigte eine spätere Studie, daß Aminosäurereste in einem β -Faltblatt in Domäne 1, der distalen V-Set Ig-Domäne, essentiell für die Sialinsäurebindung sind (van der Merwe et al. 1996). Ein in der Siglec-Familie hochkonservierter, positiv geladener Arginin-Rest in Domäne 1 ist von entscheidender Bedeutung für die Bindung der negativ geladenen Sialinsäure. Ein Austausch dieses Arginins gegen Alanin führt zu einem praktisch vollständigen Verlust der Bindung von $\alpha 2,6$ -Sialinsäure (van der Merwe et al. 1996). Diese Beobachtung zusammen mit späteren Ergebnissen zeigen, daß $\alpha 2,6$ -Sialinsäure für die Bindung von sialylierten Proteinen alleine ausreichend, und keine

zusätzliche Bindung von CD22 durch den Protein-Anteil eines Liganden nötig ist (Bakker et al. 2000).

Die Natur des oder der Liganden von CD22 ist bis heute nicht eindeutig bestimmt, obwohl es eine Reihe von möglichen Kandidaten gibt. Aus Bindungsstudien mit CD22-Ig Fusionsproteinen weiß man, daß α 2,6-Sialinsäure sehr stark auf der Oberfläche von B und T-Lymphozyten, und weniger stark auf nicht-hematopoetische Zellen (Law et al. 1995) exprimiert wird. Konstitutive niedrige und durch Entzündungsmediatoren (TNF- α , IL1, LPS) induzierbare erhöhte Expression von Sialinsäure wurde auf aktivierten Endothelzellen gefunden (Hanasaki et al. 1994). In in vivo Experimenten in Mäusen wurden Liganden für CD22 auf Endothelzellen im Knochenmark identifiziert. Transfereexperimente mit Wildtyp und CD22-/- B-Zellen und Injektionen von löslichen CD22-Ig-Fusionsproteinen zeigten in diesem Zusammenhang, daß CD22 eine Rolle im Homing von reifen B-Zellen ins Knochenmark spielen könnte (Nitschke et al. 1999).

Vermittelt durch die Bindung von CD22 an sialylierte Liganden auf den Oberflächen anderer Zellen („in trans“) kann die B-Zelle Information über ihre Umgebung gewinnen. Dadurch könnte z.B. gewährleistet werden, daß eine Aktivierung in der richtigen Umgebung und zum richtigen Zeitpunkt geschieht. Zum Beispiel wurde demonstriert, daß CD22 mit CD45 auf CD4⁺ T-Zellen interagieren kann (Sgroi et al. 1995), also in einer Situation, wie sie bei der T_H2-Zell abhängigen B-Zell Aktivierung auftritt. Die Bindung von CD22 an α 2,6-Sia auf der benachbarten T-Zelle könnte eine mögliche Interaktion von CD22 mit dem B-Zell Rezeptor unterbrechen. Der inhibitorische Effekt von CD22 auf das BCR-Signal könnte dadurch gemindert werden, woraus eine stärkere Aktivierung der B-Zelle resultieren würde. Es wäre aber auch möglich, daß eine solche Wechselwirkung mit α 2,6-Sialinsäure auf benachbarten B- und T-Zellen generell in lymphatischen Organen zum Tragen kommen, und Retention und erleichterte Aktivierung von B-Zellen in lymphatischen Organen bewirkt (Doody et al. 1995).

Die Expression von α 2,6-Sia auf der B-Zelle selbst birgt die Möglichkeit einer Interaktion von CD22 mit Liganden auf der selben Zelloberfläche. Bekannte sialylierte Proteine auf der B-Zelle, die als Liganden für CD22 vorgeschlagen wurden, sind mIgM, B220 (die B-Zell spezifische Isoform von CD45), und auch CD22 selbst. Eine Wechselwirkung von CD22 mit dem BCR könnte daher durch eine Interaktion mit der Ectodomäne von CD22 zustande kommen (Hanasaki et al. 1995). Konkurrenz anderer Moleküle auf der Zelloberfläche wäre dann in der Lage, diese Assoziation, und damit auch das BCR-Signal, zu beeinflussen. Für eine cis-Interaktion von CD22 mit CD45 dagegen spricht, daß beide ähnliche Dimensionen haben, was ihre sialinsäureabhängige Assoziation bevorteiligt würde (Cyster and Goodnow 1997). Außerdem konnte CD45 mit CD22-Fc präzipitiert werden. Die Tyrosin-Phosphatase CD45 spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Src Kinasen, indem sie das C-terminale inhibitorische Phosphat entfernt. Unter anderem aktiviert CD45 so Lyn, die Src-Kinase, die in der Hauptsache für die Phosphorylierung und damit für die inhibitorische Funktion von CD22 verantwortlich ist.

Für die Bindung von CD22 an einen Liganden auf der selben Zelle spricht auch, daß auf Grund der hohen Expression von α 2,6-Sialinsäure auf B-Zellen die Bindungsstelle von CD22 normalerweise von endogener Sialinsäure maskiert ist (Razi and Varki 1998). Diese Maskierung könnte Assoziation von CD22 mit seinem Liganden in cis vermitteln und/oder regulieren, oder auch die CD22-vermittelte Bindung von Liganden auf anderen Zellen kontrollieren. Es gibt Hinweise darauf, daß CD22 in bestimmten Situationen demaskiert werden, und deshalb exogene sialylierte Liganden binden kann. Durch Aktivierung in vitro kann ein Teil der CD22-positiven PBMCs im Menschen demaskiert werden (Razi and Varki 1998). Darüber hinaus wurde in fluoreszenzmikroskopischen Studien gezeigt, daß eine Subpopulation von reifen (IgD^{hi}) B-Zellen im Knochenmark gegenüber den peripheren lymphatischen Organen 2-5 fach erhöht ist. Das impliziert ebenfalls eine Rolle für CD22 als Homing-Rezeptor für bestimmte B-Zellen ins Knochenmark (Floyd et al. 2000). Insgesamt ist

der Demaskierungseffekt sowie seine physiologische Bedeutung bislang aber nur unzureichend untersucht. Es ist nicht bekannt, wie die Demaskierung reguliert wird, oder ob B-Zell Subpopulationen in vivo mit demaskiertem CD22 existieren.

1.6 Zielsetzungen der Arbeit

Ein großer Teilaspekt dieser Doktorarbeit war die Etablierung zweier neuer Mausmodelle zur Untersuchung der Signaltransduktion und des Zusammenhangs zwischen Signaltransduktion und Ligandenbindung von CD22 in vivo. Das eine Mausmodell (CD22-ITIM-KO) sollte innerhalb der ITIM-Motive Phenylalanine anstelle von Tyrosinen enthalten. Die Phenylalanine können nicht wie die Tyrosine phosphoryliert werden, deshalb sind die veränderten ITIMs nicht funktionell. Positive Modulatoren des BCR-Signals sollten dagegen noch in der Lage sein, CD22-ITIM-KO zu binden (s. Abb. 3 und Abb. 2). Bei Beginn der Arbeit schien die Bindung positiver Modulatoren des BCR-Signals deutlich auf nicht-ITIM-Tyrosine beschränkt zu sein. Obwohl sich im Lauf der Zeit herausstellte, daß diese Trennung nicht vollständig klar ist, sollten laut in vitro Studien auch nach Zerstörung der ITIMs PLC γ , Lyn, PI3K, und Grb-2 (und damit auch SOS, Shc und SHIP) noch an CD22-ITIM-KO binden können. Dadurch wird eine Untersuchung der in vivo-Rolle dieser positiven Modulatoren im Zusammenhang mit CD22 möglich.

Bei dem zweiten geplanten Mausmodell, CD22-ex12-Stop, sollte die gesamte cytoplasmatische Domäne von CD22 fehlen. Mit diesem CD22-ITIM-KO komplementierenden Modell wäre es möglich, zu kontrollieren, ob die Effekte der Signaltransduktion von CD22, die in CD22-ITIM-KO zu beobachten sind, tatsächlich auf den Einfluß der an die nicht-ITIM Tyrosine bindenden positiven Modulatoren zurückzuführen sind. Beide Mausmodelle sollten außerdem der Aufklärung eines möglichen Zusammenhangs zwischen der Signaltransduktion von CD22 und der Ligandenbindung des Moleküls dienen.

Die korrekte Expression von CD22-ITIM-KO, und dessen Funktionalität hinsichtlich SHP-1 Bindung sollte vor oder während der sehr aufwendigen Herstellung des CD22-ITIM-KO Mausmodells getestet werden. Dazu sollte CD22-ITIM-KO Expressionsvektor basierend auf einer CD22-Wildtyp cDNA kloniert, und CD22-ITIM-KO in einer geeigneten B-Zelllinie exprimiert werden. Außerdem sollte mit einem solchen in vitro System ein Werkzeug zur Untersuchung des durch die zerstörten ITIMs geänderten Einflusses von CD22 auf die BCR-Signaltransduktion geschaffen werden.

Eine enge Verknüpfung der inhibitorischen Funktion von CD22 mit der Bindung von α 2,6-sialylierten Liganden an CD22 in cis wurde während der Zeit dieser Doktorarbeit evident (Jin et al. 2002; Kelm et al. 2002). Die Bindungsstelle von CD22 ist meist konstitutiv von endogener α 2,6-Sialinsäure maskiert. Trotzdem gibt es Hinweise darauf, daß diese Interaktion reguliert ist, und unter bestimmten Umständen (z.B. Aktivierung) aufgehoben werden kann (Razi and Varki 1998). Ein weiteres Ziel dieser Doktorarbeit war es, regulatorische Signale zu identifizieren, die die Bindung von α 2,6-Sia an CD22 beeinflussen können. Weiterhin sollte der Versuch unternommen werden, B-Zell Subpopulationen mit demaskiertem CD22 ausfindig zu machen, und zu untersuchen, durch welche Charakteristika sich diese Populationen auszeichnen.

Schließlich sollte der Einfluss von CD22 auf die Entwicklung einer bestimmten B-Zell Subpopulation der Milz, den sog. Marginalzonen B-Zellen (engl.: marginal zone B-cells, MZ B-cells) untersucht werden. MZ B-Zellen befinden sich ausschließlich in der Peripherie der periarteriolen lymphatischen Scheide (PALS) der Milz (Martin and Kearney 2000), und sind zusammen mit den B1 B-Zellen die für TI-2 Immunantworten hauptverantwortliche B-Zell Population. Die BCR-Signalstärke übt neben anderen Aspekten einen großen Einfluß auf die Entwicklung von MZ- und B1 B-Zellen aus. CD22 ist ein wichtiger Regulator des BCR-Signals. CD22-/- Mäuse zeigen außerdem reduzierte TI-2 Antworten bei normalem B1 B-Zell

Kompartiment. Es bestand deshalb Anlaß zu der Vermutung, daß die Anzahl von MZ B-Zellen in CD22^{-/-} Mäusen reduziert sein könnte. Die Größe des MZ B-Zell Kompartiments in CD22^{-/-} Mäusen und die Konsequenzen einer evtl. Verkleinerung für die Antwort gegen TI-2 Antigene sollte deshalb untersucht werden.

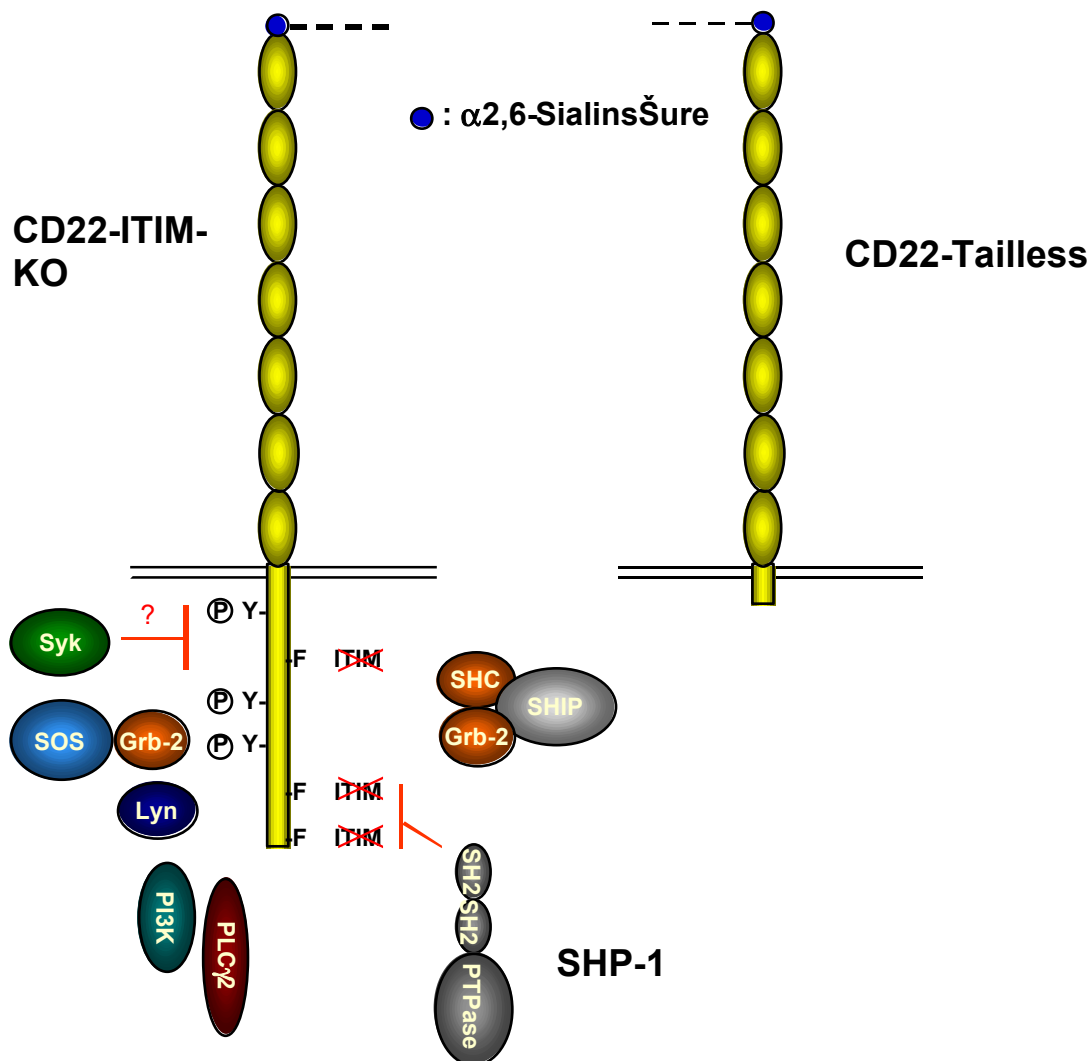


Abb. 3: Zwei geplante Mausmodelle zur Untersuchung der Signaltransduktion von CD22 in vivo. Linke Seite: CD22-ITIM-KO: Die Tyrosine in den ITIMs sind zu Phenylalaninen mutiert. Erwartet wird, daß die signalinhibierende Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-1 nicht mehr mit CD22 interagieren und damit aktiviert werden kann. Im Gegensatz dazu wird eine Bindung der positiven B-Zell Signalmodulatoren PLC γ , Lyn, PI3K, und Grb-2 noch möglich sein. Auch eine Bindung von SHIP als Teil eines SHIP-Grb2-Shc Komplexes ist möglich. Rechte Seite: CD22-Tailless: Ein Stopcodon im Exon 12 führt zur Expression eines CD22 Moleküls ohne cytoplasmatische Domäne. Dieses Mausmodell wird CD22-ITIM-KO komplementieren. Beide Modelle werden zudem der Aufklärung von Zusammenhängen zwischen der Signaltransduktion und der Adhäsionsfunktion von CD22 dienen.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Bakterienstämme

***E.coli*NM522:** (F[']lacIq Δ(lacZ)M15 proA⁺ proB⁺ Δ(hsdMS-mrcB)5 Δ(lac-proAB) supE thi-1 lambda)

diente anfangs als Klonierungsstamm

***E.coli*DH5α:** F['] delta(lacZYA-argF)U169 phi80delta(lacZ)M15 endA1 recA1 hsdR17 deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1 rpsL lambda-

wurde im späteren Verlauf dieser Doktorarbeit als Standard-Klonierungsstamm verwendet

***E.coli*BNN132:** endA1 gyr96 hsdR17 supE44 relA1 delta(lac-proAB) (F[']traD36 proA⁺ proB⁺ lacIq delta(lacZ)M15) lambdaKC(kan-cre)

diente zum Test der Funktionalität von loxP-Sequenzen in verwendeten Targetingkonstrukten.

***E.coli*JM110:** F['][traD36 proA⁺ proB⁺ lacIq delta(lacZ)M15] dam dcm supE44 hsdR17 thi leu thr rpsL lacY galK galT ara tonA tsx delta(lac-proAB) lambda

diente als Wirtsstamm für Plasmide, die mit Methylierungs-sensitiven Restriktionsendonukleasen geschnitten werden sollten.

2.1.2 Chemikalien

Laborchemikalien waren, wenn nicht anders angegeben, von Roth (Karlsruhe) oder Merck (Darmstadt)

2.1.3 Mehrfach verwendete Puffer und Lösungen

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

PBS (phosphatgepufferte Saline)

8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄, 0,133 g CaCl₂·2H₂O, 0,1 g MgCl₂·6H₂O mit HCl auf pH7,2

FACS-Puffer

1 x PBS, 0,1% BSA, 0,01% NaN₃

2.1.3 Oligonukleotide

Oligonukleotide waren von BIG-Biotech (Freiburg) (NAPTM-gereinigt und lyophilisiert oder in H₂O bzw. TE gelöst)

2.1.4 Enzyme für die Klonierung

Restriktionsenzyme waren von MBI Fermentas, Heidelberg. KF (Klenow-Fragment der DNA-Polymerase 1) und CIP (Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm) waren ebenfalls von MBI, SAP (Shrimp alkalische Phosphatase) war von Boehringer-Mannheim, T4 DNA-Ligase (hochkonzentriert) war von Gibco/Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.5 Nährmedien und Lösungen für die Zellkultur

EF-Medium (Medium für embryonale Fibroblasten (EMFIs))

DMEM 1x (Dulbecco's modified eagle Medium), Pyruvat 1 mM, Glutamin (2 mM), Penicillin (100 U/mL), Streptomycin (100 µg/mL), NaHCO₃ 0,375% (w/v), β-Mercaptoethanol 0,1 mM, + 15% FCS

Alle Zutaten waren von Gibco/Invitrogen (Karlsruhe).), β-Mercaptoethanol war zunächst von Roth (Karlsruhe), später von Gibco/Invitrogen. FCS war von Gibco/Invitrogen oder von PAN (Aidenbach). Das Medium wurde zunächst mit vom hauseigenen Service aliquotierten Reagenzien vom hauseigenen Service angesetzt. Ausnahmen: β-Mercaptoethanol war von Roth (p.a.) und wurde als 0,1 M Stammlösung eingesetzt und unmittelbar vor der ersten Verwendung des Mediums zugegeben, ebenso das FCS.

Später wurde fertiges Flüssigmedium von Gibco/Invitrogen in Kunststoffflaschen verwendet, und sämtliche Supplemente selbst aliquotiert und zugefügt:

ES Zell Medium

ES-Zell-Medium wurde angesetzt wie EF-Medium, jedoch wurde zusätzlich CHO-LIF-Überstand (s. Punkt 2.2.3.3) und gegebenenfalls Geneticin 0,4 mg/mL (Gibco/Invitrogen) oder Ganciclovir 2 µM (Sigma, Taufkirchen) zugegeben. Für die Transfektionen in E14Tg2a gegen Ende der Doktorarbeit wurde anstatt des CHO-LIF-Überstandes bakteriell hergestelltes rekombinantes LIF (ESGRO, Chemicon,) zum Nährmedium gegeben.

Einfriermedium für ES-Zellen

Zur Langzeitpreservierung wurden Zellen in diesem speziellen Medium mit dem Kryopreservationsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) gemischt und eingefroren. Zunächst wurde ein Medium auf DMEM Basis verwendet. Es bestand aus:

40% DMEM, 50% FCS, 10% DMSO

Später wurde die Zusammensetzung für Einfriermedium geändert, da mit einer neuen Rezeptur die Anzahl lebender Zellen nach Wiederauftauen höher war:

90% FCS, 10% DMSO

Injektionsmedium für die Blastozysteninjektion

Zur Vorbereitung der Injektion von ES-Zellen in Blastozysten wurden die ES-Zellen nach Trypsinierung in speziellem Medium mit ausschließlich den folgenden Bestandteilen aufgenommen:

DMEM, β -Mercaptoethanol 0,1 mM, + 10% FCS

Medien für die Blastozystenisolierung

M2 und M16-Medium und embryonengetestetes Parafinöl waren von Sigma (Taufkirchen)

Medium für B-Zelllinien und primäre Milzzellen

Für die Kultivierung von J558L μ m3-Zellen wurde RPMI-Medium 1640 (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) + 10% FCS, 2 mM Glutamin, 50 U/mL Penicillin, 50 mg/mL Streptomycin, 0,1 mM β -Mercaptoethanol verwendet.

Zeocin (Invitrogen, Karlsruhe)

Einfriermedium

Einfriermedium bestand aus 50% RPMI, 40% FCS, und 10% DMSO

2.1.6 Zelllinien

J558L μ m3-8ASia, ein mit α 2,6-Sialyltransferase transfiziertes Derivat von J558L μ m3 (Hombach et al. 1988), wurde von Judith Gerlach in unserer Arbeitsgruppe hergestellt, und mir freundlicherweise überlassen.

2.1.7 ES-Zelllinien

C57BL/6-III (Ledermann and Burki 1991) war, so wie BALB/c-I (BALB/c) (Noben-Trauth et al. 1996), ein Geschenk von Birgit Ledermann, Universität Zürich-Irchel, an Lars Nitschke. E14Tg2a (129/ola) (Kuehn et al. 1987) war ein Geschenk von Michael Sendtner, Universität Würzburg. WW6 (75% 129/Sv, 20% C57BL/6, 5% SLJ) (Ioffe et al. 1995) war ein Geschenk von Burkhard Kneitz, Universität Würzburg.

2.1.8 Versuchstiere

CD22^{-/-} Mäuse auf C57BL/6-Hintergrund stammten, ebenso wie C57BL/6-Wildtyp Mäuse aus unserer (AG Nitschke) eigenen Zucht. Zusätzliche C57BL/6 Mäuse kamen aus der Hauszucht. BALB/c Mäuse kamen aus der Hauszucht oder von Charles-River (Sulzfeld). Vasektomierte Männchen waren ebenfalls von Charles-River.

2.1.9 Färbe-Reagenzien für die Durchflußcytometrie

Alle verwendeten Antikörper waren, wenn nicht anders angegeben, gegen Maus gerichtet.

In der Arbeitsgruppe hergestellte Antikörper:

anti-IgM-FITC (Klon 29-11C), anti-CD21-bio (Klon 7E9), anti-IgD-bio (Klon 11-26C), anti-Fc-Rezeptor (Klon 2.4G2)

Erworbene Antikörper (wenn nicht anders angegeben von Pharmingen, Hamburg):

anti-CD22-FITC, anti-CD22-PE, anti-CD21-FITC, anti-CD23-FITC, anti-CD23-bio, anti-B220-Cychrome (Cy), anti-B220-PE, anti-CD69-bio, anti-CD86(B7.2)-bio, anti-CD25-bio, Ziege anti-IgM-PE (Fab)₂- Fragment (Fa. Camon, Hamburg)

Andere Reagenzien

CD22-Fc war ein Geschenk von Paul Crocker, Universität von Dundee, Dundee, Schottland

NeuGc-PAA-bio (NeuGc α 2,6lacNAc-Polyacrylamid) war ein Geschenk von Nicolai Bovin, Universität von Moskau, Moskau, Rußland

NeuGc-SA-FITC (NeuGc α 2,6lacNAc-(Streptavidin)₂-AP) war ein Geschenk von Jim Paulson, Universität von Kalifornien in San Diego, San Diego, USA

Sialidase (*Vibrio cholerae*) war von Roche (Mannheim)

Sekundär-Reagenzien

anti-Mensch-IgG-FITC, Streptavidin-(SA)-FITC, SA-PE, SA-Red670

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit DNA

2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab

Für analytische Verdaue von Plasmiden wurde Plasmid-DNA im kleinen Maßstab präpariert. Bakterien einer 3 mL Übernachtskultur in LB (+Ampicillin 100 μ g/mL) wurden abzentrifugiert, in 300 μ L eiskaltem Puffer 1 (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10mM EDTA, 100 μ g/mL RNase A) aufgenommen, Lyse der Bakterien folgte in 300 μ L Puffer 2 (200 mM NaOH, 1% SDS) für 5 min bei Raumtemperatur. Zelltrümmer, Proteine und genomische DNA wurden durch Zugabe von 300 μ L Puffer 3 (3 M KAc, pH 5,5) DNA präzipitiert. Die präzipitierten Bestandteile wurden bei 13000 rpm, 4°C für 10 min abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol die DNA gefällt, und durch Zentrifugation bei 13000 rpm, 15 min, 4°C pelletiert. Das Pellet wurde einmal mit 70% Ethanol (RT) gewaschen, und in einem geeigneten Volumen Wasser (ca. 20 μ L) aufgenommen. Bis zur Verwendung wurde die DNA bei -20°C gelagert.

2.2.1.2 Präparation von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte wie in der Beschreibung zum Qiagen Plasmid Präparations Kit (Qiagen, Hilden). Mit einer einzelnen Bakterienkolonie wurde eine 3 mL Übertagkultur in LB-Medium gezogen. Diese Kultur wurde 1/100 bis 1/500 in 100 mL LB (+Ampicillin 100 μ g/mL) verdünnt. Die große Kultur wurde über Nacht gezogen. Am nächsten Morgen wurden die Bakterien durch Zentrifugation 6000 rpm, 15 min, 4°C geerntet. Das Pellet wurde in Puffer 1 aufgenommen, Bakterienlyse und Zelltrümmerpräzipitation folgten mit Puffer 2 bzw. Puffer 3 wie unter 2.2.1.1. Durch Zentrifugation (13000 rpm, 30 min + 25 min, 4°C) bzw. mit einer Qiagen Filterkartusche wurde das Präzipitat vom Überstand abgetrennt. Die DNA wurde aus dem Überstand mittels einer DEAE-Säule gereinigt (s. Qiagen-Protokoll). Aus dem Eluat wurde die DNA mit 0,7 Volumen Isopropanol präzipitiert, und durch Zentrifugation bei 13000 rpm, 30 min, 4°C pelletiert. Das Pellet wurde mit 70% EtOH gewaschen und erneut für 10 min zentrifugiert. Die DNA wurde in einem geeigneten Volumen Wasser aufgenommen. Die Konzentration wurde photometrisch und auf dem Agarosegel bestimmt. Bis zur Verwendung wurde die DNA bei -20°C gelagert.

2.2.1.3 DNA-Gelelektrophorese

Agarosegele (0,6-1,2%) unterschiedlicher Größe wurden mit TBE-Puffer (45 mM Tris-Borat, 1 mM EDTA, pH 8,0) und Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 μ g/mL) hergestellt. DNA-Proben wurden vor dem Laden auf das Gel mit 1/5 Volumen 6X-Ladepuffer (30% (v/v)

Glycerin, 0,2% (w/v) Bromphenolblau, 0,2% (w/v) Xylencyanol, Wasser) versetzt. Die Elektrophorese-Läufe erfolgten in unterschiedlich großen Gelkammern (hauseigene Produktion) bei 100-140 V für 1-2 h (für Southern Blot Gele 30-40 V über Nacht, s. dort). Die gefärbten Banden wurden nach dem Lauf mit einem Transiluminator sichtbar gemacht, und mit einem Digital-Geldokumentationssystem (Cybertech) festgehalten.

Verwendete Längenstandards: 100 bp gene-ruler (MBI), 1 kb gene ruler (MBI), genomic-marker II (MBI), λ HindIII (hergestellt in der Arbeitsgruppe)

2.2.1.4 Fällung von DNA

DNA wurde aus wässrigen Lösungen durch Zugabe von 2,5 Volumen Ethanol oder 0,7 Volumen Isopropanol (jeweils RT) gefällt. Nach Zugabe des Alkohols wurde gründlich gemischt, und die DNA durch sofortige Zentrifugation bei 13000 rpm, 4°C für 10-20 min pelletiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und in Wasser aufgenommen.

2.2.1.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von wässrigen DNA-Lösungen wurde entweder durch Analyse auf Agarosegelen und Vergleich mit einem Mengenstandard, oder spektrophotometrisch bestimmt. Zur photometrischen Bestimmung wurde DNA entsprechend der erwarteten Konzentration 1:25-1:50 vorverdünnt, und die Absorption dieser Probe bei $\lambda = 260$ nm gemessen. Die Absorption wurde in eine Konzentration gemäß der Beziehung $1 A_{260} \equiv 50 \mu\text{g/mL DNA}$. Auf die Reinheit der DNA wurde aus dem Verhältnis A_{260}/A_{280} geschlossen.

2.2.1.6 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen wurden entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt. Inkubation erfolgte für analytische Verdaue für ca. 2 h, für präparative Verdaue mindestens 4 h. Für Southern Blots wurden höher konzentrierte Enzyme über Nacht eingesetzt (s. dort).

2.2.1.7 Dephosphorylierung von DNA-Enden mit alkalischer Phosphatase

Die Enden restriktionsverdauter Plasmide wurden vor Einsatz zur Ligation mit Alkalischer Phosphatase dephosphoryliert, um Religation einfach verdauter bzw. unvollständig mit zwei verschiedenen Enzymen verdauter Vektoren zu vermeiden. Dazu wurden 50 μL -Ansätze mit 1,5-2,5 μg DNA, 10 μL 5X CIP-(calf intestine phosphatase, engl.: Kälberdarm-Phosphatase)-Puffer (MBI, Heidelberg), und 10 Einheiten CIP für 30-40 min bei 37°C inkubiert. Vor weiterer Verwendung wurde der Ansatz über eine DEAE-Ionenaustauscher-Säule gereinigt (Qiagen Nucleotide Removal Kit, Qiagen, Hilden).

Alternativ zur CIP von MBI wurde Shrimp alkalische Phosphatase (SAP) von Boehringer Mannheim mit einem äquivalenten Protokoll verwendet. SAP ist im Gegensatz zu CIP bei 80°C, 20 min vollständig Hitze-inaktivierbar.

2.2.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten mit stumpfen oder überhängenden Enden wurden Vektor- und Insert-DNA im Verhältnis von 1:4 – 1:10 gemischt. Es wurden 5x Ligasepuffer und ca. 5 Einheiten Ligase (T4-DNA-Ligase, high concentrated, Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) zugegeben, und der Ansatz auf höchstens 20 μL mit H_2O aufgefüllt. Der Ansatz wurde 1 h (überhängende Enden) bis 3 h (stumpfe Enden) bei Raumtemperatur inkubiert. Ein Teil des Ansatzes wurde direkt zur Transformation in Bakterien verwendet.

2.2.1.9 Transformation von Bakterien

Zur Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien wurde DNA in einem gekühlten (0°C) Eppendorf-Gefäß vorgelegt, und mit 100-200 µL kompetenten Bakterien (meist *E.coli*/DH5α) gemischt. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert, für 90 sec auf 42°C erhitzt, und dann nochmals für 2 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde dann zu 800 µL vorgewärmtem LB-Medium in einem 15 mL Röhrchen gegeben, und unter Schütteln 40 min inkubiert. Unterschiedliche Volumina dieses Ansatzes wurden dann auf LB-Platten mit Ampicillin plattiert.

2.2.1.10 Anlegen von Glycerinkulturen von Bakterien

Zur Langzeitkonservierung von Bakterien, die ein wichtiges Plasmid tragen, wurden Glycerinkulturen angelegt. Zu 900 µL Bakterienkultur in der logarithmischen Wachstumsphase wurden 100 µL wasserfreies Glycerin gegeben, und gründlich gemischt. Die Glycerinkulturen wurden bei -80°C gelagert.

2.2.1.11 Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

PCR-Reaktionen wurden in einem T3-Thermocycler von Biometra (Göttingen) durchgeführt. Die Reaktionskomponenten bzw. Reaktionsbedingungen für Standardreaktionen sind nachfolgend aufgeführt:

Standardreaktionskomponenten:

- Wasser (HPLC-Grad, Roth, Karlsruhe)
- PCR-Puffer (1X): 10 mM Tris-HCl, pH 9,0, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100, 0,01% (w/v) Stabilisator (HT Biotechnology LTD, Cambridge, England)
- Primer: 0,2-0,3 µM jeder, es wurden meist 20mere mit einem GC-Gehalt von 50-60% gewählt, und entsprechend ihrer berechneten Schmelztemperatur paarweise eingesetzt
- dNTPs: 0,2 mM jedes (MBI, Heidelberg)
- DNA (Matrize): ca. 100-300 ng genomische DNA bzw. 10-50 ng Plasmid-DNA
- Taq-Polymerase: 0,5 Einheiten pro Reaktion Super Taq (HT Biotechnology LTD, Cambridge, England)

Standardreaktionsbedingungen

- 95°C 3-5 min initiale Denaturierung der DNA
- 95°C 20 sec Denaturierung
- 50-60°C 20 sec Primer-Hybridisierung, je nach Schmelztemperatur des verwendeten Primerpaares
- 68-72°C 1-2 min Extension (68°C ergibt bessere Amplifikation von größeren Produkten über 1-2 kb)
- 68-72°C 4-5 min
- 4°C ∞

(die Schritte 2-4 wurden 30-35 mal durchlaufen)

Sämtliche Reaktionskomponenten wurden auf Eis zusammenpipettiert, und in den Thermocycler gestellt, sobald das gestartete Programm bei einer Temperatur von mind. 80°C angelangt war. Spezielle PCR-Anwendungen (PCR-Screening von ES-Zellen, Koloniescreening von Bakterienkolonien, Ortsgerichtete Mutagenese klonierter DNA-Abschnitte) s. die entsprechenden Abschnitte.

2.2.1.12 Reinigung von DNA mittels Ionenaustauscher-Säulen (Qiagen)

Die Reinigung von DNA aus z.B. enzymatischen Reaktionen erfolgte mit dem Qiagen Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Hilden). Prinzip ist die Bindung der DNA an eine Membran mit Silicageloberfläche. Nach Waschschritten zur Entfernung von RNA und Verunreinigungen erfolgte Elution mit H₂O. Die Reinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Ein genaues Protokoll ist im QIAquick Handbuch zu finden.

2.2.1.13 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das gewünschte DNA-Fragment wurde unter Verwendung einer UV-Lampe ($\lambda = 300 \text{ nm}$) mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Die Reinigung folgte mit dem Qiagen Gel Extraktions-Kit (Qiagen, Hilden). Das Gelstück wurde für 10 min bei 50°C in einem Puffer mit chaotrophen Salzen gelöst, die weitere Reinigung erfolgte wie unter 2.2.1.12.

2.2.1.14 Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung von PCR-Ansätzen, meist zur Vorbereitung der Sequenzierung von PCR-Produkten, erfolgte mit dem PCR-Reinigungs-Kit von Qiagen (Qiagen, Hilden). Prinzip ist auch hier die Adhäsion von DNA an eine Silicamembran. Die Waschbedingungen sind so gewählt, daß Nukleotide, Primer, und kurze doppelsträngige DNA-Moleküle entfernt werden. Nur längere doppelsträngige DNA-Moleküle werden im fertigen Eluat gewonnen. Die weitere Reinigung erfolgte wie unter 2.2.1.12.

2.2.1.15 Auffüllen von überhängenden DNA-Enden mit Klenow-Polymerase

Um DNA-Enden mit ungleichen 5' -Überhängen miteinander ligieren zu können, wurden die Überhänge mit Klenow-Polymerase (KF) aufgefüllt. Die resultierenden stumpfen Enden konnten dann miteinander verknüpft werden. In einem typischen Ansatz wurden 3-5 µg geschnittene DNA, 4 µL 10X KF-Puffer (MBI, Heidelberg), 1 µL dNTPs (2 mM jedes), und 10 Einheiten KF (MBI, Heidelberg) auf 40 µL mit Wasser aufgefüllt, und für 15 min bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde dann entweder über ein Gel gereinigt und geextrahiert, oder mit dem Qiagen Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Hilden) gereinigt.

2.2.1.16 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Zur kontrollierten Ausbildung von Doppelsträngen von zueinander komplementären Oligonukleotiden wurden diese auf 70°C im Wasserbad erhitzt, und 2 min bei dieser Temperatur inkubiert. Dann wurde das Wasserbad ausgeschaltet, und der Ansatz verblieb solange darin, bis er ungefähr auf RT abgekühlt war. Sollte ein geschnittenes Plasmid mit dem hybridisierten Oligonukleotid ligiert werden, so wurde dies nach dem Abkühlen zugegeben, und eine Ligations-Reaktion wie unter 2.2.1.8 durchgeführt. Die zueinander komplementären Oligonukleotide wurden dabei in der Regel so entworfen, daß bei Hybridisierung die in der nachfolgenden Ligation benötigten Überhänge bereits erzeugt wurden.

2.2.1.17 PCR-Screening von Bakterienkolonien

Der Erfolg von Ligationen von DNA-Fragmenten mit Vektoren wurde wenn möglich mit PCR überprüft. Als Template diente Material von Bakterienkolonien, die direkt aus der Transformation des Ligationsansatzes hervorgingen. Die Primer wurden so gewählt, daß das PCR-Produkt des Vektors mit Insert gegenüber dem Produkt des religierten Vektors eine detektierbare Veränderung enthielt (z.B. Größenänderung, neue Restriktionsschnittstelle).

Ein PCR-Master-Mix entsprechend den allg. Reaktionsbedingungen wie unter 2.2.1.11 wurde angesetzt, und auf die gewünschte Anzahl einzelner Ansätze verteilt. Mit einer gelben Pipettenspitze wurde Material einer Bakterienkolonie aufgenommen, und in einen der Ansätze übertragen. Der Rest des Materials wurde auf eine LB-Amp-Platte gestrichen. Mit der gewünschten Anzahl von Kolonien wurde so verfahren. Die LB-Platte wurde dann bei 37°C inkubiert, und die PCR durchgeführt. Wurden bei Analyse der PCR Kolonien mit dem gewünschten Insert detektiert, so wurde der Master-Platte zum Animpfen einer Übernachtskultur verwendet.

2.2.1.18 Ortsgerichtete Mutagenese klonierter DNA-Abschnitte

Um Mutationen in klonierte DNA-Sequenzen von Plasmiden einzuführen, wurden mit Hilfe degenerierter zueinander komplementärer Mutageneseprimer und zweier überlappender Primer (Amp2 bzw. Amp1) im β -Lactamase-Gen zwei Produkte amplifiziert, die die Mutationen enthalten, und zusammen sämtliche Plasmidsequenzen umspannen. Die PCR Ansätze wurden direkt mit DpnI verdaut, einem Restriktionsenzym, daß methylierte GATC Sequenzen schneidet. Die als Matrize dienende Plasmid-DNA wurde dadurch zerstört. Nach zweistündigem Verdau und Hitzeinaktivierung des Enzyms wurden äquimolare Mengen beider Produktes vereint, und direkt in *E.c.DH5 α* transformiert. Einzelne Klone wurden am nächsten Tag auf die gewünschten Mutationen überprüft (meist durch Koloniescreening).

2.2.1.19 Sequenzierung von DNA

Zur Sequenzierung von DNA stand ein AbiMed Prism 310 Sequenzierer von Perkin-Elmer zur Verfügung. Vier verschieden fluoreszenzmarkierte ddNTPs werden in eine thermozyklische Sequenzierreaktion eingesetzt, die Produkte kapillarelektrophoretisch getrennt, und an einer Analyseeinheit vorbei geführt.

Ein Sequenzieransatz bestand aus folgenden Komponenten:

- 0,5 – 1 μ g Plasmid-DNA
- 75 ng Primer
- 4 μ L „Abi Prism Big Dye DNA Sequencing Kit“ (Perkin-Elmer)
- Wasser ad 10 μ L

Die Reaktion wurde in einem T3-Thermocycler von Biometra wie folgt durchgeführt:

1. 96°C 10 sec
2. 50°C 5 sec
3. 60°C 4 sec

Schritt 1-3 25 Zyklen

Nach Ablauf der Reaktion wurden die Reaktionsprodukte in einem Eppendorf-Reagiergefäß durch Zugabe von 90 μ L Wasser, 10 μ L NaAc, pH 5,2, und 250 μ L EtOH gefällt, und bei 14000 rpm für 20 min zentrifugiert, und damit pelletiert. Das Pellet wurde dann zweimal mit 70% EtOH gewaschen, in 15 μ L TSR (engl.: template supressive reagent, Matrizen-Unterdrückungs-Reagenz, Perkin-Elmer) aufgenommen, 2 min bei 94°C denaturiert, und sofort auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde der Ansatz in ein spezielles Röhrchen (Genetic Analyser Tube, Perkin-Elmer) überführt, und im AbiMed Prism 310 analysiert.

2.2.1.20 Direkte Sequenzierung von Abschnitten von Plasmid-DNA oder genomischer DNA

Als Matrize für die Sequenzierung wurde zunächst Plasmid-DNA verwendet. Im späteren Verlauf der Arbeit wurde der zu sequenzierende DNA-Abschnitt PCR-amplifiziert, und das

Produkt direkt in die Sequenzierreaktion eingesetzt („direkte Sequenzierung“). Die Qualität der Sequenzierungen wurde durch dieses Vorgehen erheblich gesteigert.

Direkte Sequenzierung war auch die ideale Möglichkeit, die Korrektheit der eingeführten Mutationen in homolog rekombinierten ES-Zell Klonen zu bestätigen. Mittels geschachtelter PCR konnte spezifisch der zu sequenzierende Abschnitt auf dem rekombinierten Allel amplifiziert, und anschließend sequenziert werden. Zur Erhöhung der Spezifität wurde die Reaktion nach der ersten Runde auf einem Agarosegel aufgetrennt, und die entsprechende Bande mit dem Qiagen Gel-Extraktions Kit isoliert. 1/50 bis 1/25 Produkt aus der ersten Runde wurde in die zweite Runde eingesetzt. Später wurde auf die Gelreinigung zwischen den Reaktionen verzichtet. Es erwies sich als ausreichend, wenig Produkt aus der ersten in die zweite Runde zu überführen. Um Kontamination der Reagenzien bei der sehr empfindlichen geschachtelten PCR durch z.B. Targeting-Vektor auszuschließen, wurde als Kontrolle parallel jeweils eine Reaktion ohne Template durchgeführt. Nach der Amplifikation wurden die Ansätze gereinigt (Qiagen Nucleotide Removal Kit), und in Wasser aufgenommen. Die Sequenzierung wurde durchgeführt wie beschrieben. Hier wurden 75 ng PCR-Produkt, 70 ng Primer, und 4 µL Sequenziermix je 10 µL Reaktion eingesetzt.

Bei der direkten Sequenzierung plasmidaler DNA wurde entsprechend vorgegangen.

2.2.1.21 PCR-Screening zur Identifikation homolog rekombinierter ES-Zell Klone

Die Etablierung der geschachtelten PCR zur Identifizierung homolog rekombinierter ES-Zell Klone ist unter 3.1.5 beschrieben. Letztlich wurde wie folgt vorgegangen:

Es wurde ein Master-Mix für 50 PCR-Reaktionen auf Eis pipettiert bestehend aus

250 µL Taq-Puffer

50 µL dNTPs (10 mM je dNTP)

50 µL Primer 1 (60 ng/µL)

50 µL Primer 2 (60 ng/ µL) Endkonzentration der Primer jeweils 0,2 µM

5 µL Taq Polymerase (= 0,5 u/Reaktion)

1895 µL H₂O

Die Zutaten wurden gründlich gemischt, und jeweils 46 µL in ein 200 µL PCR-Gefäß pipettiert. 4 µL Einzelklonlysate (s. Punkt 2.2.3.8) wurden auf Eis zugegeben, und die Reaktion dann in einem T3-Thermocycler von Biometra durchgeführt.

96°C 5 min

95°C 25 sec

56°C 25 sec

68°C 2 min

68°C 5 min

4°C ∞

Schritt 2.-4.: 1. Runde 25 Zyklen, 2. Runde 35 Zyklen

1/10 der Reaktion aus der ersten Runde (5 µL) wurde dabei jeweils in die Reaktion der zweiten Runde überführt. 20 µL jeder Reaktion wurde nach Ablauf der Reaktion auf einem Agarosegel analysiert. Die Primer für das CD22-ITIM-KO Screening waren YFnes4 und OLneo7 in der ersten Runde, und YFnes5 und OLneo8 in der zweiten Runde. Die Hybridisierungstemperatur für die Primer war 57°C. Die Primer für das CD22-ex12-Stop

Screening waren CD22in10-1 und tk3`2 und CD22in10-2 und tk3`-3 für die erste bzw. zweite Runde.

Da die Ergebnisse der PCR zur Identifizierung homolog rekombinierter ES-Zell Klone nicht immer zufriedenstellend verliefen, wurden im späteren Verlauf der Doktorarbeit einige Parameter nochmals optimiert, und zum Teil neue Primer eingesetzt. Als entscheidend erwies sich eine Veränderung des Volumens, daß aus der ersten in die zweite Reaktion überführt wurde. Statt der bisher üblichen 5 µL wurden nur noch 2 µL überführt. Dadurch reduzierte sich der oft zu sehende Schmier, und Banden waren selbst in Fällen zu sehen, bei denen unter alten PCR-Bedingungen die Qualität des Lysates nicht ausreichend war. Schließlich wurden bei gleichem PCR-Programm folgende veränderte Bedingungen beim Screening verwendet:

- Primer: 1.Runde CD22in10-5/tk3`-1, 2.Runde CD22in10-3/tk3`-3
- Primerkonzentrationen: 1.Runde: 0,2 µM, 2.Runde: 0,3µM
- Lysatvolumen in der ersten Reaktion: 5 µL
- übertragenes Volumen aus der ersten in die zweite Runde: 2µL

2.2.1.22 Präparation von genomischer DNA von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen)

Die homologe Rekombination von Targetingkonstrukten in ES-Zellen wurde im Southern Blot von genomischer DNA der jeweiligen Klone bestätigt. Zusätzlich wurde mit der genomischen DNA die PCR, die zur Identifikation von positiven Klonen führte, wiederholt. Um DNA zu gewinnen, wurden zunächst ES-Zellen bis zur Konfluenz auf gelatinebeschichteten Zellkulturflaschen ohne EMFIs kultiviert. Typischerweise wurde eine mittlere Flasche verwendet. Die Zellen wurden trypsinisiert wie beschrieben, und das Trypsin dann mit Medium inaktiviert. Das Zellpellet wurde 3 mal mit eiskaltem PBS gewaschen, und dann in einem 15 mL Falcon-Röhrchen in ca. 0,5 mL Lysispuffer 1 aufgenommen. Lysispuffer 2 wurde dann zugefügt und sofort gemischt, bis sich die Zellsuspension aufklärte, typischerweise nach Zugabe von 2,5-5 mL. Dem Lysat wurde sofort Proteinase K zugegeben (EK 0,2 mg/mL) und der Ansatz über Nacht bei 56°C im Wasserbad unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Lysat mit Phenol/Chloroform-Lösung extrahiert. Dazu wurde 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) (Roth, Karlsruhe) zugegeben, und das Röhrchen invertiert, bis die Proteine als weißer Niederschlag erkennbar wurden. Nach Zentrifugation bei 4300 rpm, 7 min wurde mit einer Pasteurpipette mit breiter Öffnung die wässrige Phase in ein neues Röhrchen überführt. Der gesamte Vorgang wurde 3-4 mal wiederholt, bis kein Protein mehr ausfiel. Dann wurde der Phenol aus der wässrigen Phase mit Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (24:1) einmal gegenextrahiert. Mit 0,7 Volumen Isopropanol wurde die DNA aus der wässrigen Phase gefällt, mit einem Glashaken aufgewickelt, kurz mit 70% EtOH gewaschen, und schließlich in 300-500 µL H₂O über Nacht zur Lösung end-over-end rotiert. Bis zur Verwendung wurde die fertige Lösung eingefroren.

2.2.1.23 Southern-Blot zum Nachweis homologer Rekombination von Targetingkonstrukten in ES-Zellen

Die homologe Rekombination von Targetingkonstrukten in ES-Zellen wurde im Southern Blot von genomischer DNA der jeweiligen Klone bestätigt. Dazu wurde zunächst 10-15 µg genomische DNA der zu prüfenden Klone mit den entsprechenden Restriktionsenzymen über Nacht verdaut. Restriktionsenzyme wurden dabei in einem Überschuß von ca. 25 U/µg DNA eingesetzt. Deshalb wurde, wenn erhältlich, eine hochkonzentrierte Form des jeweiligen Enzyms verwendet. Der Verdau fand über Nacht statt. Am nächsten Tag wurden die Verdau auf einem 0,8%-igen Agarosegel (TBE) mit Ethidiumbromid bei 30-40 V über Nacht aufgetrennt. Das Gel wurde dann mit einem Lineal fotografiert. Für das Transferieren

auf Membran wurde meist ein Alkaliblot durchgeführt. Dazu wurde das Gel zunächst 20 min in 0,4 M NaOH Lösung bei RT geschwenkt. Dann wurde über einem Reservoir von 0,4 M NaOH ein Blot aufgebaut. Übereinander wurde eine Lage Whatman 3MM-Papier, das umgedrehte Gel, die Membran (Hybond X, Amersham, Braunschweig), 3 Lagen Whatman 3MM, und ein Stapel aus saugfähigem Papier geschichtet. Der Blot wurde mit einer Glasplatte und einem kleinen Gewicht (150-200 g) beschwert.

Durch Kapillarkräfte wurde der Puffer aus dem Reservoir langsam von dem obenauf liegenden Papierstapel aufgenommen. Damit wurde auch die DNA aus dem Gel transportiert, und assoziierte mit der geladenen Membran. Obgleich vom Hersteller der Membran von einer UV-Kreuzvernetzung nach Alkaliblot abgeraten wird, wurden hier bei zusätzlicher Durchführung bessere Ergebnisse erzielt. Dazu wurde die Membran nach dem Blotten über Nacht in 0,2% SSC, 0,1% SDS gewaschen und kurz getrocknet (20 x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,4). Die DNA wurde dann in einem UV-Kreuzvernetzer von Stratagene (Amsterdam, Niederlande) mit der Membran kreuzvernetzt. Für Prähybridisierung und Hybridisierung der 13x15 cm großen Membran wurden 20 mL QuickHyb-Hybridisierungslösung von Stratagene verwendet. Die Hybridisierung fand in einer Glasröhre statt.

Für die Sondenmarkierung wurde der Oligo labelling Kit von Gibco/Invitrogen (Karlsruhe) bzw. der NonaPrimer Kit I+II (Quantum-Appligene) verwendet. Beiden Kits zugrunde liegt die Random-Priming Methode von Feinberg und Vogelstein (Feinberg and Vogelstein 1983). 50 ng Sonden DNA-Fragment wurden bei 95°C 2 min denaturiert. Hexa- bzw. Nonanukleotide mit zufälliger Sequenz dienten als Primer zur Extension mit Klenow-Polymerase. Eines der vier eingesetzten dNTPs war dabei radioaktiv markiert (α [³²P]-dATP oder (α [³²P]-dCTP). Radioaktive dNTPs (10 μ Ci/ μ L) waren von Amersham-Pharmacia (Buckinghamshire, England). Die fertig markierte Sonde wurde mit dem Nukleotide Removal Kit von Qiagen gereinigt, und dem Prähybridisierungsansatz nach ca. 1 h Prähybridisierung bei 68°C zugegeben.

Die Inkubation bei 68°C wurde für weitere 2 h fortgesetzt. Dann wurde die Membran zunächst mit 60-70 mL 0,2% SSC, 0,1% SDS kurz gewaschen, nachfolgend dann dreimal mit 35 mL für jeweils 30 min im Hybridisierungssofen inkubiert. Die Membran wurde dann in Folie eingeschweißt und ein Röntgenfilm in einer Filmkassette damit über Nacht bei -80°C exponiert. Am nächsten Tag wurde der Film entwickelt.

2.2.2 Allgemeine Methoden der Zellkultur

2.2.2.1 Kultivieren von Säugerzellen (Lymphocyten-Zelllinien)

Zellen wurden in einem CO₂-begasteten Feuchtinkubator mit Wasserummantelung (Forma Life Sciences International GmbH, Frankfurt am Main) mit 10% CO₂ (ES-Zellen) bzw. 5% CO₂ (Lymphocyten-Zelllinien) inkubiert.

2.2.2.2 Pelletieren von Zellen

Soweit nicht anders beschrieben wurden Zellen zum Pelletieren 5 min bei 1300 rpm und 4°C in einer Megafuge R1-Zentrifuge (Heraeus, Osterode) zentrifugiert.

2.2.2.3 Kryopreservation von Zellen

Zur Langzeitlagerung wurden Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dimethylsulfoxid (DMSO) diente dabei als Kryoprotektionsmittel. Zellen wurden pelletiert wie unter 2.2.2.2. Nach Zentrifugation wurden Zellen in einem kleinen Volumen (0,5-0,7 mL) Einfriermedium aufgenommen, und langsam auf -80°C heruntergekühlt. Nach 1 Tag wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.3 Kultur und Manipulation embryonaler Stammzellen (ES-Zellen)

2.2.3.1 Präparation primärer embryonaler Fibroblasten (EMFIs) von Mäusen

ES-Zellen wurden auf einem „feeder layer“ von embryonalen Fibroblasten (EMFIs) kultiviert. EMFIs produzieren Leukaemia Inhibitory Factor (LIF), das Differenzierung von ES-Zellen verhindert (Williams et al. 1988).

Schwangeren, neomycinresistenten Mäusen wurden 13-14 Tagen nach Konzeption die Embryonen entnommen. Fruchthülle, Kopf, und fötale Leber wurden mit Pinzette und Skalpell entfernt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Embryonen mit einer 10mL Spritze durch eine 18gauge Kanüle in ein 50mL Röhrchen gepreßt, um das Gewebe grob zu zerkleinern.

Es folgte Zugabe von 5-10mL Trypsin/EDTA und Inkubation unter Schütteln im Wasserbad bei 37°C für 30 min. Ein Vol. PBS (ohne CaCl₂, ohne MgCl₂) wurde zugegeben, der Ansatz gemischt, und der Überstand nach Absetzen der groben Teile am Boden des Röhrchens bei 1300rpm, 4°C 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Das Zellpellet wurde in 20mL EF-Medium aufgenommen und auf einer 175cm² Zellkulturflasche ausgebracht.

Die restlichen Gewebestücke wurden erneut mit Trypsin/EDTA extrahiert, der gesamte Vorgang wurde 4-5 mal wiederholt.

Die EMFIs wurden bis zur Konfluenz kultiviert und dann in ca. 5 Aliquots pro Flasche bis zum Gebrauch eingefroren.

2.2.3.2 Kultur und Expansion von EMFIs

Ein Aliquot EMFIs wurde aufgetaut und auf eine 175cm² Zellkulturflasche plattiert. Bei Konfluenz wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 5mL Trypsin/EDTA 5 min inkubiert. Die Zellen wurden dann mit 13mL EF-Medium vom Boden der Flasche gelöst, und auf drei neue Kulturflaschen verteilt. Das Volumen in jeder Flasche wurde mit EF-Medium auf ca. 20mL aufgefüllt. Auf diese Weise wurden EMFIs bis zu 6 mal passagiert.

Vor der Kokultur mit ES Zellen muß weitere Zellteilung der EMFIs unterbunden werden. Das geschah durch 2h Inaktivierung in EF-Medium mit 10µg/mL MitomycinC, einem Cytostatikum. Es folgte 3 mal waschen mit PBS, Passagierung wie beschrieben, und Verteilung der Zellen auf die gewünschten Kulturgefäße.

2.2.3.3 Gewinnung von LIF (Leukaemia Inhibitory Factor) aus einer stabil transfizierten CHO-Zelllinie

Differenzierungshemmendes LIF wurde zusätzlich zur Produktion durch die EMFIs noch dem Nährmedium zugesetzt. Dazu wurde der Überstand einer stabil mit dem LIF-Gen transfizierten CHO (chinese hamster ovary)-Zelllinie, CHO-LIF, dem ES Zell Medium zugesetzt.

Zur Gewinnung des Überstandes wurden CHO-LIF Zellen in CHO-LIF Medium über mehrere Tage bis zur Konfluenz einer 175 cm²-Zellkulturflasche kultiviert. CHO Zellen wachsen adhärent, sie wurden passagiert wie EMFIs.

Nach Erreichen von Konfluenz wurden die Zellen 1 zu 3 auf frischen 175 cm²-Zellkulturflaschen plattiert, dabei wurden am Anfang 50 mL EF Medium zugegeben, und dieses bis zum erneuten Erreichen von Konfluenz nicht mehr gewechselt. Dann wurde der Überstand abgenommen, aliquotiert, und bis zur Verwendung eingefroren.

Vor der Verwendung von LIF-Überstand für Kulturmedien wurde jede Charge auf ihr Potential getestet, Differenzierung von ES-Zellen zu inhibieren. Dazu wurden ES Zellen ohne EMFIs auf Gelatine auf 24-well Platten ausgesät, und mit Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen der jeweils zu testenden LIF Charge kultiviert. Die Verdünnungen Überstand in Medium lagen dabei im Bereich 1:50 bis 1:400. Nach 4-5 Tagen wurde die Morphologie der ES Zell Kolonien beurteilt. Für die meisten der eingesetzten Chargen lag die Verdünnung, bei der keine Differenzierung der ES Zellen zu beobachten war, im Bereich 1:100 bis 1:200.

2.2.3.4 Testen von fötalem Kälberserum (FCS)

Um die Qualität neuer, bisher noch nicht verwendeter FCS-Chargen für die ES-Zell-Kultur zu beurteilen, wurden diese wie folgt getestet. ES-Zellen wurden in mehreren gleichen Verdünnungsreihen auf inaktivierte EMFIs auf 24-well Platten plattiert. Nährmedien mit unterschiedlichen FCS-Sorten wurden hergestellt, und 1-2 Reihen von Zellen mit jeweils einer Sorte Medium versorgt. Das Wachstum der Zellen die mit neuem FCS kultiviert wurden wurde dabei mit dem Wachstum der Zellen verglichen, die mit dem bis dahin verwendeten FCS versorgt wurden. Beurteilt wurden Proliferation der Zellen und Morphologie der Kolonien.

2.2.3.5 Kultur von ES-Zellen

ES Zellen wurden auf inaktivierten EMFIs und mit ES Zell Medium kultiviert. Durch die Zugabe eines Überstandes einer rekombinantes LIF erzeugenden CHO Zelllinie wurden die ES Zellen zusätzlich vor Differenzierung geschützt. Das Nährmedium wurde täglich gewechselt.

Die Zellen wurden passagiert, sobald die Kolonien eine kritische Größe erreicht hatten (i.d. Regel nach ca. 3 d). Dazu wurde zweimal mit PBS (ohne CaCl_2 , ohne MgCl_2) gewaschen, es folgte Inkubation mit 5mL Trypsin/EDTA pro 175cm² Zellkulturflasche bei 37°C für 5min. Dann wurden die Zellen durch Pipettieren von der Wand gelöst, und durch mehrmaliges auf- und abpipettieren, Ausblasen der Pipette dabei unter Druck der Pipettenspitze gegen die Flaschenwand, vereinzelt. Durch Zugabe von ca. 3 Vol. ES Zell Medium wurde das Trypsin/EDTA inaktiviert, und die Zellen anschließend bei 1300 rpm, 4°C 5 min pelletiert. Das Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert, und 3-5 fach verdünnt auf frischen EMFIs plattiert. Die Passagenzahl wurde dokumentiert.

2.2.3.6 Kryopreservation von ES-Zellen

Zellen wurden wie beschrieben trypsiniert, und das Trypsin/EDTA dann mit EF- bzw. ES-Medium inaktiviert. Als Einfriermedium für ES-Zellen wurde zunächst ein Gemisch aus 50% DMEM-Medium, 40% FCS, und 10% DMSO verwendet. Beim Auftauen der Zellen traten Probleme auf. Seit dem Gebrauch von 90% FCS, 10% DMSO waren diese behoben.

2.2.3.7 Transfektion von ES-Zellen

Zur Transfektion mit Vektor-DNA wurden ES Zellen elektroporiert. Zur Vorbereitung wurde die DNA linearisiert, gereinigt, und in sterilem Wasser bei einer Konzentration von 1-2µg/µL aufgenommen. 10-40µg DNA pro Elektroporation wurden in einer Küvette mit 0,4cm Elektrodenabstand (Biorad, München) vorgelegt. ES Zellen (82cm² oder 175cm² Flasche entsprechend 2-4·10⁷ bzw. 4-8·10⁷ Zellen) wurden wie unter 2.2.3.5 trypsiniert, jedoch nur in 0,7mL ES Zell Medium aufgenommen, und mit der vorgelegten DNA in der Küvette gemischt. Die Küvette wurde dann 5min bei RT stehengelassen. Die Elektroporation erfolgte bei 250V Eingangsspannung und einer Kapazität von 500 µF, die Zeitkonstanten τ lagen bei 7-9. Nach weiterem Ruhen bei RT für 5min wurden die Zellen auf 64cm² Zellkulturschalen mit inaktivierten EMFIs plattiert (ca. 1-5·10⁶ Zellen pro Platte)

2.2.3.8 Selektion von transfizierten ES-Zell-Klonen und Isolation einzelner Klone

Die hier verwendeten Targeting-Konstrukte trugen das Gen für Neomycin-Phosphotransferase unter Kontrolle zweier HSV Promotoren. Klone mit stabiler Integration des transfizierten Konstruktes in das Genom waren daher resistent gegen Neomycin. 24-36h nach Elektroporation wurde das Kulturmedium in den Schalen mit ES Zell Medium mit 0,4mg/mL G418 (Gibco/Invitrogen) ersetzt. Die Selektion erfolgte über 11-13d, das Medium wurde dabei jeden Tag gewechselt, und damit auch die abgestorbenen Zellen entfernt. Am Ende waren die resistenten Klone zu einer Größe angewachsen, daß sie mit bloßem Auge als dichte, weiße Kolonien zu sehen waren.

Nach der Selektion wurden einzelne Klone unter einem Mikroskop isoliert. Mit einer Pipette mit gelber Spitze (25 μ L Einstellung) wurde ein einzelner Klon in eine Vertiefung einer 96-well Platte mit 50 μ L PBS überführt (48 Klone pro Platte). Die Klone wurden bei 37°C für 5 min mit 50 μ L Trypsin/EDTA inkubiert. Dann folgte Zugabe von weiteren 100 μ L PBS pro Klon mit einer Multikanal-(12)-Pipette, und durch ca. 20-maliges auf- und abpipettieren wurden die Zellen vereinzelt. Die Hälfte der Klone wurde anschließend mit der Multikanal-Pipette direkt auf mit inaktivierten EMFIs vorbereitete 48-well Platten mit 0,5mL ES-Medium überführt.

Die Zellen auf 96-well Platten wurden abzentrifugiert, in 25 μ L H₂O aufgenommen, und bei 80°C für 10 min hypoton lysiert. Nach darauffolgender Zugabe von 25 μ L Proteinase K (0,4mg/mL, EK 0,2mg/mL) wurden die Ansätze über Nacht bei 56°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden diese Rohlysate bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Zur PCR-Analyse einzelner Klone wurden 2-5 μ L Lysat pro Reaktion eingesetzt.

2.2.3.9 Vorbereiten von ES-Zellen zur Blastozysteninjektion

ES-Zellen einer kleinen Zellkulturflasche wurden trypsinisiert wie beschrieben. Es folgte Inaktivierung in Injektionsmedium und Pelletieren der Zellen. Das Pellet wurde in Injektionsmedium aufgenommen, und die Zellen in unterschiedlicher Dichte in Vertiefungen einer 6-well Gewebekulturplatte verteilt. Die Platte wurde 30 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium mit den Zellen, die sich noch nicht gesetzt hatten abgesaugt. Mit 2 mL PBS wurden die leicht adhärennten Zellen vorsichtig abgespült und in ein 15 mL-Röhrchen überführt. Die EMFIs haften sehr schnell und sehr stark auf der Kulturschalenoberfläche und werden daher dabei nicht mit abgespült. ES-Zellen, die physiologisch nicht mehr in gutem Zustand sind, weil sie beispielsweise die Trypsinierung nicht gut überstanden haben haften nicht mehr an, und werden bereits beim Absaugen entfernt. Insgesamt wird bei diesem Verfahren für die ES-Zellen im besten Zustand selektiert. Nach dem Spülen wurden die Zellen erneut abzentrifugiert, in 0,5 mL Injektionsmedium aufgenommen, und bis zur Injektion auf Eis gestellt.

2.2.3.10 Isolation von Blastozysten aus trächtigen Mäusen

Für die Injektion von ES-Zellen der Zelllinie C57BL/6-III wurden Blastozysten von BALB/c Mäusen verwendet. Da BALB/c Mäuse weiß sind und C57BL/6 schwarz hat das den Vorteil, daß der Grad an Chimerismus bei den Nachkommen sofort anhand der Fellfarbe abschätzbar ist.

BALB/c Mäuse wurden um ca. 18 h verpaart. Am nächsten Morgen wurden Weibchen, bei denen Kopulation stattgefunden hatte anhand des Vorhandenseins eines Pfropfens in der Vagina identifiziert und isoliert. 3,5 Tage nach Befruchtung wurden die Weibchen getötet und der Uterus dem unteren Bauchraum entnommen. Mit Hilfe einer 5 mL Spritze mit abgeknickter 27 gauge-Kanüle und 2 mL M2-Medium und einer spitzen Schere wurden die Uterushörner in einer 2,5 cm Gewebekulturschale gespült. Unter einem Durchsichtsmikroskop wurden die Blastozysten mit einer Mundpipette aufgenommen, und in einen Tropfen M16 Medium unter einer Parafinölschicht in einer frischen 2,5 cm Zellkulturschale überführt. Die Schale wurde bis zur Verwendung im Brutschrank aufbewahrt.

2.2.3.11 Injektion und Reimplantation von trächtigen Mäusen

Die Injektion von ES-Zellen in Blastozysten und die nachfolgende Implantation in den Uterus eines scheinchwangeren Weibchens wurde von Birgit Ledermann vom Institut für Labortierkunde an der Universität Zürich-Irchel und von Burkhard Kneitz in unserem Haus durchgeführt. Die Injektion bei Birgit Ledermann wurde mit FVB/N-Blastozysten anstelle von BALB/c-Blastozysten durchgeführt. ES-Zellen wurden wie unter 2.2.3.9 vorbereitet und mit Hilfe eines Mikromanipulators mit Halte- und Injektionsnadel in Blastozysten (Isolation s. 2.2.3.10) injiziert. Bis zu 20 injizierte Blastozysten (10 pro Horn) wurden in die Uterushörner eines scheinchwangeren CD1-Weibchens implantiert.

2.2.4 Präparation von Organen und Zellen aus Mäusen

2.2.4.1 Isolation aus Milz-Zellen

Mäuse wurden mit CO₂ getötet. Nach Spülen des Fells mit Ethanol wurden die Bauchdecke und das Bauchfell mit sterilen Pinzetten und Scheren eröffnet. Die Milz wurde entnommen, von Bindegewebe und Fett befreit, und in ein 15 mL Röhrchen mit 3 mL RPMI-Medium oder BSS überführt. Mit dem Stempel einer 10 mL Spritze wurde die Milz durch ein Zellsieb gerieben, dann wurde mit 5 mL RPMI-Medium nachgespült. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1300 rpm, 4°C, 5 min). Um die Erythrozyten zu lysieren wurde das Pellet in 5 mL eiskalter Gey's Lösung aufgenommen und 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde zweimal mit PBS 0,1% BSA gewaschen und die Zellen gezählt.

2.2.4.2 Isolation von Knochenmark-Zellen

Mäuse wurden mit CO₂ getötet. Die Femuren wurden mit Pinzetten und Scheren präpariert. Dabei wurde darauf geachtet, kein Blutgefäß zu verletzen, um die Präparation von Verunreinigungen durch periphere Blutzellen freizuhalten. Die Kondylen wurden auf jeweils einer Seite abgeschnitten. Mit 1 mL Medium in einer Spritze mit einer 0,45 mm Kanüle wurden die Zellen aus dem Knochen gespült, abzentrifugiert, und dann auch mit Gey's Lösung behandelt.

2.2.4.3 Isolation von Zellen aus der Peritonealhöhle

Das Fell einer getöteten Maus wurde am Bauch aufgeschnitten, ohne das Peritoneum zu verletzen. Mit einer Spritze wurden 5 mL RPMI-Medium (5% FCS) in eine Seite des Peritonealraumes eingespritzt. Bei im Einstichloch verbleibender Nadel wurden die Zellen der Peritonealhöhle durch sanftes Massieren von den Wandungen gelöst. Das Medium mit den Zellen wurde dann mit der Spritze wieder abgesaugt. Mit der gegenüberliegenden Seite des Bauchfells wurde genauso verfahren.

2.2.4.4 Gewinnung von Blut und Serum von Mäusen

Die Schwanzvene einer Maus wurde mit einem Skalpell angeschnitten. Einige Tropfen Blut wurden in einem Eppendorf-Reagiergefäß aufgefangen. Zur Gerinnung wurde das Serum über Nacht bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag wurde das Serum durch Zentrifugation von den geronnenen Bestandteilen getrennt (3000 rpm, 6 min). Das Serum wurde bis zur Verwendung eingefroren.

2.2.3.5 In vitro Aktivierung von B-Zellen

Milzen wurden getöteten Mäusen entnommen, und Einzelzellsuspensionen hergestellt wie beschrieben. Die Zellen in RPMI-Medium (5% FCS) wurden auf einer 24-well Platte verteilt ($3 \cdot 10^6$ Zellen pro Vertiefung, Konzentration $2 \cdot 10^6$ /mL). Ein Ansatz wurde unstimuliert gelassen, bei den restlichen folgte Stimulation mit verschiedenen polyklonalen Aktivatoren oder mit Kombinationen von diesen. Die Reagenzien waren goat anti mouse IgM (Fab')₂-Fragment (Jackson/Dianova) 20 µg/mL, IL4 200 U/mL, antiCD40 (Hamster anti-Maus whole

Ig, Pharmingen) 10 µg/mL, LPS 30 µg/mL, antiCD3 5µg/mL. Die Stimulation erfolgte für 48 – 72 h, dann wurden die Zellen zunächst gezählt, und dann auf FACS Röhrchen verteilt. Zuerst wurde mit der NeuGc-PAA Probe auf Eis für 90 min gefärbt. Die Färbung mit Antikörpern und die Messung der Proben am FACScan bzw. am FACScalibur erfolgte methodisch wie beschrieben. Als Kontrolle für die Funktionalität der NeuGc-PAA Probe wurden am Tag des FACS-Experiments frisch präparierte Milzzellen einer Wildtyp und einer CD22-/- Maus mit Sialidase behandelt (0,4 U/mL, 2 h, 37°C) bzw. 2 h bei 37°C ohne Sialidase inkubiert, und dann ebenfalls mit B220-FITC gegen NeuGc-PAA_{-bio} + SA-PE gefärbt.

2.2.5 Durchflußcytometrie (fluorescence activated cell sorting, FACS)

Mit Hilfe der Durchflußcytometrie werden Zellen anhand ihrer Oberflächenmarker charakterisiert und verschiedenen Populationen zugeordnet. Die Oberflächenantigene werden dabei mit Antikörpern markiert, die unterschiedliche Fluorophore tragen. Die markierten Zellen werden durch einen Laserstrahl geführt. Dadurch wird abhängig von der Emissionswellenlänge des betreffenden Fluorophors Licht einer bestimmten Wellenlänge abgestrahlt. Dieses wird von einer Meßzelle aufgefangen, und schließlich analysiert.

Einzelzellsuspensionen wurden aus Organen hergestellt wie beschrieben. Alternativ wurden Zellen Suspensionskulturen entnommen. Pro Färbung wurden $5 \cdot 10^5$ Zellen eingesetzt. Das Zellpellet wurde dabei in 25-30 µL in FACS-Puffer verdünntem Antikörper aufgenommen, und für 20-30 min auf Eis in der Dunkelheit inkubiert. Folgten weitere Färbungen, so wurde als Zwischenschritt jeweils mit 3 mL FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Zum Abschluß der Färbung wurde nochmals gewaschen und die Zellen in einem Volumen FACS-Puffer entsprechend ihrer Anzahl aufgenommen (750 µL je $5 \cdot 10^5$ Zellen). Färbungen mit Sekundär-Reagenzien erfolgten mit Streptavidin-Fluorophor Konjugaten bei biotinylierten Primär-Reagenzien, oder mit Antikörper-Fluorophor Konjugaten. Als Fluorophore dienten Phycoerythrin (PE), Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Cychrome (Cy) oder Red670.

Die Analyse der gefärbten Zellen wurde mit einem FACScan bzw. mit einem FACScalibur (beide Becton Dickinson) durchgeführt. Die Auswertung der Daten folgte mit dem Programm CellQuest (Becton Dickinson).

2.2.6 Transfektion von B-Zell Lymphom-Zellen der Linie J558L und Isolation stabiler Transfektanten

$8 \cdot 10^6$ J558Lµm3-8ASia (Sialyltransferase-Transfektanten von J558Lµm3, s. 3.2)-Zellen wurden mit 20 µg Plasmid-DNA in 1,4 mL RPMI-Medium (10% FCS) in einer Elektroporationsküvette (Weite: 4 mm) für 10 min auf Eis inkubiert. Elektroporation erfolgte dann in einem Biorad Gene-Pulser II (Biorad, München) bei 240 V und 1000 µF. Danach wurde die Küvette nochmals für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in verschiedenen Konzentrationen ($5 \cdot 10^2$ /mL, $5 \cdot 10^3$ /mL bzw. $5 \cdot 10^4$ /mL) auf 48-well Platten verteilt, und nach 24h unter Selektion mit 0,3 mg/mL Zeocin (Invitrogen, Karlsruhe) gesetzt. Zur Aufrechterhaltung der Sialyltransferase-Expression der Klone enthielt das Medium zusätzlich 0,8 mg/mL G418. Resistente Klone wurden nach 12 – 14 Tagen isoliert.

2.2.7 Stimulation von J558Lµm3-Zellen mit NP-BSA und Herstellung von Protein-Rohextrakten

$5 \cdot 10^6$ Zellen pro Stimulationszeitpunkt wurden in 1 mL RPMI-Medium mit 1% FCS aufgenommen, und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Ansätze wurden so für 1 h bei 37°C gelagert. Da J558Lµm3 mit einem BCR (mIgM) mit Spezifität für NP (4-Hydroxy-

3-Nitrophenyl)Acetyl) transfiziert ist, kann dieses Hapten gekoppelt an ein Trägermolekül (hier: BSA) zur Stimulation der Zellen verwendet werden. Pro Ansatz wurden 10 μL NP₁₇-BSA (1 mg/mL) entsprechend 10 μg zugegeben, der Ansatz sofort durch Invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt, und das Reaktionsgefäß sofort bei 37°C im Heizblock inkubiert. Der 0 min Wert erhielt kein NP-BSA sondern wurde sofort wie die übrigen Ansätze weiterbehandelt. Nach Ablauf der entsprechenden Zeit (1 bzw. 3 min) wurde die Zellen eines Ansatzes 25 sec bei 14000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde sofort abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 100 μL NP40-Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren aufgenommen und für 25 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zelltrümmer bei 14000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand mit den cytosolischen Proteinextrakten der Zellen wurde in ein frisches eisgekühltes Röhrchen überführt. Ein halbes Volumen 4-fach reduzierender Ladepuffer (Rotiload, Roth, Karlsruhe) wurde zugefügt und das entstehende Gemisch 5 min im Wasserbad gekocht. Die entstandene fertige Probelösung wurde bis zur Verwendung eingefroren.

2.2.8 Proteinbiochemische Methoden

2.2.8.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die verwendeten Gele bestanden aus einem Trenngel (7,5% w/v Acrylamid in 375 mM TRIS/HCl pH8,8 0,1% w/v SDS) und einem Sammelgel (3% w/v Acrylamid in 125 mM TRIS/HCl pH6,8 0,1% w/v SDS). Polymerisation erfolgte unter Zugabe von TEMED und Ammoniumperoxosulfat (APS). Die Probenaufftrennung erfolgte für ca. 30 min bei 80 V, und anschließend für 2 h bei 120 V. Als Laufpuffer diente TG-Puffer (50 mM TRIS/HCl pH 8,3, 385 mM Glycin, 0,1% w/v SDS). Als Molekulargewichtsstandard diente „Rainbow-Marker“ (Pharmacia).

2.2.8.2 Transfer und Detektion von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen (Western-Blot)

Proteine wurden gelelektrophoretisch getrennt wie unter 2.2.8.1. In einer Naßblotkammer (hergestellt in der hauseigenen Werkstatt) wurde ein Western Blot bestehend aus einem Blot-Schwamm, 2 Lagen 3MM Whatman-Papier (9x10 cm), einer Nitrocellulose-Membran (8x9 cm), dem Gel, 2 Lagen 3MM Whatman-Papier, und noch einem Blot-Schwamm aufgebaut. Alle Komponenten wurden vor dem Zusammensetzen mit Transfer-Puffer (12 mM TRIS-Base, 96 mM Glycin pH8,3, 20% v/v Methanol, 0,1% w/v SDS) durchtränkt.

Der Transfer erfolgte bei 40 V über Nacht unter ständigem Rühren im Kühlraum. Nach Entnahme der Membran wurde diese wiederum über Nacht bei 4°C in PBS (-CaCl₂, -MgCl₂), 0,1% Tween, 5% w/v Milchpulver 0,1% Azid zum Blockieren unspezifischer Proteinbindungsstellen unter Schwenken inkubiert. Der erste Antikörper wurde am nächsten Tag direkt zu diesem Ansatz gegeben. Nach erneuter Inkubation über Nacht bei 4°C unter Schwenken wurde die Membran 5 mal in PBS 0,1% Tween gewaschen. Es folgte Inkubation mit dem sekundären Antikörper als Meerrettich-Peroxidase-Konjugat für 2 h bei Raumtemperatur. Die Membran wurde erneut 5 mal in PBS 0,1% Tween gewaschen. Zur Detektion der Signale wurde die Membran auf eine mit Kunststoffolie ausgelegte Filmkassette plaziert und mit frisch angesetztem ECL-Reagenz (bestehend aus gleichen Volumina von ECL1 und ECL2) überschichtet. Nach 1 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Membran mit einer zweiten Kunststoffolie bedeckt. Röntgenfilme wurden für unterschiedliche Zeiten (10 sec bis 1 min) in der Filmkassette exponiert und anschließend entwickelt.

2.2.8.3 Immunpräzipitation von Proteinen aus Zelllysaten

1,5·10⁷ J558L Zellen pro Ansatz wurden mit NP₁₇-BSA stimuliert und anschließend lysiert wie unter 2.2.7. Wegen der größeren Zellzahl wurde jedoch 1 mL NP40-Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren pro Ansatz eingesetzt. Nach Abzentrifugieren der Zelltrümmer wurden

die Lysate in frische gekühlte Reagiergefäße überführt und auf Eis gelagert. Zur Äquilibrierung und zur Entfernung des Ethanols wurden Protein A Sepharosekügelchen (Pharmacia, Freiburg) 3 mal in NP40/Proteaseinhibitoren gewaschen. Als Zwischenschritt wurden die Kügelchen jeweils bei 1300 rpm 5 min 4°C pelletiert. Zu jedem Immunpräzipitationsansatz (IP) wurden dann 2-5 µg Antikörper zusammen mit 10 µL dicht gepackten Protein A Sepharosekügelchen zugegeben. Protein A interagiert dabei mit den Fc-Teilen der Immunglobuline. Die Röhrchen wurden fest mit Parafilm verschlossen, und über Nacht bei 4°C head-over-end rotiert. Am nächsten Morgen wurden die IPs abzentrifugiert, und die Überstände zur späteren Kontrolle der erfolgreichen IP in frische gekühlte Röhrchen überführt und bis zur Verwendung eingefroren. Die Sepharosekügelchen wurden dreimal mit je 1 mL NP40-Puffer gewaschen, 5 min in 40 µL 2x-Ladepuffer (Rotiload) gekocht, und bis zur Verwendung eingefroren. Die sekundäre Färbung erfolgte mit einem anti-Maus-Meeretich-Peroxidase Konjugat mit einem Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper (Klon 4.G10, Maus Anti-Phosphotyrosin). Die Proteine wurden mit NP40-Lysepuffer extrahiert wie beschrieben. Die präzipitierten Proteine wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, und anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Membran wurde in zwei Hälften geteilt. Dazu wurde ohne vorherige Entfernung des 4.G10-Antikörpers und des sekundären Antikörpers die Membran mit einem Kaninchen anti-Maus CD22 Antikörper gefärbt. Zur sekundären Färbung wurde ein anti-Kaninchen-Meeretich-Peroxidase Konjugat verwendet.

2.2.9 ELISA

Die Bestimmung von relativen Serumspiegeln von Immunglobulinen bestimmten Isotyps und bestimmter Spezifität erfolgte mittels ELISA (Enzyme linked immunosorbent Assay). Polysorb bzw. Maxisorb ELISA-Platten von Nunc wurden gleichwertig für die Experimente verwendet.

ELISA-Platten wurden über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer mit 50 µL TNP-Ficoll (5 µg/mL) bzw. mit 50 µL Pneumopur (10 µg/mL) in PBS (-CaCl₂, -MgCl₂) pro Vertiefung beschichtet. Überschüssiges Antigen wurde am nächsten Tag durch dreimaliges Waschen mit PBS und Absaugen (alle Waschschrte wurden im Columbus-ELISA-Wascher von Tecan (Crailsheim) durchgeführt). Aus einer Reihe von Seren immunisierter Tiere, bei denen ein gut messbarer Spiegel an Antigen-spezifischen Immunglobulinen zu erwarten war, wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, die auf jede zu messende Platte als interner Standard aufgetragen wurde. Als zu messende Proben wurde je eine Verdünnungsreihe je immunisiertem Tier, Isotyp, und Immunisierungstag aufgetragen. Die verdünnten Seren blieben über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer auf den Antigen-beschichteten Platten. Anschließend wurden durch Zugabe von 100 µL PBS (-CaCl₂, -MgCl₂) 1% BSA pro Vertiefung und Inkubation für mind. 3 h bei 37°C die verbliebenen unspezifischen Bindungsstellen auf den Platten blockiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS wurde Maus-IgG3 bzw. Maus-IgM spezifischer Antikörper als Konjugat mit alkalischer Phosphatase auf die Platten gegeben. Nach 2 h Inkubation bei 37°C in der feuchten Kammer wurde nicht gebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Zur Quantifizierung spezifisch gebundenen Antikörpers wurden 100 µL Substratlösung (1 mg/mL p-Nitrophenylphosphat von Sigma in 1 M Diethanolamin, 0,5 mM MgCl₂ pH 9,8) pro Vertiefung zugegeben. Die Absorption des entstehenden gelben Farbstoffes bei 405 nm wurde in einem ELISA-Reader Vmax gemessen. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit dem Programm Softmax Pro 3.0.

3. Ergebnisse

3.1 Generierung chimärer Mäuse mit CD22 Knockin-Konstrukten

3.1.1 Überblick

Beim sogenannten „Gene Targeting“ (engl., gezielte Veränderung von Genen in ihren natürlichen Loci) wird mit Hilfe eines „Targeting-Vektors“ eine Veränderung in das Zielgen in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) von Mäusen eingeführt. ES-Zellen können in Blastozysten (3,5 Tage alte Mäuseembryonen) injiziert werden, und dort zur Bildung einer Reihe von Geweben beitragen. Unter anderem können sie die Keimbahn besiedeln. Auf diesem Weg kann die Veränderung des Zielgens etabliert, und an die kommenden Generationen weitergegeben werden.

Die Targeting-Vektoren die in dieser Arbeit zum Einsatz kamen bestehen aus zwei Armen genomischer DNA mit den gewünschten Mutationen, die eine von loxP-Sequenzen umgebene Selektionskassette flankieren. Die Kassette enthält die Gene für die Neomycin-Phosphotransferase (neo) und für die Thymidin-Kinase aus Herpes simplex (HSV-tk). Die Vektoren werden linearisiert in Zellen eingeführt. Dort soll homologe Rekombination mit einem der Wildtyp-Loci stattfinden. Für die Selektion stabil transfizierter Klone ist das Vorhandensein eines selektionierbaren Markers nötig. Oft ist dies das neo-Gen, wie es auch hier verwendet wurde. Die hier verwendeten Vektoren sollen nur Punktmutationen in das Zielgen einführen, aber sonst keinen Einfluß ausüben. Darum ist es erstens wichtig, daß die Selektionskassette in ein Intron eingeführt wird, um nicht andere kodierende Exon-Sequenzen zu verändern. Zweitens muß die Kassette nach dem Rekombinationsvorgang wieder entfernt werden, damit die Genexpression und Regulation nicht beeinflußt werden. Dazu dienen zwei loxP-Sequenzen als direkte Wiederholungen, die die Kassette flankieren. Durch transiente Expression des Enzyms Cre-Rekombinase findet ortsspezifische Rekombination an diesen loxP-Sequenzen statt. Die zwischen den loxP-Sequenzen liegenden Sequenzen werden deletiert, und nur eine loxP-Sequenz bleibt zurück. Transfektion von ES-Zellen verläuft im Gegensatz zur Cre-Rekombination in tatsächlich transfizierten Zellen nicht sehr effizient. Um eine Anreicherung von Klonen zu erzielen, enthält die Selektionskassette neben der neo-Resistenz auch noch das Gen für die Thymidin-Kinase aus dem Herpes Simplex Virus (HSV-tk). Zellen, die dieses Gen tragen sind sensitiv gegenüber der Substanz Ganciclovir, die Kettenabbruch bei der DNA-Replikation herbeiführt. Wird Ganciclovir nach transients Cre-Transfektion zur Selektion verwendet, so überleben nur die Klone, bei denen die Deletion der Kassette erfolgreich stattgefunden hat. Das Endresultat ist der genomische Locus, der die Mutationen und eine für die Genexpression und Regulation unerhebliche loxP-Sequenz von 34 bp Länge flankiert durch ein von der Klonierung stammendes Stück DNA im Intron trägt.

3.1.2 Die Targeting-Vektoren zur Generierung von CD22-ITIM-KO und CD22-Tailless

In dieser Arbeit sollten zwei Mauslinien mit Mutationen im CD22-Gen hergestellt werden. Eine mit zerstörten ITIMs, CD22-ITIM-KO, eine andere bei der der cytoplasmatische Anteil von CD22 fehlt, CD22-Tailless. Von der CD22-ITIM-KO Maus wurde erwartet, daß die inhibitorische Phosphatase SHP-1 nicht mehr an CD22 binden kann. Durch den Vergleich des Phänotyps dieser Maus mit dem der CD22^{-/-} Maus sollte die Rolle der ITIM-unabhängig bindenden, die B-Zelle normalerweise aktivierenden Signalmoleküle PLC γ , Lyn, PI3K, und Grb-2 in vivo untersucht werden. CD22-Tailless sollte der Komplementierung von CD22-ITIM-KO dienen. Von der Analyse beider Modelle wurden zudem Rückschlüsse auf mögliche

Zusammenhänge zwischen Adhäsionsfunktion und Signalfunktion von CD22 erhofft (s. auch Zielsetzung der Arbeit und Abb. 3, S.16).

Der Vektor pCD22-ITIM-KO diente zum Austausch der Tyrosine in den ITIM Motiven zu Phenylalaninen, und der Vektor pCD22-ex12-Stop zum Einführen eines Stopcodons im membranproximalen Exon 12.

3.1.3 Klonierung des Vektors pCD22-ITIM-KO

Der Vektor pCD22-ITIM-KO basierte auf einem Abschnitt des CD22-Gens, der Teile des Exons 15 und große Teile des Introns 10/11 umfaßte. Die kodierenden Abschnitte für die zu Phenylalaninen veränderten Tyrosine (Y→F) in den ITIM-Motiven befinden sich in Exon 13 (1 ITIM) und in Exon 15 (2 ITIMs). Die Selektionskassette mit den Genen für die Neomycin-Phosphotransferase (neo) und die HSV-Thymidinkinase (tk), flankiert von zwei loxP-Sequenzen, befindet sich im Intron 14/15, zwischen den Mutationen. Durch die Mutageneseprimer werden außer den Y→F Mutationen auch noch stille Mutationen eingeführt, die das Entstehen einer Sall-Schnittstelle in Exon 15 bzw. einer Sspl-Schnittstelle in Exon 13 bewirken. Diese Schnittstellen dienen der späteren Analyse des mutierten Locus mittels PCR oder Southern Blot. Es ergibt sich ein langer Vektorarm von 2,3 kb mit einer ununterbrochenen Homologie zum Ziellokus von 1,7 kb. Der kurze Arm hat eine Länge von 1 kb, die Länge der ununterbrochenen Homologie beträgt 0,65 kb. Eine schematische Darstellung von pCD22-ITIM-KO zeigt Abb. 4.

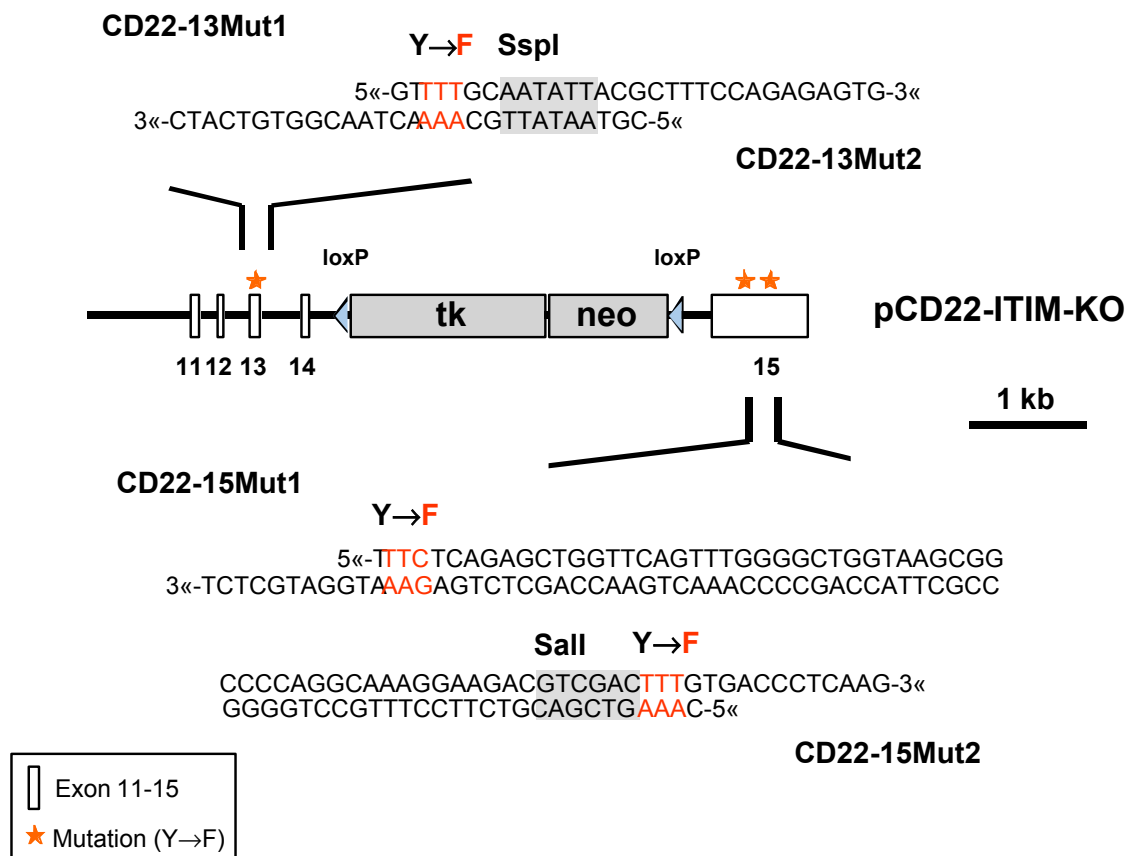


Abb. 4: Schematische Darstellung des Targeting-Konstrukts pCD22-ITIM-KO zur Generierung von CD22-ITIM-KO Mäusen. Der Vektor umfaßt die Region von Intron 10/11 bis Exon 15. Die Tyrosine (Y) in den ITIMs sind durch Phenylalanine (F) ersetzt. Dargestellt sind auch die Mutageneseprimer. Sie enthalten die Codons für Phenylalanin und die stillen Mutationen zur Einführung der Sspl bzw. der Sall Schnittstelle.

Die Klonierung der Targeting Vektoren wurde als Diplomarbeit von Elke Martinez am Max-Planck-Institut für Immunbiologie in Freiburg begonnen (Martinez 1996). Zusätzlich wurden zwei Kontrollvektoren zur Etablierung der PCR (s. Abschnitt 3.1.5), die später zum Screening nach positiven Klonen verwendet werden sollte, kloniert (pCD22-ITIM-KO-Kon und pCD22-ex12-StopKon). Mit Beginn meiner Promotion übernahm ich das Projekt und stellte pCD22-ITIM-KO und den PCR-Kontrollvektor pCD22-ITIM-KO-Kon fertig.

Sämtliche Vektorkarten der fertigen Vektoren mit allen relevanten Schnittstellen befinden sich im Anhang.

Die Selektionskassette mit den Genen für die Neomycin-Phosphotransferase und die Thymidin-Kinase aus dem Herpes Simplex Virus wurde mit XhoI und Sall aus dem Vektor pBS112-SXneo/tk präpariert. Die Kassette ist von zwei loxP-Sequenzen (in gleicher Orientierung) flankiert. Diese dienen der Entfernung der Kassette nach homologer Rekombination und Selektion. Die Vorstufen von pCD22-ITIM-KO und pCD22-ITIM-KO-Kon, p73,22-ex13,15mutA/B bzw. p73,22-ex13,15mutS/X wurden jeweils mit HindIII linearisiert. Aus der Vorstufe von pCD22-ITIM-KO-Kon (p73-22-ex13,15mut) mußte davor zunächst eine zweite HindIII Schnittstelle im Polylinker entfernt werden. Dazu wurde ein 55 bp XhoI/SmaI Fragment mit der HindIII Schnittstelle aus dem Vektor entfernt, das XhoI Ende mit Klenow Polymerase aufgefüllt. Das entstandene Produkt wurde ligiert und erhielt die Bezeichnung p73,22-ex13,15mutS/X. Um nach der Linearisierung mit HindIII die Selektionskassette einsetzen zu können, wurde versucht, die überhängenden Enden der Kassette und der mit linearisierten Vektoren mit Klenow-Polymerase aufzufüllen. Die Enden der linearisierten Vektoren wurden vor Ligation mit CIP (calf intestine phosphatase) dephosphoryliert. Die Ligationen, die auf diese Weise durchgeführt wurden, waren jedoch nicht erfolgreich. Auf der Suche nach einer alternativen Klonierungsstrategie wurde ein Oligonukleotid (NTlink) entworfen, daß als Linker jeweils in die HindIII-Schnittstelle von p73,22-ex13,15mutS/X bzw. p73,22-ex13,15mutA/B eingesetzt werden sollte. Das Oligonukleotid wurde so gestaltet, daß es mit sich selbst komplementär ist, und bei Assoziation zweier Einzelstränge eine XhoI Schnittstelle flankiert von zwei HindIII Überhängen entsteht. Dadurch sollte in jedem Vektor jeweils eine singuläre XhoI Schnittstelle anstelle der HindIII Schnittstelle geschaffen werden. Dadurch wird eine direkte Ligation der XhoI/Sall präparierten neo/tk-Kassette mit den Vektoren ermöglicht, da XhoI auch mit Sall kompatibel ist. Die Vektoren wurden wiederum mit HindIII linearisiert. Anschließend wurde eine Ligation mit dem Oligonukleotid durchgeführt. Aufgrund der HindIII Überhänge ist dabei eine Multimerbildung möglich, diese wurde in Kauf genommen. Durch Verdau mit XhoI wurde dann auf Vorhandensein dieser Schnittstelle in den Vektoren getestet. Klone mit der Schnittstelle, p73,22-ex13,15mutS/X-XhoI bzw. p73,22-ex13,15mut(Aval)-XhoI, wurden weiter verwendet. Es wurde jeweils mit XhoI linearisiert, mit CIP dephosphoryliert, und mit der neo/tk-Kassette ligiert. Klone, die die Kassette enthielten, wurden weiter verwendet. Durch Restriktionsverdau wurde die Orientierung der Selektionskassette festgestellt, und ein Kontroll- und ein Targetvektor mit gleicher Kassettenorientierung für weitere Experimente herangezogen. Der Kontrollvektor erhielt die Bezeichnung pCD22-ITIM-KO-Kon, der Targetvektor erhielt die Bezeichnung pCD22-ITIM-KO.

3.1.4 pCD22-ex12-Stop

Der genomische Abschnitt für den Vektor pCD22-ex12-Stop umfaßte die Region von Intron 10/11 bis 1,2 kb nach dem Ende von Exon 15. Durch den Mutageneseprimer wurde ein Stopcodon und eine analytische BamHI-Schnittstelle in den membranproximalen Abschnitt des Exons 12 eingeführt. Der kurze Arm trägt keine Mutation und hat eine Länge von 1 kb. Der lange Arm ist 3,6 kb lang und besitzt einen Abschnitt ununterbrochener Homologie von 3,2 kb. Die von Elke Martinez am Max-Planck-Institut für Immunbiologie in Freiburg begonnene Klonierung von pCD22-ex12-Stop und pCD22-ex12-StopKon wurde dann von Lars Nitschke und Astrid Heiter in am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg fortgeführt und abgeschlossen.

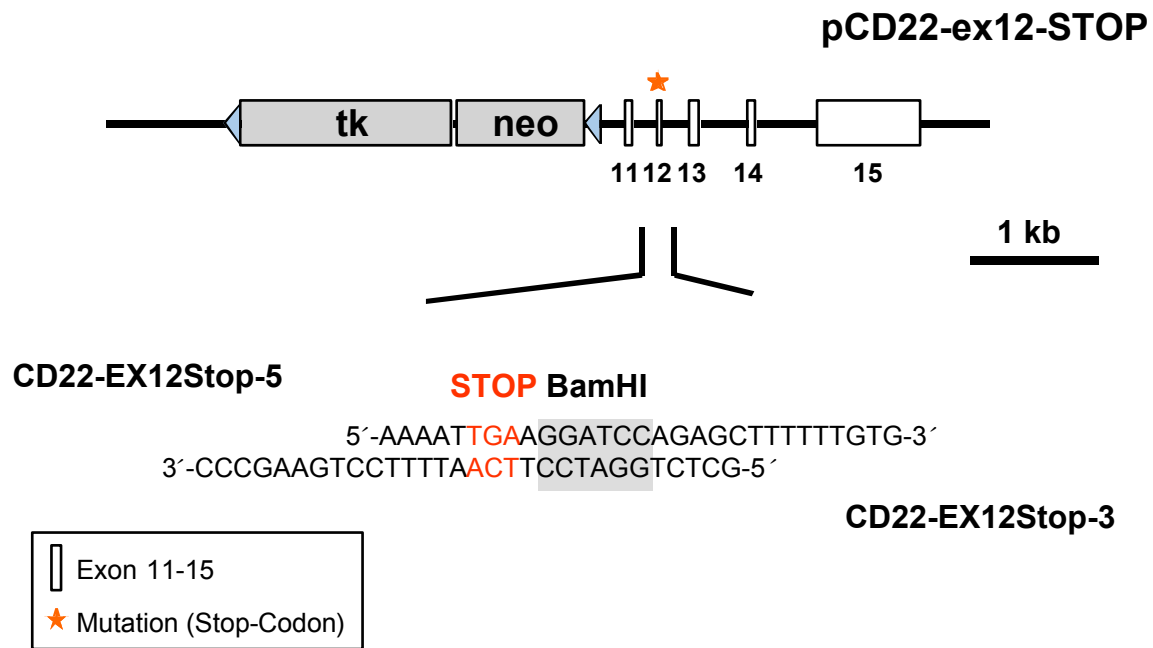


Abb. 5: Schematische Darstellung des Targeting-Vektors pCD22-ex-12Stop zur Generierung von Mäusen ohne cytoplasmatische Domäne von CD22 (CD22-Tailless). Die Mutageneseprimer enthalten neben dem Stop-Codon im membranproximalen Teil von Exon 12 auch eine analytische BamHI-Schnittstelle.

Es sollte sichergestellt werden, daß die loxP-Sequenzen von pCD22-ex12-Stop und pCD22-ITIM-KO funktional sind. Dazu wurde der Bakterienstamm *E.coli*/BNN132 verwendet. Dieser Stamm trägt und exprimiert das Gen für die Cre-Rekombinase auf einem Plasmid (mit Kanamycinresistenz). Das Enzym zeigt bei Transformation von DNA in die Bakterien seine spezifische Aktivität wenn funktionelle loxP-Sequenzen vorhanden sind – das von (gleichgerichteten) loxP-Sequenzen eingefasste DNA-Stück wird deletiert. Die Deletion kann dann mittels Restriktionsanalyse nachgewiesen werden. Auch bei funktionellen loxP-Sequenzen läuft diese Deletion in *E.coli*/BNN132 nicht vollständig ab, sondern kann nur bei einem Teil der Transformanten nachgewiesen werden.

Kompetente Bakterien des Stammes *E.coli*/BNN132 wurde mit pCD22-ex12-Stop und pCD22-ITIM-KO transformiert. Plasmid DNA von 12 Kolonien pro Konstrukt wurde präpariert. Das Restriktionsenzym PstI erzeugt einige Fragmente, die charakteristisch für die neo/tk-Kassette sind (Dreifachbande bei 759, 840 und 952 bp). PstI-Verdau der DNAs ergab, daß 4 (pCD22-ex12-Stop) bzw. 5 (pCD22-ITIM-KO) Bakterienklone die Selektionskassette deletiert hatten (5.09.2000, S.88). Daraus folgt, daß die loxP-Sequenzen beider Targeting-Vektoren funktional sind.

Die Abbildungen 6 und 7 geben einen Überblick über den Ablauf der homologen Rekombination der Vektoren pCD22-ITIM-KO bzw. pCD22-ex12-Stop mit einem der endogenen CD22-Loci, und die anschließende Cre-Deletion. Für eine generelle Beschreibung der einzelnen Schritte s. Abschnitt 3.1.1.

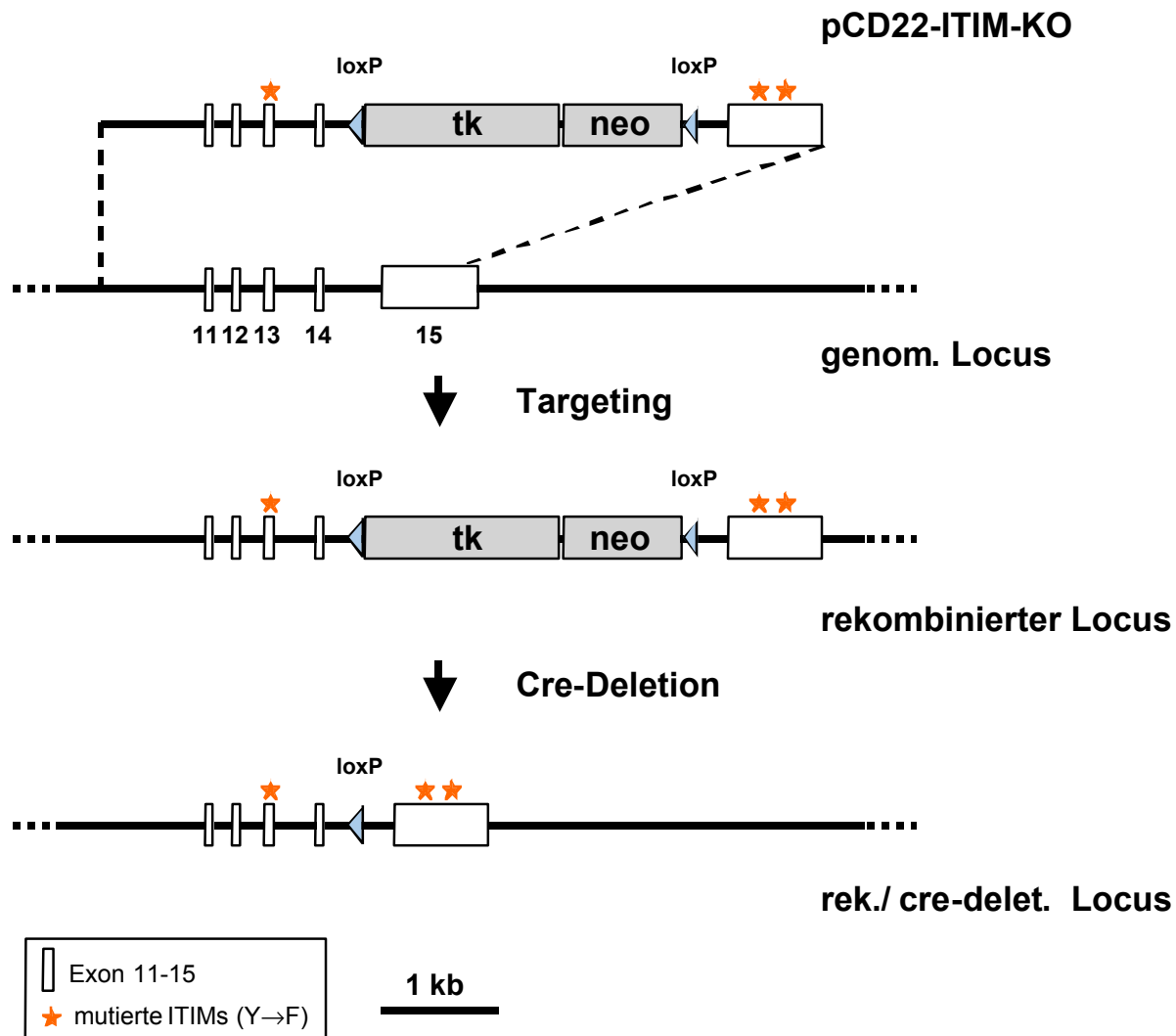


Abb. 6: Ablauf der homologen Rekombination des Vektors pCD22-ITIM-KO mit dem endogenen CD22 Locus. Durch anschließende Deletion der Selektionskassette mit Cre-Rekombinase bleiben als Veränderungen lediglich die mutierten ITIMs in den Exons 13 und 15, und eine loxP-Sequenz im Intron 14/15 zurück.

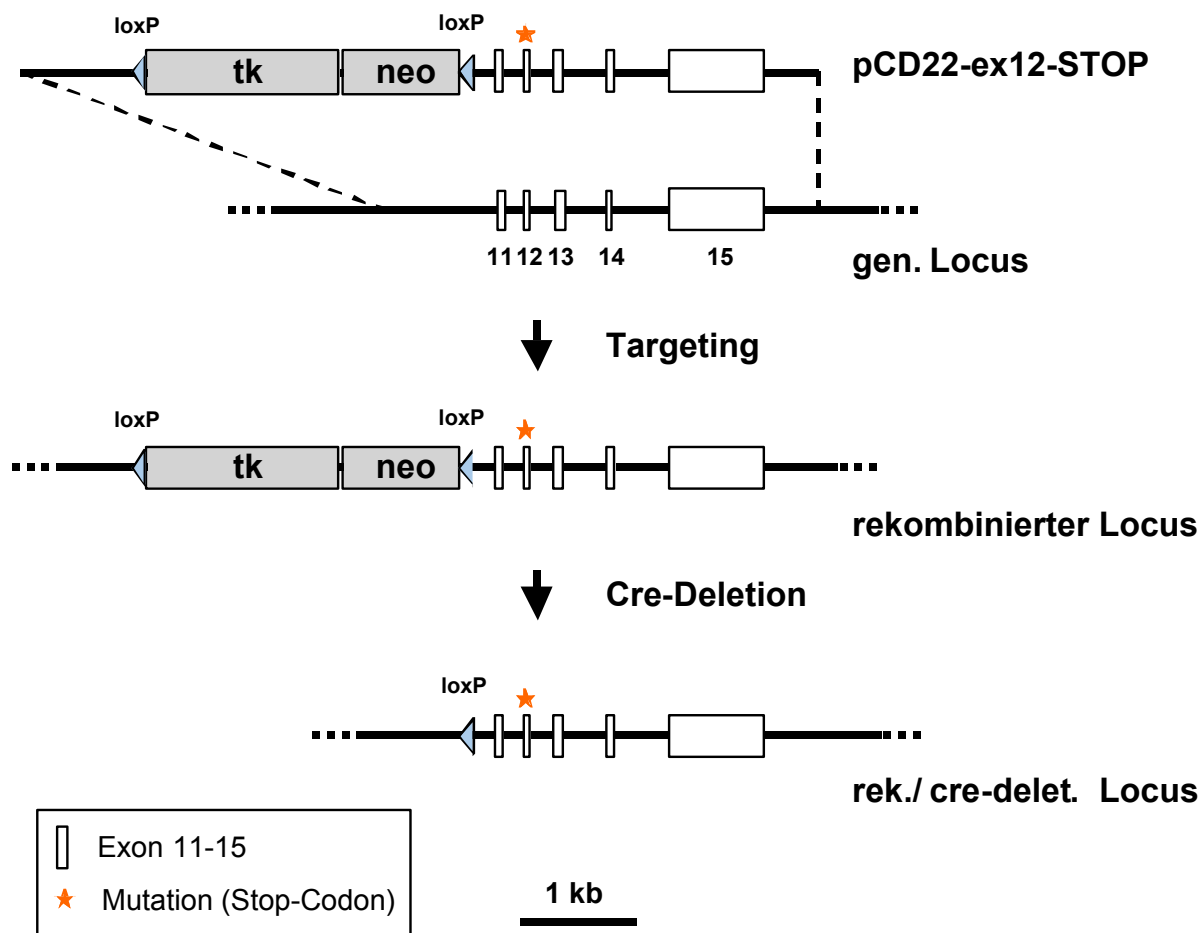


Abb. 7: Homologe Rekombination des Vektors pCD22-ex12-Stop mit dem endogenen CD22 Locus. Die Deletion der Selektionskassette mit Cre-Rekombinase lässt als Veränderungen ein Stop-Codon im Exon 12, und eine loxP-Sequenz im Intron 10/11 zurück.

3.1.5 Etablierung der Screening-PCRs mit Hilfe der Kontroll-Konstrukte

Rekombination von Targeting-Vektoren mit den entsprechenden genomischen Loci ist trotz Homologie ein sehr seltenes Ereignis. Um die wenigen richtigen Klone zu detektieren, sind verlässliche Nachweismethoden unabdingbar. Hier wurde eine geschachtelte PCR mit Primerbindungsstellen in der Selektionskassette und im genomischen Locus, gerade außerhalb des Targeting-Konstrukts, zum screenen der transfizierten Klone verwendet. Die geschachtelte PCR ist gegenüber der einfachen PCR spezifischer und sensitiver.

Um die PCR unter Bedingungen zu testen, die denen im Screening möglichst nahekommen, wurden zusätzlich zu den Targeting-Vektoren noch Kontrollvektoren konstruiert. Der kurze Arm dieser ist im Vergleich zu dem der Targeting-Vektoren jeweils etwas länger. Die äußeren Primer in der Screening-PCR können deshalb innerhalb des Kontroll-Konstrukts binden, so daß unabhängig vom Integrationsort des Konstrukts in das Genom immer das Produkt entsteht, das einen positiven Klon im realen Screening anzeigen würde. Abbildung 8a) zeigt das Kontroll-Konstrukt zu pCD22-ex12-Stop, pCD22-ex12-StopKon, mit der Lage sämtlicher zum Einsatz gekommener PCR-Primer.

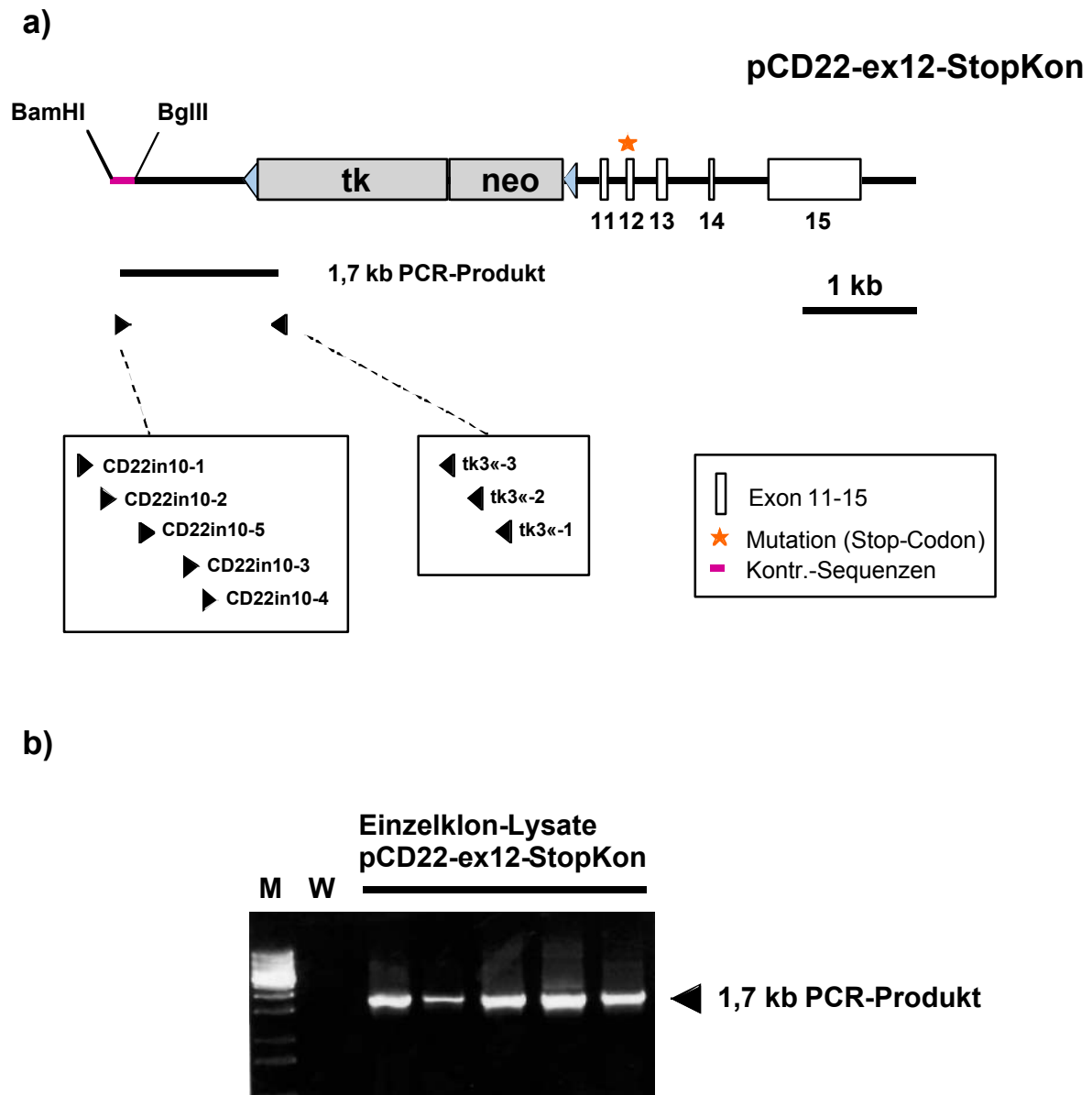


Abb. 8

a) Darstellung des Kontroll-Vektors für das CD22-Tailless Screening, pCD22-ex12-StopKon. Der Abschnitt, der im Kontroll-Vektor im Vergleich zum Targeting-Vektor zusätzlich vorhanden ist, ist in Magenta dargestellt (Kontr.-Sequenzen). In Kästen sind alle Primer, die bei Screenings zum Einsatz kamen, in ihrer relativen Lage zueinander gezeigt. Die Primer wurden in geschachtelten PCRs mit einem äußeren Primerpaar in der ersten Runde und einem inneren Primerpaar in der zweiten Runde eingesetzt (Primersequenzen s. Anhang).

b) Beispiel für eine Test-PCR mit Lysaten von einzelnen ES-Zell Klonen, transfiziert mit pCD22-ex12-StopKon. C57BL/6-III ES-Zellen wurden mit pCD22-ex12-StopKon transfiziert, und einzelne Klone isoliert und für die PCR aufbereitet, wie beschrieben. Primer für die erste Runde waren CD22in10-1 und tk3 \leftarrow -1, für die zweite Runde CD22in10-2 und tk3 \leftarrow -3. Bei jedem Klon ist das charakteristische 1,7 kb PCR-Produkt zu sehen, das auch die Integration des Targeting-Konstrukts an die richtige Stelle des Genoms anzeigen würde. M: Molekulargewichtsmarker, W: Wasserkontrolle

Da die vollständigen Vektoren pCD22-ex12-Stop und pCD22-ex12-StopKon zu Beginn der Arbeit bereits vorlagen, wurde mit der Etablierung der zugehörigen PCR begonnen. pCD22-ex12-Stop war aus einer Vorstufe von pCD22-ex12-StopKon nach Deletion eines 208 bp

BgIII/BamHI Fragmentes am Ende des kurzen Armes entstanden. Das Fragment war im Bereich unsequenzierter Intron-Sequenz. Zum Design von Primern für das Screening wurde dieser Abschnitt deshalb zunächst teilweise sequenziert. Basierend auf der Sequenz wurden die Primer CD22in10-1 und CD22in10-2 entworfen. Diese wurden zusammen mit den bereits vorhandenen tk3`-1, tk3`-2 und tk3`-3 innerhalb des HSV-tk Gens verwendet. C57BL/6-III ES-Zellen wurden mit pCD22-ex12-StopKon transfiziert wie beschrieben. Einzelne Klone wurden gepickt und für die PCR aufbereitet. Es wurden auch Gesamtlysate von 9 cm Zellkultur Petrischalen mit resistenten Klonen als Pools für Test-PCRs hergestellt. Anhand der Schmelztemperatur der Primer wurden die Kombinationen CD22in10-1/tk3`2 und CD22in10-2/tk3`-3 für die erste bzw. zweite Runde einer geschachtelten PCR (nested PCR) festgelegt.

Für die ersten Versuche wurden Einzelklonlysate gepoolt (5.5 μ L pro 50 μ L Reaktionsvolumen), bzw. Pool-Lysate verwendet, und 10 μ L der ersten Reaktion in die zweite Reaktion überführt. Bei unterschiedlichen annealing-Temperaturen, Magnesium-Konzentrationen, und Kombinationen der Primer wurde keine Amplifikation des gewünschten Produkts erzielt.

Daraufhin wurden auch andere Primer-Kombinationen getestet. Die PCR wurde außerdem hinsichtlich anderer Parameter optimiert. Geändert wurden die MgCl₂-Konzentration, die Annealing-Temperatur, die Extensions-Temperatur für die Taq-Polymerase, die Primerkonzentrationen, die Zyklenanzahl, die Menge an eingesetztem Lysat, und das Reaktionsvolumen, daß von der ersten in die zweite Runde überführt wurde. Als ein entscheidender Parameter stellte sich die Qualität und die Menge der als Matrize verwendeten DNA heraus. Außerdem durfte nicht zu viel Rohlysate in die erste Runde eingesetzt werden (bis zu 5 μ L). Viele PCR-Versuche fanden zunächst mit der ersten Serie gepickter Klone statt, und ergaben bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen keine befriedigenden Resultate. Die Transfektion des Kontroll-Vektors wurde schließlich wiederholt, neue Klone wurden gepickt, und die PCR Resultate waren bereits beim ersten Versuch gut und nach wenigen Veränderungen konnte mit dem Screening begonnen werden. Ein Beispiel für eine Test-PCR zeigt Abb 8b). Für die endgültig zur Anwendung gekommenen Bedingungen s. Materialien und Methoden, Punkt 2.2.1.21.

Nachdem die Reaktionsbedingungen für die CD22-Tailless Screening-PCR festgelegt waren, wurde die PCR für CD22-ITIM-KO äquivalent etabliert. Das geschah in enger Orientierung an den Reaktionsbedingungen, die für das CD22-Tailless Screening festgelegt wurden. C57BL/6-III ES Zellen wurden mit pCD22-ITIM-KO-Kon transfiziert. Nach Selektion wurden einige Klone gepickt, wie beschrieben aufbereitet, und die PCR getestet. Verschiedene Primerpaare wurden dabei ausprobiert (YFnes1 bis 6, OLneo7 bis 9, in Kombinationen). Als gut stellten sich verschiedene Kombinationen (1. Runde YFnes4 u. OLneo7, 2. Runde YFnes5 u. OLneo8, YFnes3/6 mit OLneo7/8) heraus. Dies wurde im weiteren Verlauf der Doktorarbeit noch mehrmals bestätigt. Diese Kombinationen wurde daher für sämtliche Screenings, wenn nicht anders angegeben, verwendet. Kontroll-Konstrukt und Primer und ein Beispiel für eine Test-PCR sind in Abbildung 9 schematisch dargestellt.

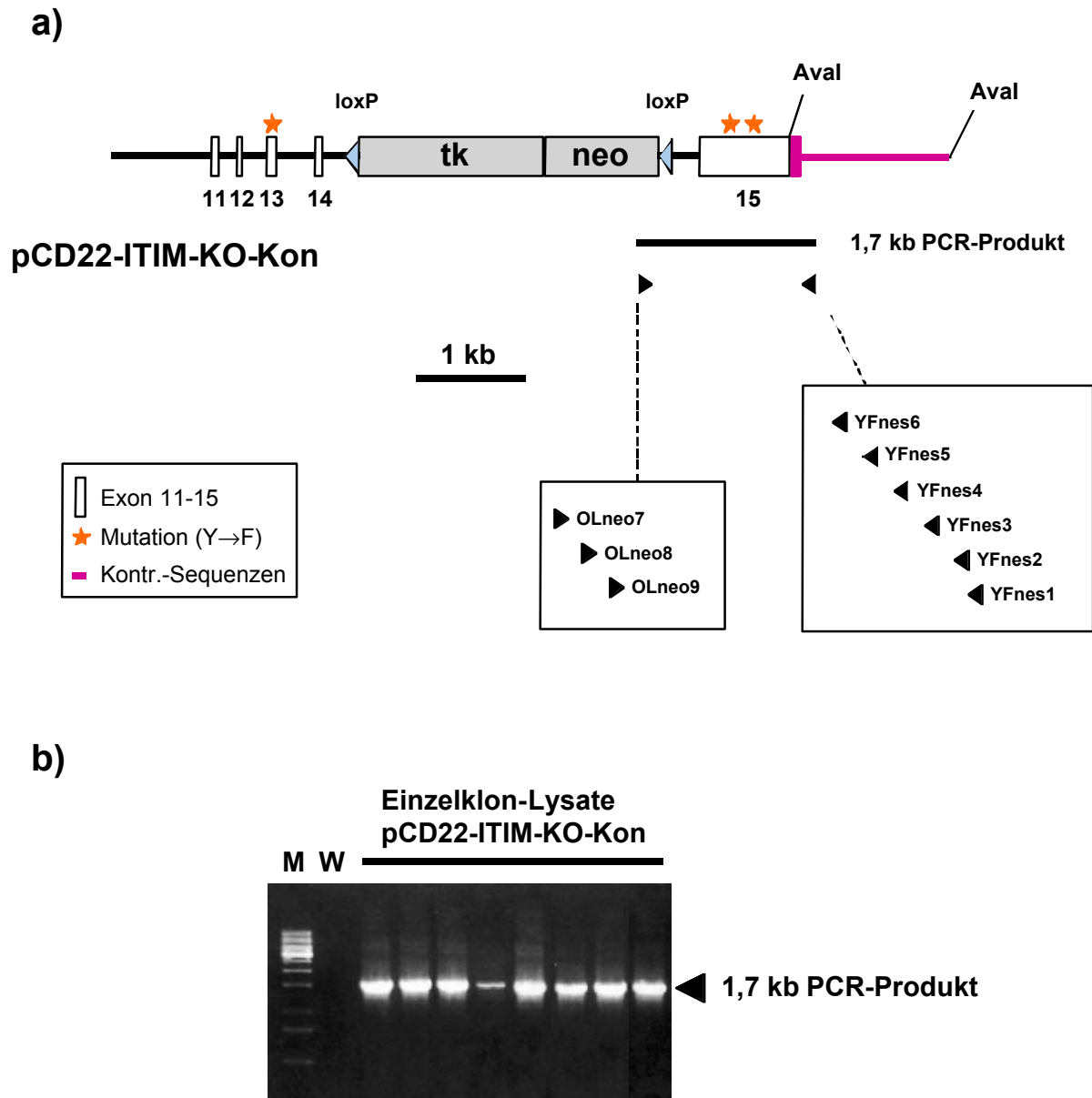


Abb. 9

a) Kontroll-Konstrukt pCD22-ITIM-KO-Kon, in Magenta die Abschnitte, die nur im Kontroll-, aber nicht im Targeting-Konstrukt vorhanden sind. In Kästen sind alle Primer, die bei Screenings zum Einsatz kamen, in ihrer relativen Lage zueinander gezeigt.

b) Beispiel für eine PCR mit Lysaten von einzelnen mit pCD22-ITIM-KO-Kon transfizierten ES-Zell Klonen. Primer waren YFnes4 und OLneo8 in der ersten Runde, und YFnes5 und OLneo9 in der zweiten Runde. Bei jedem Klon ist das charakteristische 1,7 kb PCR-Produkt zu sehen, das auch die Integration des Targeting-Konstrukts an die richtige Stelle des Genoms anzeigen würde. M: Molekulargewichtsmarker, W: Wasserkontrolle

3.1.6 Transfektion der Targeting-Konstrukte und Screening zur Identifikation positiver Klone

Nachdem die Qualität der Screening-PCR für das CD22-Tailless Konstrukt pCD22-ex12-Stop zufriedenstellend war, wurde ein erstes Targeting-Experiment durchgeführt. C57BL/6-III ES-Zellen der Passage 17 nach Isolation (P_{17}) wurden wie beschrieben mit 20 μ g linearisiertem pCD22-ex12-Stop transfiziert. Nach 12 Tagen Selektion mit G418 wurden 288 stabile

Transfektanten gepickt. Die Hälfte der so isolierten Klone wurde auf 48-well Platten mit EMFIs weitergezogen. Die andere Hälfte wurde für die PCR-Analyse aufbereitet (s. 2.2.3.8). PCR Analyse dieser Klone ergab 5 Klone mit korrekter homologer Rekombination. Diese erhielten die Bezeichnungen M12.2.1, M12.2.2, M12.2.3, M12.4.1, M12.4.2. Die Klone wurden expandiert, und Aliquots wurden beim Umsetzen der Klone eingefroren. Für weitere Tests wurde genomische DNA der Klone hergestellt, wie unter 2.2.1.22 beschrieben. Ein Beispiel für ein Ergebnis einer Screening-PCR zeigt Abbildung 10 a).

Mit dem CD22-ITIM-KO Konstrukt wurde äquivalent vorgegangen. C57BL/6-III ES Zellen (P₁₄) wurden mit PvuI-linearisiertem pCD22-ITIM-KO wie beschrieben transfiziert, selektioniert, und gepickt. Im ersten Screening wurden bei 500 gescreenten Klonen 5 mit korrekter Integration des Konstrukts gefunden. Diese erhielten die Bezeichnungen YFtar3E5, YFtar3F1, YFtar4E6, YFtar4F3, und YFtar10E3. Wiederholung der PCR mit genomischer DNA bestätigte später 3 davon. Sie erhielten die Bezeichnungen YFtar3F1, YFtar4E6, und YFtar10E3 (Beispiel für ein Screening s. Abb. 10 b).

a) CD22-Tailless PCR-Screening

pCD22-ex12-Stop
Transfektanten

- + - - W W K K



◀ 1,7 kb PCR-Produkt

b) CD22-ITIM-KO PCR-Screening

pCD22-ITIM-KO
Transfektanten

+ - - - W W K K



◀ 1,7 kb PCR-Produkt

Abb. 10: Beispiele für PCRs zur Identifikation korrekt rekombinierter ES-Zell Klone. C57BL/6-III ES-Zellen wurden mit pCD22-ex12-Stop (a) bzw. pCD22-ITIM-KO (b) transfiziert. Integration an der richtigen Stelle wurde mittels PCR getestet. Als Kontrolle dienten Lysate einzelner Kolonien von Kontroll-Vektor Transfektanten. -: Klon mit zufälliger Integration des Targeting-Konstrukts, +: Klon mit Integration des Targeting-Konstrukts an der gewünschten Stelle im CD22-Locus, K: Positivkontrolle, W: Wasserkontrolle

3.1.7 Bestätigung der homologen Rekombination im Southern Blot

Zusätzlich zur PCR muß die homologe Rekombination bei positiven Klone vor deren weiterer Verwendung durch Southern Blot bestätigt werden. Das ist nötig, um das PCR Ergebnis mit einer unabhängigen Methode zu bestätigen, und weil mit der PCR keine zusätzlichen Integrationen des Konstrukts an anderer Stelle im Genom ausgeschlossen werden können.

CD22-Tailless

Als Sonde für den Nachweis der Integration von pCD22-ex12-Stop wurde ein 1258 bp HindIII Fragment aus dem Vektor pCD22-3BS isoliert. Diese umfaßt die Exons 11-14. Genomische DNA der als positiv getesteten Klone M12.2.1, M12.2.2, M12.2.3, M12.4.1, und M12.4.2 wurde mit BamHI bzw. EcoRI verdaut. Abb. 11 zeigt die erwarteten Fragmente im Fall des Wildtyplocus bzw. des getargeteten Locus und die nach Hybridisierung mit der Sonde auf dem Blot zu erkennenden Fragmente. Durch Integration des Targeting-Konstrukts an der richtigen Stelle wird das 11 kb BamHI Wildtyp-Fragment durch Einführung der neuen BamHI Schnittstelle in ein 9 kb und ein 6 kb Fragment geteilt. Es wurde erwartet, daß die Sonde hauptsächlich mit dem 11 kb Wildtyp-Fragment und dem 6 kb Target-Fragment hybridisiert. Der Überlappungsbereich mit dem 9 kb Target-Fragment ist relativ klein, deshalb wurde ein schwächeres Signal erwartet. In der Selektionskassette befinden sich Schnittstellen für EcoRI, die zum Entstehen eines 9,5 kb und eines 3 kb-Fragmentes statt eines 9,5 kb-Fragmentes im Wildtyp-Fall führt. Die Sonde hybridisiert mit allen drei Fragmenten, die beiden 9,5 kb-Fragmente sind im Blot nicht zu unterscheiden. Um zusätzlich weitere Integrationen auszuschließen, wurde auch eine Sonde verwendet, die innerhalb des neo-Gens bindet. Abb. 12 zeigt Southern Blots der Klone M12.2.3 und M12.4.1.

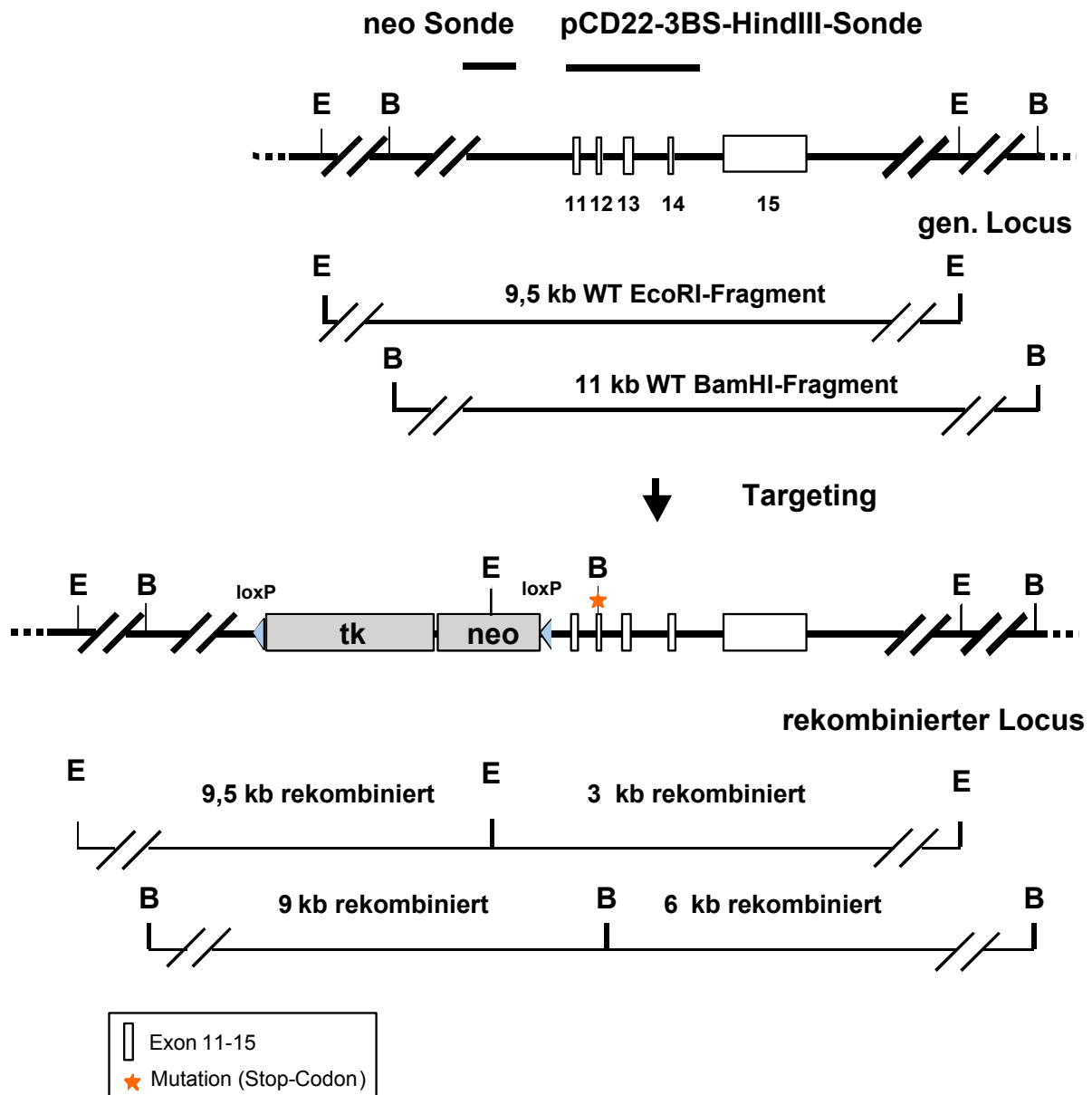


Abb. 11: CD22 Wildtyplocus und mit pCD22-ex12-Stop rekombinierter Locus mit Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI (B) und EcoRI (E). Nach Verdau mit EcoRI bzw. BamHI entstehen die dargestellten Fragmente. Änderungen der Wildtyp (WT)-Restriktionsfragmente entstehen bei Rekombination durch EcoRI Schnittstellen in der neo-Kassette bzw. durch die BamHI-Schnittstelle in den Mutageneseprimern.

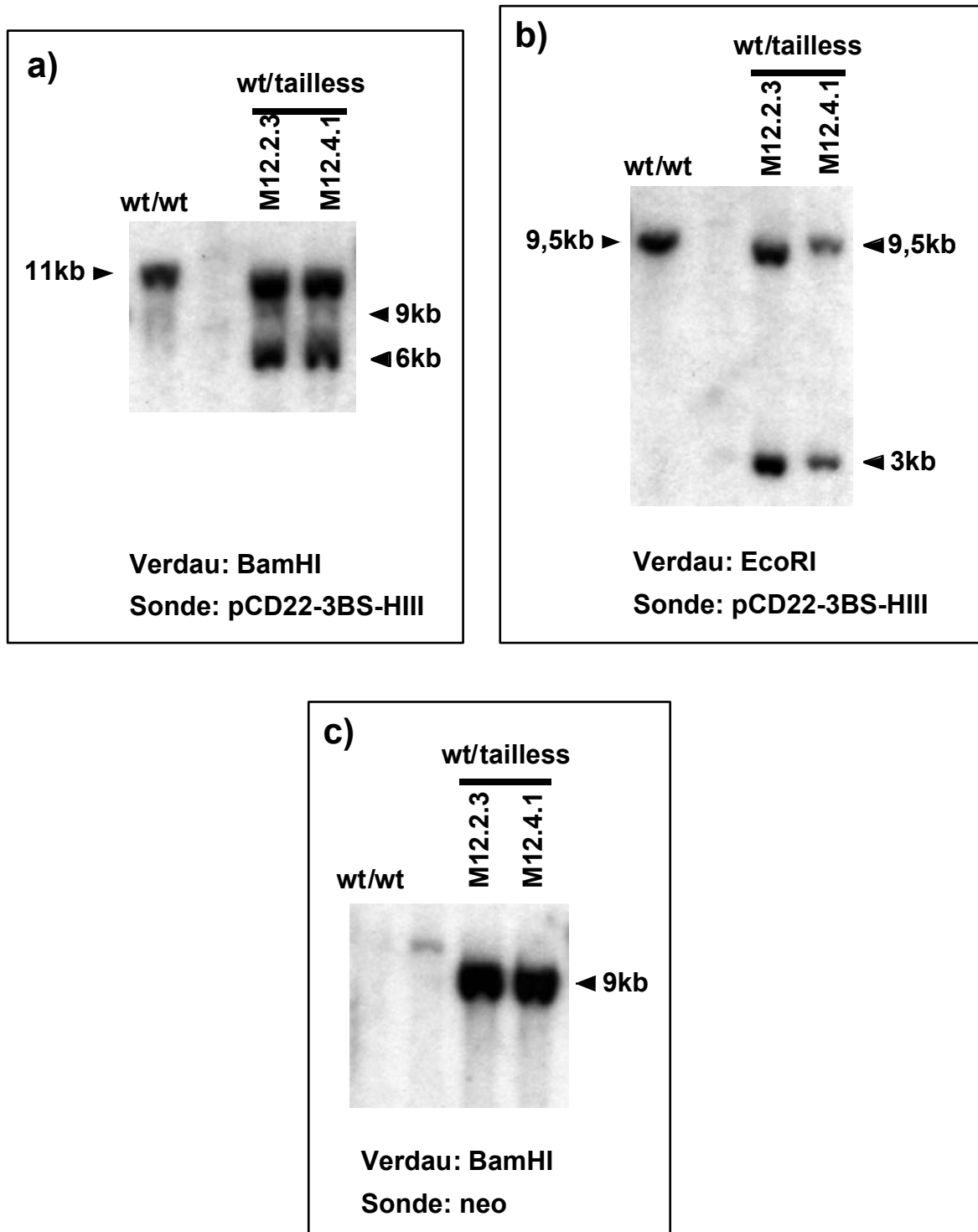


Abb. 12: Southern Blots der als korrekt rekombiniert identifizierten CD22-Tailless ES-Zell-Klone M12.2.3 und M12.4.1, jeweils mit einem Wildtyp-Kontroll-Klon (wt/wt) gezeigt. Schematische Darstellung des Wildtyplocus und des rekombinierten Locus, der Fragmente, die durch Verdau mit EcoRI bzw. BamHI entstehen, sowie der Sonden s. Abbildung 11. a)

CD22-ITIM-KO

Genomische DNA der als positiv identifizierten CD22-ITIM-KO Klone wurde mit BamHI verdaut. Bei BamHI-Verdau des Wildtyplocus entsteht ein 11 kb Restriktionsfragment. Durch Integration des pCD22-ITIM-KO Konstruktes in den Wildtyplocus vergrößert sich dieses

Fragment auf 14 kb. Als Sonde wurde wiederum pCD22-3BS HindIII und die Sonde innerhalb der neo-Kassette verwendet. Eine Übersicht über die entstehenden Fragmente bei BamHI-Verdau, und die verwendete Sonde gibt Abbildung 13.

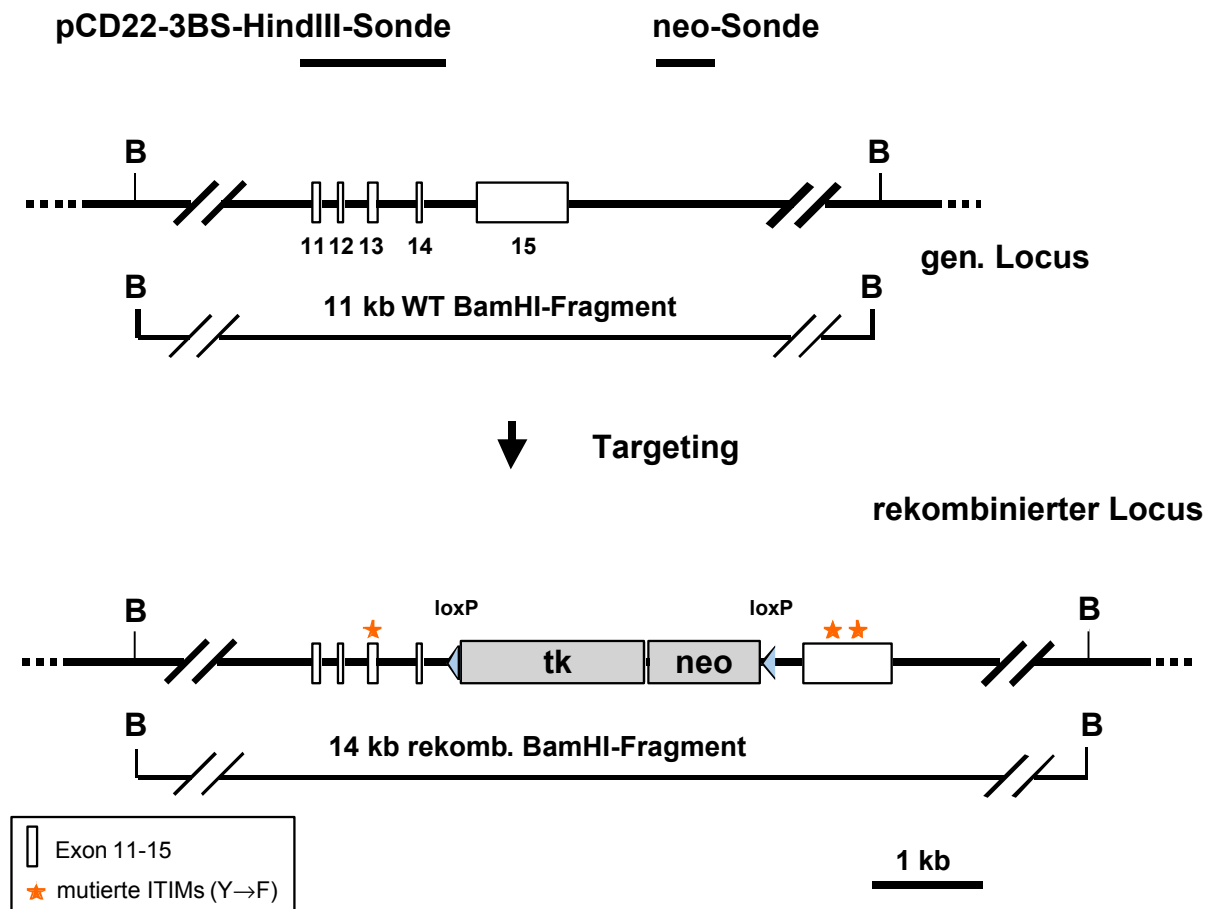


Abb. 13: CD22 Wildtyplocus und mit pCD22-ITIM-KO rekombinierter Locus mit Schnittstellen für das Restriktionsenzym BamHI (B). Nach Verdau mit BamHI entstehen die dargestellten Fragmente. Der rekombinierte Locus ist durch Integration der neo/tk-Kassette gegenüber dem Wildtyplocus um 3 kb vergrößert.

Abbildung 14 zeigt als Beispiel einen Southern Blot der CD22-ITIM-KO Klone YFtar3F1 und YFtar10E3. Die Blots ergaben, daß YFtar3F1 und YFtar4E6 frei von Zusatzintegrationen waren. Bei YFtar10E3 jedoch wurde eine weitere Kopie des Konstrukts im Genom gefunden (nicht gezeigt).

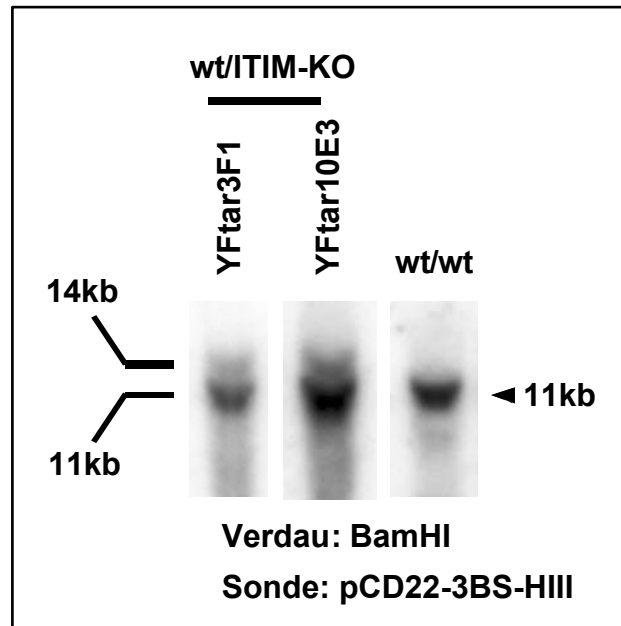


Abb. 14: Southern Blot von genomischer DNA der in der PCR als korrekt rekombiniert identifiziert identifizierten CD22-ITIM-KO Klone YFtar3F1 und YFtar10E3. Durch die Integration von pCD22-ITIM-KO mit der 3 kb neo/tk Kasette in den CD22 Locus erhöht sich die Größe des 11 kb wt BamHI-Fragmentes auf 14 kb (s. Abb. 13).

3.1.8 Bestätigung der Mutationen durch Sequenzierung

Bei homologer Rekombination eines Targeting-Vektors mit dem genomischen Locus kommt es vor, daß trotz Integration der Selektionskassette die einzuführenden Veränderungen nicht mit in das Genom integriert werden. Das liegt daran, daß der Startpunkt der homologen Rekombination unter Umständen zwischen der Mutation und der Selektionskassette liegt. Je größer die Distanz zwischen Kasette und Mutation, umso höher ist die Wahrscheinlichkeit dafür. Nach der Bestätigung der homologen Rekombination durch Southern Blot wurde deshalb zusätzlich geprüft, ob die Mutationen tatsächlich wie gewünscht eingeführt wurde.

Die entsprechenden Regionen der CD22-ITIM-KO bzw. der CD22-Tailless ES-Zell Klone wurden dazu sequenziert. Bei dem hierzu entwickelten Protokoll wurden die zu sequenzierenden Abschnitte zunächst mit einer geschachtelten PCR mit Taq-Polymerase aus der genomischen DNA der Klone amplifiziert. Für die anschließenden Sequenzierreaktionen wurden die entstehenden PCR-Produkte direkt als Template eingesetzt. Durch den Verzicht auf Subklonierung einzelner Moleküle vor Sequenzierung fallen Nukleotid-Fehleinbauten durch die Taq-Polymerase in einzelnen Molekülen gegenüber der Masse amplifizierter Moleküle nicht ins Gewicht. Die Primer auf einer Seite der amplifizierten Region wurden dabei so gewählt, daß sie innerhalb der Selektionskassette des Targeting-Konstrukts lagen (s. Direkte Sequenzierung).

Zur Sequenzierung der Mutationen in den CD22-Tailless wurde die genomische DNA der Klone in der ersten Runde der geschachtelten PCR mit den Primern CD22ex13-3 und OLneo8, in der zweiten Runde mit CD22ex12AS und OLneo9 amplifiziert. Der Primer für die Sequenzierreaktion war CD22in11/12-5 (Lage der Primer s. Anhang). Die Sequenzierung ergab, daß alle geprüften Klone das gewünschte Stop-Codon im Exon 12 sowie die damit eingeführte BamHI-Schnittstelle trugen.

Zur gleichen Zeit wurden YFtar3F1, YFtar4E6, und YFtar10E3 sequenziert, um die eingeführten Mutationen zu überprüfen. Die Primer für die allelspezifische Amplifikation der

Sequenzen die die Mutationen in Exon 13 umgeben waren CD22in11/12-5 und tk-3`1 (1. Runde) bzw. CD22in12/13-5 und tk-3`3 (2. Runde). Die Primer für Exon 15 waren CD22-3Bam und OLneo8 (1. Runde) bzw. CD22-3E und OLneo9 (2. Runde). Die Primer für die Sequenzierreaktionen waren CD22in12/13-5 und CD22in13/14-3 für Exon 13 bzw. CD22-3E für Exon 15. Die Sequenzierung erfolgte wie unter 2.2.1.20. Die drei geprüften Klone wiesen alle die gewünschte Mutation in Exon 15 auf. Nur YFtar3F1 dagegen trug auch die Mutation in Exon 13. Bei den Klonen YFTar4E6 und YFTar10E3 wurde jedoch anstelle der Sequenz des Mutageneseprimers die Wildtyp-Sequenz im rekombinierten CD22-Allel gefunden. Insgesamt war damit der Klon YFtar3F1 vollständig charakterisiert, und trug alle gewünschten Mutationen.

3.1.9 Deletion der neo/tk-Kassette in ES-Zellen durch transiente Expression von Cre-Rekombinase

Der abschließende Schritt nach Bestätigung der homologen Rekombination durch PCR und Southern Blot, und der Überprüfung der eingeführten Mutationen per Sequenzierung ist die Deletion der neo/tk-Kassette durch transiente Expression der Cre-Rekombinase. ES-Zell Klone wurden dazu mit dem Vektor pMCCreN transfiziert. Dieses Plasmid trägt das Gen für die Cre-Rekombinase unter einem HSV-tk-Promotor, der eine starke ubiquitäre Expression des Enzyms gewährleistet. Die Klone M12 2.2, M12 2.3 und M12 4.1. Um eine stabile Integration des Plasmids in das Genom zu vermeiden, wurde die DNA jedoch zuvor nicht linearisiert. Nach 24 h wurde mit der Selektion mit 2 μ M Ganciclovir in Abwesenheit von G418 begonnen. Klone mit der neo/tk-Kassette exprimieren das Gen für die Herpes Simplex Thymidin-Kinase. Dieses Enzym katalysiert die Phosphorylierung von Ganciclovir, einem Nukleosidanalogon. Von der zelleigenen DNA-Polymerase wird das Produkt in die DNA eingebaut, was zum Kettenabbruch führt. Folglich überleben Klone, die die Selektionskassette nicht korrekt deletiert haben die Selektion nicht. Es hat sich jedoch herausgestellt, daß es neben der Cre-Deletion auch alternative Wege für die Zelle gibt, das tk-Gen zu inaktivieren. Deshalb musste nach Transfektion, Selektion und Isolation einzelner überlebender Klone die Deletion der Selektionskassette geprüft werden.

Die im ersten PCR-Screening als positiv identifizierten CD22-ITIM-KO Klone YFtar3E5, YFtar3F1, YFtar4E6, YFtar4F3, und YFtar10E3 Transfektion wurden sofort im Zuge des Screenings, also während sie sich noch in Kultur befanden, mit pMCCreN transfiziert. Damit sollte zusätzlicher Streß für die Zellen durch Einfrieren und Auftauen vermieden werden.

Zur Identifikation Cre-deletierter Subklone wurde eine geschachtelte PCR mit DNA-Rohlysaten einzelner ES-Zell Kolonien als Ausgangsmaterial durchgeführt. Die Primer waren für die erste Runde CD22in13/14-5 und CD22-3E, für die zweite Runde CD22ex14-5 und CD22-3D (s. Anhang). Die beschriebene Primerkombination führt innerhalb des Wildtyplocus zur Amplifikation eines 434 bp PCR-Produktes. Nach erfolgreicher Cre-Deletion der neo/tk-Kassette verbleibt im rekombinierten Locus eine loxP-Sequenz zusammen mit flankierenden Sequenzen, die durch das Einsetzen der Kassette in die HindIII Schnittstelle eingeführt wurden. Die Länge des PCR-Produktes erhöht sich deshalb um 96 bp auf 530 bp. Bei nicht erfolgreich verlaufener Cre-Deletion dagegen würde die gesamte Selektionskassette amplifiziert, was einem Produkt von 3634 bp entspräche. Dieses Produkt wurde jedoch nie beobachtet, wahrscheinlich aufgrund der bevorzugten Amplifikation des viel kleineren Produktes des Wildtyplocus. In Abbildung 15 ist eine PCR von 4 Cre-deletierten Subklonen des CD22-ITIM-KO Klons YFtar3F1 zu sehen. In der ebenfalls dargestellten Wildtyp-Kontrolle ist lediglich die Wildtyp-Bande bei 434 bp zu erkennen.

Von allen positiven CD22-ITIM-KO Klonen wurden auf diese Weise Cre-deletierte Subklone gewonnen. Je ungefähr 20 von jedem wurden expandiert, und in Aliquots eingefroren.

Die Cre-Deletion der ursprünglich als korrekt rekombiniert identifizierten CD22-Tailless Klone M12.2.1, M12.2.2, M12.2.3, M12.4.1, und M12.4.2 fand zur gleichen Zeit statt. Als Primer für die erste Runde wurden zunächst CD22in10-1 und CD22ex12-3-Stop getestet, für die zweite Runde CD22in10-2 und Cd22-3Sal. Mit dieser Kombination wurde für das Wildtypallel ein Produkt von 1,1 kb erwartet. Bleibt nach Cre-Deletion im rekombinierten Locus eine loxP-Sequenz und ein Stück umgebende Sequenz der Selektionskassette zurück, sollte sich die Größe des Produktes auf 1,2 kb erhöhen. Die PCR konnte jedoch mit dieser Primerkombination nicht erfolgreich durchgeführt werden. Es wurde in keinem Fall die erwartete Doppelbande beobachtet.

Alternativ wurde für die zweite PCR-Runde die Primerkombination CD22in10-2 und loxS2 gewählt. In diesem Fall entsteht ein Produkt nur mit dem rekombinierten Locus als Matrize, weil loxS2 innerhalb der loxP-Sequenz bindet, die im Wildtyp-Allel nicht vorhanden ist. Um die Längenunterschiede der Produkte von Wildtyp bzw. rekombiniertem Locus besser detektieren zu können wurden noch weitere Primer entworfen (1. Runde: CD22in10-3 und CD22in10-3`1, 2. Runde CD22in10-4 und CD22in10-3`2). Diese bilden Paare, die näher zusammen liegen. Die Unterschiede zwischen WT und rekombiniertem Locus vergrößern sich dadurch relativ. Aber auch mit diesen alternativen Primerpaaren wurde kein Erfolg erzielt. Es ist anzunehmen, daß dies wirklich auf Probleme mit der PCR zurückzuführen war, da die Cre-Deletion in den parallel mit dem gleichen Plasmid transfizierten CD22-ITIM-KO Klonen offensichtlich problemlos verlief. Aufgrund des Verlaufs der ersten Blastozysteninjektionen (s. nächster Abschnitt) wurden weitere Versuche einer PCR-Optimierung zunächst auf späteren Zeitpunkt verschoben.

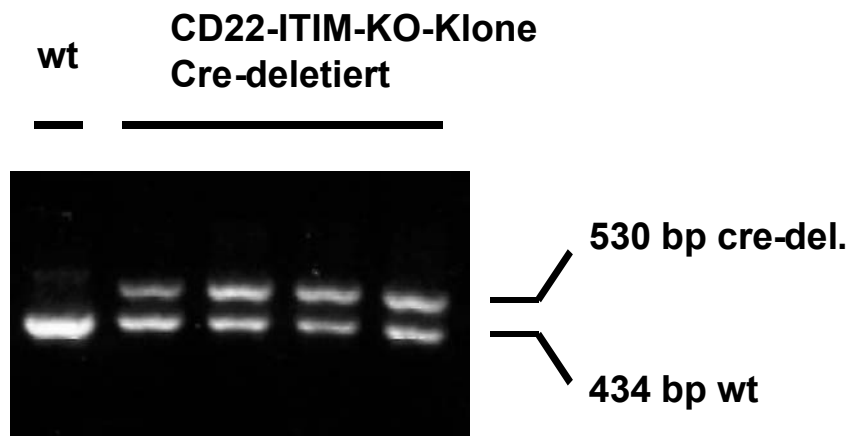


Abb. 15: PCR von einzelnen ES-Zell Klonen nach transienter Expression der Cre-Rekombinase und Selektion und Isolation Ganciclovir-resistenter Klone; wt: C57BL/6 Wildtyp-Kontrolle; die Amplifikation erfolgte mittels geschachtelter PCR mit den Primerpaaren CD22in13/14-5/CD22-3E und CD22ex14-5/CD22-3D; die gezeigten Klone sind Tochterklone von YFtar3F1; wt: Wildtyp, cre.-del.: Cre-deletiert

3.1.10 Blastozysteninjektion vollständig charakterisierter ES-Zell Klone

Obwohl bereits Cre-deletierte Subklone von CD22-ITIM-KO ES-Zell Klonen vorlagen, waren diese noch nicht durch Southern Blot charakterisiert, und die Sequenzierung der Mutation in Exon 13 gestaltete sich zunächst ebenfalls als schwierig. Die Sequenzierung und die Charakterisierung durch Southern Blot der CD22-Tailless Klone M12.2.1, M12.2.3, M12.4.1 und M12.4.2 war dagegen zu diesem Zeitpunkt bereits abgeschlossen. Wie im

vorhergehenden Abschnitt beschrieben, gab es hier jedoch Probleme mit dem Nachweis einer erfolgreichen Cre-Deletion der neo/tk-Kassette.

Zudem war die verwendete ES-Zelllinie C57BL/6-III seit sie an unserem Institut in Kultur genommen wurde bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht in Blastozysten injiziert worden. Bei der Blastozysteninjektion werden ES-Zellen in 3,5 Tage alte Mäuseembryonen injiziert. Diese werden einem scheinträchtigen Weibchen (Amme) in den Uterus implantiert. Die ES-Zellen können, je nach dem Ausmaß ihrer Pluripotenz, zur Entwicklung vieler Gewebe des Embryos, unter anderem von Keimbahnzellen, beitragen. Unter ungünstigen Kulturbedingungen kann die Pluripotenz der ES-Zellen verlorengehen. Die Fähigkeit, die Keimbahn zu besiedeln, geht in der Regel sehr schnell verloren. Eine Injektion kann deshalb ein wichtiger Test der Pluripotenz einer Zelllinie sein.

Aus diesem Grund wurde beschlossen, vollständig charakterisierte, aber noch nicht Cre-deletierte CD22-Tailless Klone zu injizieren. Im Falle der Gewinnung chimärer Tiere bestand außerdem die Möglichkeit, diese dann zur Deletion der neo/tk-Kassette mit sog. Cre-Deleter Mäusen zu verpaaren. Diese exprimieren die Cre-Rekombinase als konstitutiv aktives Transgen. Im Fall der Keimbahntransmission des rekombinierten CD22 Locus würde dann die Selektionskassette bei Befruchtung nach dem Verschmelzen der Vorkerne deletiert.

Die Injektion fand in der Arbeitsgruppe von Birgit Ledermann am Institut für Versuchstierkunde an der Universität Zürich-Irchel statt. Ausgewählt wurden die Klone M12.2.3 und M12.4.1. Beim Absenden hatte M12 2.3 die Passagenzahl 30 (P_{30}) und M12 4.1 P_{27} (das Experiment war mit P_{17} gestartet worden). Von keinem der beiden Klone konnten chimäre Tiere gewonnen werden. Die Ammen, denen die injizierten Embryonen implantiert wurden, wurden zwar schwanger, aber die Embryonen wurden offenbar vor Ende der Schwangerschaft resorbiert. Als eine mögliche Ursache wurde das relativ hohe Alter der Klone in Kultur bis zur Injektion angesehen. Ein Maß für das Kulturalter der Zellen ist dabei die Passagenzahl der ES-Zellen.

Bis die Ergebnisse der Injektionsserien mit M12.2.3 und M12.4.1 vorlagen, war die Charakterisierung des CD22-ITIM-KO Klons YFtar3F1 hinsichtlich der Mutation in Exon 13 und der Abwesenheit von zusätzlichen Integrationen abgeschlossen. Die Transfektion, die zur Gewinnung dieses Klones geführt hatte, war mit ES-Zellen der Passage P_{14} begonnen worden. Wie geschildert, standen von diesem Klon Cre-deletierte Subklone zur Verfügung. Aufgrund der Injektionsergebnisse der Klone M12.2.3 und M12.4.1 sollten aber Zellen injiziert werden, die eine möglichst kurze Zeit in Kultur verbracht hatten und nicht ein zweites Mal (zur Cre-Transfektion) elektroporiert waren. Deshalb wurden Zellen des Mutterklons YFtar3F1 für die Injektion zu Birgit Ledermann nach Zürich geschickt (als P_{20}). Wie bei der vorhergehenden Serie von Injektionen wurden jedoch auch hier keine chimären Tiere erhalten.

3.1.11 Neue Transfektionen der Targeting-Konstrukte

Die Injektion der CD22 Tailless-Klone M12.2.3 und M12.4.1 hatte wie geschildert keinen Erfolg gebracht, und dies wurde auf die Qualität der ES-Zellen zurückgeführt. Unmittelbar nach dem Ergebnis der Injektion und noch vor der Injektion des CD22-ITIM-KO Klons YFtar3F1, wurde darum bereits ein vollständig neues Targeting-Experiment sowohl mit pCD22-ITIM-KO als auch mit pCD22-ex12-Stop in Angriff genommen. Dabei wurde mit den jüngsten uns zur Verfügung stehenden C57BL/6-III ES-Zellen (P_{11}) gearbeitet.

Aus der pCD22-ITIM-KO Transfektion wurden zwei Klone mit korrekter Integration des Konstrukts mittels PCR identifiziert. Im Southern Blot wurden, wie auch für das erste Experiment beschrieben, Zusatzintegrationen ausgeschlossen. Die Klone erhielten die Bezeichnungen YFTar12B4, und YFTar12B5. Sequenzierung zeigte, daß YFTar12B5 die eingeführten Mutationen besaß. Das Exon 13 von YFTar12B4 besaß, wie auch schon Klone

aus dem vorhergehenden Experiment, die Wildtyp-Sequenz, anstelle der Sequenz des Mutageneseprimers (s. 3.1.8).

Die neue Transfektion des CD22-Tailless Vektors pCD22-ex12-Stop führte zur PCR-Identifikation von 3 korrekt rekombinierten Klonen. Zwei dieser Klone, M12.10D5 und M12.8D1 konnten wie unter 3.1.7 im Southern Blot bestätigt werden. Die nachfolgende Sequenzierung bestätigte bei beiden Klonen, daß die gewünschten Mutationen eingeführt waren (s. 3.1.8).

YFTar12B5 wurde zusammen mit M12.10D5 zur Injektion zu B. Ledermann geschickt. Beide Klone hatten zum Zeitpunkt des Absendens die Passage 17. Trotz dieser zügigen und sorgfältigen Manipulation der ES-Zellen in vitro konnten bei zwei Injektionen des CD22-Tailless Klons M12.10D5 keine Chimären erhalten werden. Die Injektion von YFTar12B5 dagegen ergab 2 hochchimäre männliche Tiere.

Birgit Ledermann war zum Zeitpunkt der Injektion nicht bewußt gewesen, daß die Klone noch eine neo/tk-Kassette enthielten. Nachdem wir ihr mitteilten, daß wir beabsichtigten, die Chimären mit Cre-Deleter Mäusen zu verpaaren, um die neo/tk-Kassette in vivo zu deletieren, teilte uns Frau Ledermann mit, daß Berichte über Infertilität bei männlichen Mäusen aufgrund von Expression der HSV Thymidin-Kinase in Keimbahnzellen existieren (Braun et al. 1990; al-Shawi et al. 1991). Bei Chimerismus bedeutet das, daß bei den Keimbahnzellen, die von ES-Zellen mit neo/tk-Kassette abstammen, die Spermatogenese defekt ist. Dies wurde uns auch von verschiedenen anderen Seiten bestätigt, und war uns davor nicht bekannt gewesen. In der darauffolgenden Zeit erhielten wir auch gegenteilige Informationen über die Fähigkeit von Männchen, trotz Expression von HSV-tk Mutationen durch die Keimbahn weiterzugeben (Philipp Yu, persönliche Mitteilungen). Dennoch beschlossen wir, nur noch Zellen nach Deletion der neo/tk-Kassette zu injizieren. Die Chimären von YFTar12B5 wurden verpaart, aber beide Tiere gaben die Mutation nicht weiter. Ob das daran liegt, daß die injizierten ES-Zellen nicht zu Keimbahnzellen differenzierten, oder daran, daß aus ES-Zellen entstandene Keimbahnzellen keine funktionalen Spermien generierten, ist unklar.

3.1.12 Transfektionen mit anderen Zelllinien – BALB/c-I

Eine Reihe von Injektionen von C57BL/6-III Klonen war wie beschrieben nur mit eingeschränktem Erfolg verlaufen. Das war auch bei einem anderen Doktoranden unserer Gruppe, der zur gleichen Zeit an einem vergleichbaren Gene-Targeting Experiment mit der gleichen ES-Zelllinie arbeitete der Fall. Generell gilt, daß ES-Zellen in Kultur instabil hinsichtlich ihres Karyotyps und der Fähigkeit sind, zur Bildung von Keimbahnzellen in Embryonen beizutragen (Baribault and Kemler 1989). Besonders trifft das auf Linien aus C57BL/6 zu. Dennoch gab es Argumente, die aus unserer Sicht für eine Verwendung von C57BL/6-III sprachen. Die Linie war zum einen vorher erfolgreich z.B. am Max-Planck-Institut für Immunbiologie in einer Reihe von Projekten verwendet worden. Unter anderem wurden mit dieser Zelllinie die CD22-/- Maus hergestellt. Deshalb wiederum war es erstrebenswert, neue CD22 Knockin-Mäuse auf dem selben Hintergrund zu generieren.

Trotz dieser Gründe für die Verwendung von C57BL/6-III wurde aufgrund der erfolglosen Injektionen versucht, homolog rekombinante Klone von anderen, als stabiler bekannten ES Zelllinien mit pCD22-ITIM-KO und pCD22-ex12-Stop zu erhalten. Zeitgleich mit den im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Injektionen des CD22-Tailless Klons M12.10D5 und des CD22-ITIM-KO Klons YFTar12B5 wurde als erstes die ES-Zelllinie BALB/c-I (Noben-Trauth et al. 1996) getestet. Von vornherein war dabei unklar, wie groß die Aussicht auf den Erhalt homologer Rekombinanten sein würde, da die Targeting-Konstrukte auf genomischer DNA von C57BL/6 basierten. Die Frequenz der homologen Rekombination kann bei

Verwendung einer nicht-isogenen Zelllinie wie BALB/c-I dramatisch sinken (te Riele et al. 1992; Zhou et al. 2001).

Zellen von BALB/c-I (P₁₄) wurden mit pCD22-ITIM-KO bzw. pCD22-ex12-Stop transfiziert, selektioniert, und einzelne Klone isoliert und DNA-Rohlysate hergestellt wie beschrieben. 600 Klone von jedem Konstrukt wurden gescreent. Dabei wurden weder mit pCD22-ex12-Stop, mit dem zuvor die höhere Rekombinationsfrequenz von etwa 1 zu 50 erreicht wurde, noch mit pCD22-ITIM-KO korrekt rekombinierte Klone erhalten.

Bei den Screenings mit BALB/c-I, wie auch bei einigen anderen Experimenten vorher, fiel auf, daß die Qualität der PCR zur Identifikation homolog rekombinierter Klone nicht immer vollständig zufriedenstellend war. Auf dem Gel war manchmal anstatt distinkter Bande ohne Hintergrund oft ein Schmier mit nur undeutlicher Bande zu sehen. Nach dem Screening wurde daher versucht, die Screening-PCR noch weiter zu optimieren. Die Tests wurden für das pCD22-ex12-Stop-Konstrukt vorgenommen. Nochmals wurden verschiedene Primer, darunter auch die neuen CD22in10-4 und CD22in10-5 getestet. Darüber hinaus wurden die Primerkonzentrationen für die erste bzw. zweite Runde der geschachtelten PCR, die in die erste Runde eingesetzte Lysatmenge und das von der ersten in die zweite Runde übertragene Reaktionsvolumen variiert. Als entscheidende Verbesserung stellte eine Verkleinerung des Volumens heraus, das von der ersten Runde der geschachtelten PCR in die zweite übertragen wird (2 µL anstatt wie bisher 5 µL). Für ein Protokoll der veränderten Bedingungen s. Materialien und Methoden, Abschnitt 2.2.1.21. Die Bedingungen für das Screening von CD22-ITIM-KO Klonen wurden hinsichtlich der Lysatmenge und des übertragenen Reaktionsvolumens angeglichen.

Nach dieser neuerlichen Optimierung der PCR wurde das nicht zufriedenstellende Screening der mit pCD22-ITIM-KO bzw. pCD22-ex12-Stop transfizierten BALB/c-I Klone mit den gleichen DNA-Rohlysaten wiederholt. Auch jetzt konnten weder positive CD22-ITIM-KO noch CD22-Tailless Klone gefunden werden. Um das geringe Risiko, daß durch stammspezifische Unterschiede im CD22-Gen die PCR mit den benutzten Primern nicht funktional ist, zu minimieren, wurde das Screening mit alternativen Primer-Kombinationen wiederholt. Auch dabei wurden keine positiven Klone gefunden.

Ein Problem, das vor der Verbesserung der PCR bereits auftrat und danach bestehen blieb, war das Auftauchen einzelner, falsch positiver Banden in Screenings. Beim Versuch der Wiederholung der PCR von dem gleichen Rohlysat konnte das positive Resultat in einem solchen Fall nicht reproduziert werden. Eine mögliche Erklärung für ein solches Phänomen könnte die Kontamination einzelner Reaktionen mit minimalen Mengen von Amplifikat positiver Klone (z.B. von der Positivkontrolle) aus der ersten Runde der geschachtelten PCR sein. Eine Reihe falsch positiver Banden tauchte bei dem Screening der BALB/c-I Klone auf. Viele Klone wurden deshalb fälschlicherweise expandiert, und genomische DNA wurde präpariert. In späteren Screenings wurde deshalb vor Expansion eines Klonen immer zuerst die Screening-PCR von dem gleichen Rohlysat wiederholt.

3.1.13 Änderung der Kulturbedingungen für ES-Zellen

Im Zuge der Überlegung nach einer Optimierung der Gene-Targeting Experimente wurden während der Transfektionen mit BALB/c-I ES-Zellen die Kulturbedingungen für die Zellen geändert.

Das geschah auf einen persönlichen Hinweis von Philipp Yu hin, einem ehemaligen Mitarbeiter am MPI in Freiburg. Bis dahin war Medium aus Pulver von der hauseigenen Medienküche hergestellt worden. Dabei wurden Glasflaschen aus dem hauseigenen Spülzyklus die mit Tensiden in Kontakt kamen benutzt, was von Philipp Yu als besonders kritisch angesehen wurde. Von diesem Zeitpunkt an wurde Fertigmedium (DMEM,

Gibco/Invitrogen) verwendet. Alle Supplemente (β -Mercaptoethanol, Penicillin/Streptomycin, Glutamin) waren von nun an ebenfalls von Gibco/Invitrogen, und wurden von uns selbst in neue Plastikgefäße aliquotiert, anstatt von der Medienküche in gespülte Glasröhrchen. Das früher vom Haus verwendete PBS wurde ab jetzt ebenfalls durch eine fertige Lösung von Gibco/Invitrogen ersetzt.

3.1.14 Deletion der Selektionskassette in dem CD22-ITIM-KO Klon YFtar12B5

Das weitere Vorgehen wurde von verschiedenen Überlegungen bestimmt. Es war anscheinend nicht möglich, rekombinante Klone mit den C57BL/6 Vektoren in der stabileren Zelllinie BALB/c-I zu erhalten. Deshalb musste auf C57BL/6-III zurückgegriffen werden. Es machte, wie in 3.1.11 geschildert, nur Sinn, Cre-deletierte Klone aus C57BL/6-III zu injizieren. Vollständig charakterisierte und Cre-deletierte Subklone lagen bis dahin nur von dem CD22-ITIM-KO Mutterklon YFtar3F1 vor. Da bereits die Injektion dieses Mutterklones keine Chimären Tiere ergab, wurde die Wahrscheinlichkeit eines Erfolgs mit Cre-deletierten Subklonen als gering eingestuft.

Da bei der Injektion des CD22-ITIM-KO Klons YFtar12B5 auf Anrieb chimäre Tiere erhalten wurden, wurde beschlossen, Cre-deletierte Subklone von diesem Klon zu erzeugen, und diese in Blastozysten zu injizieren. Nach Transfektion mit pMCCreN und nachfolgender Selektion mit Ganciclovir gab es nur sehr wenige überlebende Klone, und diese wiesen nicht das erwartete Resultat in der PCR auf, sondern nur eine Wildtyp-Bande. Anzumerken ist dabei, daß die Plasmid-DNA nicht aus genau derselben, bereits auf erfolgreiche Cre-Deletion getesteten Präparation stammte, die ursprünglich verwendet wurde. Diese Charge war noch von Lars Nitschke in Freiburg hergestellt und getestet worden. Die jetzt verwendete Charge war dagegen nicht vorgetestet. Zunächst wurde diesem Umstand aber wenig Bedeutung beigemessen.

Um toxische Abbauprodukte der relativ alten Ganciclovir Charge auszuschließen, wurde eine neue mit dem gleichen Resultat eingesetzt. pMCCreN wurde daraufhin neu präpariert. Das alte, getestete Plasmid wurde neu transformiert und zwei verschiedene Plasmidpräparationen hergestellt. Zwei weitere wurden von Klonen aus einem Glycerinstock des ursprünglichen Plasmids gemacht. Alle vier Plasmide wurden mittels Transfektion einer ES-Zelllinie getestet, bei der nach Cre-Deletion eines Fragments ein lacZ-Reportergen aktiviert wird. Leider konnte das mit Sicherheit funktionierende Plasmid nicht mit getestet werden, weil nur noch sehr wenig DNA vorhanden war. Die Präparation, die als am besten getestet wurde, wurde für eine neuerliche Transfektion von YFtar12B5 verwendet, wiederum ohne Erfolg.

Ganciclovir zeigt einen sog. „bystander effect“, was hier bedeutet, daß bei Expression der HSV-tk in wenigen Zellen eines Verbandes phosphoryliertes Ganciclovir durch Gap-Junctions in Nachbarzellen gelangen und diese töten kann. Um zu verhindern, daß alle Kolonien aufgrund residualer HSV-TK-Moleküle in der ursprünglichen Zelle sterben, wurde die Selektion in der nächsten Transfektion erst 60 h nach der Elektroporation begonnen. Dies resultierte zwar in deutlich mehr überlebenden Klonen, keiner von diesen zeigte aber das richtige PCR-Ergebnis. Auch eine Änderung des Transfektions-Protokolls, nach dem die Klone vor Einsetzen der Selektion trypsinisiert und damit vereinzelt werden, brachte keinen Erfolg.

Um prinzipielle Fehler auszuschließen, wurden parallel die loxP-Sequenzen der Targeting-Vektoren getestet, und die loxP-Sequenzen von YFtar12B5 sowie die obere Bande von einer alten Cre-PCR eines erfolgreich Cre-deletierten CD22-ITIM-KO Subklones sequenziert. Die loxP-Sequenzen erwiesen sich als funktionell (Details des Tests s. Materialien und Methoden), und die Sequenzen waren wie erwartet.

Daraufhin wurden eine Reihe alternativer Expressionsplasmide für die Cre-Rekombinase beschafft. Eine Version des ursprünglichen Plasmids pMCCre erhielten wir von Klaus Rajewsky, Markus Mohrs (pMCCreN), und Michael Sendtner. pCMVCre war ein Geschenk von Burkhard Kneitz, pCX-NLSCre erhielten wir von Andras Nagy. Die Plasmide pMCCre von Michael Sendtner und pCX-NLSCre von Andras Nagy wurden zuerst getestet, und es konnten sofort Cre-deletierte Subklone von YFtar12B5 mit beiden Plasmiden gewonnen werden.

3.1.15 Neue Transfektionen in C57BL/6-III

Unter dem Gesichtspunkt der verbesserten Kulturbedingungen und der nochmals optimierten PCR wurden nochmals neue Transfektionen von pCD22-ITIM-KO und pCD22-ex12-Stop in C57BL/6-III durchgeführt.

Bei der Transfektion mit pCD22-ITIM-KO wurden zunächst zwei Klone von 500 per PCR als homologe Rekombinante identifiziert (Transfektion 11/00). Einer von beiden wuchs jedoch nicht. Die Charakterisierung von YFtar29D2 während der Sequenzierungen war zweifelhaft, so daß mit diesem Klon nicht weitergearbeitet wurde. Das PCR-Produkt zur direkten Sequenzierung der Mutation in Exon 13 konnte nicht korrekt amplifiziert werden. Die Transfektion von pCD22-ex12-Stop brachte 11 PCR-positive Klone von 400 gescreenten.

3.1.16 Blastozysteninjektion von CD22-ITIM-KO Klonen nach Cre-Deletion

Die Deletion der Selektionskassette aus dem CD22-ITIM-KO Klon YFtar12B5 war, wie beschrieben (s. Abschnitt 3.1.14), mit sehr viel Arbeit und Zeitaufwand verbunden. Bis zur Lösung der Probleme wurde daher versucht, Cre-deletierte Subklone des früher nicht erfolgreich injizierten (s. 3.1.10) Klons YFtar3F1 zu injizieren. Es wurde auf die Klone YFTar3F1CreC/B2 und YFTar3F1CreC/B4 zurückgegriffen. Die Aussicht auf Erfolg wurde angesichts der früheren Ergebnisse als eher gering eingestuft. Es bestand aber die Möglichkeit, daß im Gegensatz zu dem Mutterklon einzelne der Tochterklone noch Potential zur Erzeugung Chimärer und zur Keimbahntransmission besaßen (s. auch Diskussion 4.1.2).

Die Injektion von YFTar3F1CreC/B2 und YFTar3F1CreC/B4 fand sowohl bei B. Ledermann, als auch in unserem Institut durch Dr. Burkhard Kneitz statt. Bei Injektion hatte YFTar3F1CreC/B4 die Passage P₃₂. Die Injektionsserie bei B. Ledermann ergab nichts. Ein Wurf der von B. Kneitz injizierten Serie enthielt 8 Tiere. 4 davon waren chimär, 3 von diesen waren Männchen mit einem geschätzten Chimerismus von 60%, 40% bzw. 20% (s. Abb. 16). Eins der Tiere war weiblich und ungefähr zu 20% chimär. Die Tiere erhielten die Bezeichnungen C1-C4. In einer späteren Injektionsserie ergab ein anderer Subklon von YFTar3F1, YFTar3F1CreB1 einen Wurf von 4 Tieren mit einem zu ca. 50% chimären Männchen (C5).

Als die Probleme mit der Cre-Deletion überwunden waren, und deshalb Cre-deletierte Subklone von YFTar12B5 generiert werden konnten, wurden auch hier Injektionen vorgenommen. 4 verschiedene Subklone wurden von B. Kneitz injiziert (YFTar12B5CreS2A5, S2F4, S3A7, S3D8), 2 andere von B. Ledermann (S2C8, S1C8). Die Injektion von YFTar12B5CreS2F4 ergab einen Wurf mit 7 Tieren, darunter ein sehr hochchimäres (ca. 90%). Dieses verstarb aber binnen weniger Tage nach der Geburt.

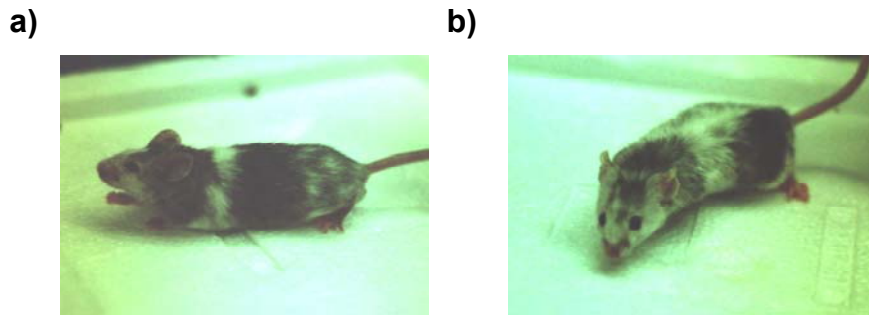


Abb. 16: Chimäre Männchen aus einer Injektion des CD22-ITIM-KO Klons YFtar3F1CreC/B4. Geschätzter Chimerismus der Tiere: a) Chimäres C1, ca. 60%, b) Chimäres C2, ca. 40%. Beide Tiere wurden mit C57BL/6 Weibchen verpaart. Keines der chimären Tiere (insges. 5, s. Text) gab die Mutation durch die Keimbahn weiter.

Die Chimären wurden mit C57BL/6 Mäusen verpaart. Keimbahntransmission der ES-Zellen ist in diesem Fall an der schwarzen Fellfarbe der Nachkommen zu erkennen. Stammt dagegen die befruchtende Keimzelle von der BALB/c-Blastozyste ab, so ist die Fellfarbe des entsprechenden Nachkommen braun. Mit keinem der hier erhaltenen chimären Tiere wurde Keimbahntransmission erhalten.

Aus einem vergleichbaren Knockin-Projekt in unserer Arbeitsgruppe mit der gleichen ES-Zelllinie gingen auch chimäre Mäuse hervor. Auch hier gab es keine Keimbahntransmission.

Zum Vergleich wurde in unserer Gruppe das Potential zur Keimbahntransmission der ursprünglichen ES-Zelllinie getestet. Dazu wurden die jüngsten uns zur Verfügung stehenden Zellen (P_{11}) über 5 Passagen unter den üblichen Bedingungen kultiviert, und dann in BALB/c Blastozysten injiziert. Es ergab sich ein Wurf mit 4 chimären Männchen mit einem Chimerismus von ca. 95% (B6-3), 90% (B6-2), bzw. 90% (B6-1). Die Tiere wurden mit BALB/c Weibchen verpaart. Keimbahntransmission ist dann an der braunen Fellfarbe der Nachkommen zu erkennen (C57BL/6 x BALB/c = Agouti). Mit B6-3 wurde sofort in der ersten Verpaarung Keimbahntransmission erhalten. Von 6 Nachkommen waren 4 Agouti. Eines der anderen Tiere (B6-1) war steril. Das andere (B6-2) hatte Nachkommen, aber alle mit weißer Fellfarbe (BALB/c).

3.1.17 Transfektionen in anderen Zelllinien – E14Tg2a

Als weitere alternative ES-Zelllinie zu C57BL/6-III und BALB/c-I wurde uns während der Zeit der Injektionen mit verschiedenen C57BL/6-III CD22-ITIM-KO und CD22-Tailless Klonen die sehr weit verbreitete ES-Zelllinie E14Tg2a von Michael Sendtner zur Verfügung gestellt. Der genetische Hintergrund dieser Zelllinie, 129/ola, ist bedeutend näher an BL/6 als der von BALB/c. Bei einer Transfektion von pCD22-ITIM-KO konnte unter 600 gescreenten Klonen kein positiver gefunden werden. Auch bei einer späteren Transfektion mit pCD22-ex12-Stop, das in BL/6 eine bedeutend höhere Frequenz korrekter Rekombination gezeigt hatte, wurde bei 650 gescreenten Klonen kein PCR-positiver Klon erhalten.

3.1.18 Transfektionen in nicht-isogene Zelllinien mit umgebauten Targeting-Vektoren

Die Frequenz der homologen Rekombination des C57BL/6 Targeting-Vektors pCD22-ITIM-KO in der Zelllinie C57BL/6-III (2,3%) war gegenüber der von pCD22-ex12-Stop (0,375%) ca. 6 mal geringer. In nicht-isogenen Zelllinien fällt diese Frequenz normalerweise noch weiter ab. Um die Wahrscheinlichkeit der homologen Rekombination in E14Tg2a, einer 129/ola Zelllinie, zu erhöhen, sollte der lange Arm des Vektors mit einem möglichst großen

Stück 129/ola-DNA verlängert werden. Da uns das CD22 Gen in 129/ola nicht kloniert zur Verfügung stand, und das Screenen z.B. einer Phagen-Bibliothek sehr arbeits- und zeitaufwendig gewesen wäre, sollte eine PCR-Strategie entworfen werden.

Ausgangspunkt war dabei die Suche nach einer geeigneten singulären Schnittstelle in Intron 10, daß das Ende des langen Arms von pCD22-ITIM-KO bildete. Aus der bis dahin bekannten Sequenz von CD22 ging Bpu1102I als Kandidat hervor. Die Schnittstelle war wie erhofft singulär in pCD22-ITIM-KO. Leider schnitt das Enzym aber mehrere Male 5' von Intron 10 im Vektor p1Eco, der das einzusetzende Stück DNA enthält.

Zur Erweiterung der Optionen wurde mit dem Primer CD22-3Sal ein Stück des Introns 10 sequenziert, und eine BclI-Schnittstelle in der richtigen Region gefunden. Da die Schnittstelle methylierungssensitiv ist, mußten pCD22-ITIM-KO und p1Eco für einen Test zunächst in einen Dcm-Methylase-negativen Bakterienstamm transformiert werden. Hier wurde *E.coli*JM110 verwendet. Im Testverdau von pCD22-ITIM-KO bestätigte sich die Schnittstelle als singulär. p1Eco wurde durch das Enzym in ein 3 kb und ein 9 kb Fragment geteilt.

Zur gleichen Zeit wurde, um mehr Sequenzinformation zu gewinnen eine ausführliche Datenbankrecherche im Internet durchgeführt. Zur Zeit des Beginns des Projekts in Freiburg durch Elke Martinez stand solch eine Information noch nicht zur Verfügung. Es bestand aber die Möglichkeit, daß sich dieser Umstand aufgrund der zahlreichen Sequenzierprojekte geändert haben mochte. Eine BLAST-Suche mit einem 81 nt Abschnitt von Intron 10 in der High-Troughput Genome Sequence (HTGS) Datenbank des NCBI resultierte in zwei noch unbearbeiteten Sequenzdateien mit 21 bzw. 34 ungeordneten ununterbrochenen Sequenzabschnitten (AC087143.1 und AC079472.1). Einer der ununterbrochenen Sequenzabschnitte der Datei AC087143.1 enthielt fast die vollständige CD22 Sequenz (von Exon 3 bis Exon 15). Anhand dieser Sequenz wurde eine Klonierungsstrategie für den verlängerten pCD22-ITIM-KO Vektor entwickelt.

Aus genomischer DNA von E14Tg2a wurde mit den Primern CD22YFext3`1 und CD22YFext5`2 ein 5 kb Produkt amplifiziert. Dazu wurde das Expand High Fidelity System von Roche, eine Polymerase mit proof-reading-Aktivität speziell für die Amplifikation langer Produkte verwendet. Das Produkt wurde mit BamHI und BclI geschnitten, und mit BclI-verdaulichem pCD22-ITIM-KO ligiert. Klone wurden mit einem PCR-Screening mit den Primern CD22in10-3 und CD22YFext3`1 auf vorhandenes Insert und richtige Orientierung geprüft. 3 Klone wurden ausgewählt (YFext9, YFext12, und YFext17), DNA dieser Klone wurde präpariert, und die erfolgreiche Klonierung wurde mit Testverdauen bestätigt. Die Exons 8, 9, und 10 dieser Klone wurden sequenziert. Dafür wurden zunächst PCR-Produkte von jedem Klon mit den Primern CD22ex8seq und CD22ex9seq bzw. CD22ex8seq und CD22ex10seq amplifiziert. Die Sequenzierung folgte dann mit den Primern CD22ex8seq, CD22ex9seq bzw. CD22ex10seq. Der Klon YFext17 enthielt eine Mutation in einem Exon, die Klone YFext9 und YFext12 waren korrekt. Die Introns wurden soweit in der Sequenzierung lesbar untereinander verglichen und stimmten überein.

Der entstandene Vektor erhielt die Bezeichnung pCD22-ITIM-KO-ext. Nach Linearisierung mit SpeI am langen Arm und PvuI am kurzen Arm ist der lange Arm 5,3 kb lang, im Gegensatz zum Vorläufervektor mit 2,27 kb. Die Verlängerung besteht aus DNA aus einem 129 Mausstamm. Beides sollte die Wahrscheinlichkeit der homologen Rekombination in einer 129 ES-Zelllinie stark erhöhen. Bei Linearisierung wie eben beschrieben bleiben am langen Arm keine Plasmidsequenzen, und am kurzen Arm die gleichen Sequenzen zurück wie nach Linearisierung des Ursprungsvektors pCD22-ITIM-KO mit PvuI.

Eine Transfektion mit pCD22-ITIM-KO-ext wurde im Labor von Dr. Burkhard Kneitz in der Zelllinie WW6 durchgeführt (Ioffe et al. 1995). Das geschah, weil zu diesem Zeitpunkt nicht genau klar war, ob die schlechten Injektionsergebnisse auf die Zelllinie, oder auf die Kulturbedingungen in unserem Labor zurückzuführen waren. Sämtliche ES-Zell Arbeiten sollten deshalb in einem anderen Labor unter den dortigen Bedingungen durchgeführt

werden. Die Zelllinie WW6 hat einen gemischten Hintergrund mit ca. 75% 129/Sv, 20% C57BL/6, und 5% SLJ. Aus einer Transfektion von pCD22-ITIM-KO-ext Vektors in der Zelllinie WW6 konnten ebenfalls keine homologen Rekombinanten gewonnen werden.

Vor weiteren Versuchen in 129 ES-Zelllinien wurde der Vektor pCD22-YFext ein weiteres Mal umgebaut. Durch die Cre-Deletion in vitro gingen bisher alle Klone bis zur Injektion durch zwei Elektroporationen und durch zwei Selektionen. Die Zeit in Kultur und die Belastung durch die Transfektionen und Selektionen sollte verringert werden. Abweichend von der ursprünglichen Strategie wurde deshalb nach einem Weg gesucht, das HSV-tk-Gen aus dem fertigen Vektor zu entfernen. Damit sollte erreicht werden, daß die Blastozysteninjektion der Klone sofort nach homologer Rekombination stattfinden kann, da die Gefahr von Infertilität der männlichen Chimären durch Expression der HSV-tk dann nicht mehr gegeben ist. Die Deletion der neo-Kassette sollte dann in vivo durch Cre-Deleter Mäuse stattfinden.

Durch die nun vorhandene vollständige Sequenz war der Weg für eine Entfernung des HSV-tk Gens offen. Über die Schnittstellen BsiWI und BspEI wurde der größte Teil des Gens entfernt. Mittels Klenow-Polymerase wurden die überhängenden Enden aufgefüllt, und dann ligiert. Der entstehende Vektor erhielt die Bezeichnung pCD22-ITIM-KO-ext-tk. Abb. 17 zeigt den Ursprungsvektor pCD22-ITIM-KO und den umgebauten Vektor im Vergleich.

Eine erste Transfektion in E14Tg2a brachte bei 960 getesteten Klonen keine homolog rekombinanten Klone. An dieser Stelle wurde die Arbeit aus Zeitgründen nach 4 Jahren nicht mehr weitergeführt. Einen Überblick über sämtliche Transfektionsexperimente und Blastozysteninjektionen geben die Tabellen 1 und 2.

3.1.19 Ein Ausblick

Es ergeben sich mehrere mögliche Wege, das Projekt der Herstellung einer CD22-ITIM-KO Mauslinie fortzuführen. Die Verfügbarkeit der gesamten genomischen Sequenz des CD22 Gens eröffnet eine Reihe von Optionen zum Umbau der bestehenden Targeting-Vektoren. Die Deletion des HSV-tk-Gens ermöglicht die Injektion von Zellen homolog rekombinanter Klone ohne vorherige in vitro Cre-Deletion. Da große Teile der genomischen Sequenz von CD22 (C57BL/6) zur Verfügung stehen, könnte auch pCD22-ITIM-KO mit einem PCR-unabhängigen Protokoll erweitert werden. Der entstehende Vektor könnte zur Transfektion von C57BL/6-III oder anderer BL/6 ES-Zelllinien verwendet werden. Unter den optimierten Kulturbedingungen wäre ein solches Vorgehen unter Umständen lohnend. Alternativ dazu könnte die Kenntnis der genomischen Sequenz von CD22 zur Klonierung eines Vektors genutzt werden, der auf 129/ola-DNA basiert, um mit diesem Vektor homologe Rekombinante in einer stabilen 129/ola ES-Zelllinie wie E14Tg2a zu erhalten. Eine weitere alternative Vorgehensweise bietet sich in Isolation von Subklonen charakterisierter, und bereits erfolglos injizierter C57BL/6-Rekombinanter. Da ES-Zell Populationen heterogen sind, ist es möglich, daß einzelne Klone ein höheres Potential zur Keimbahntransmission besitzen, als die Ausgangspopulation.

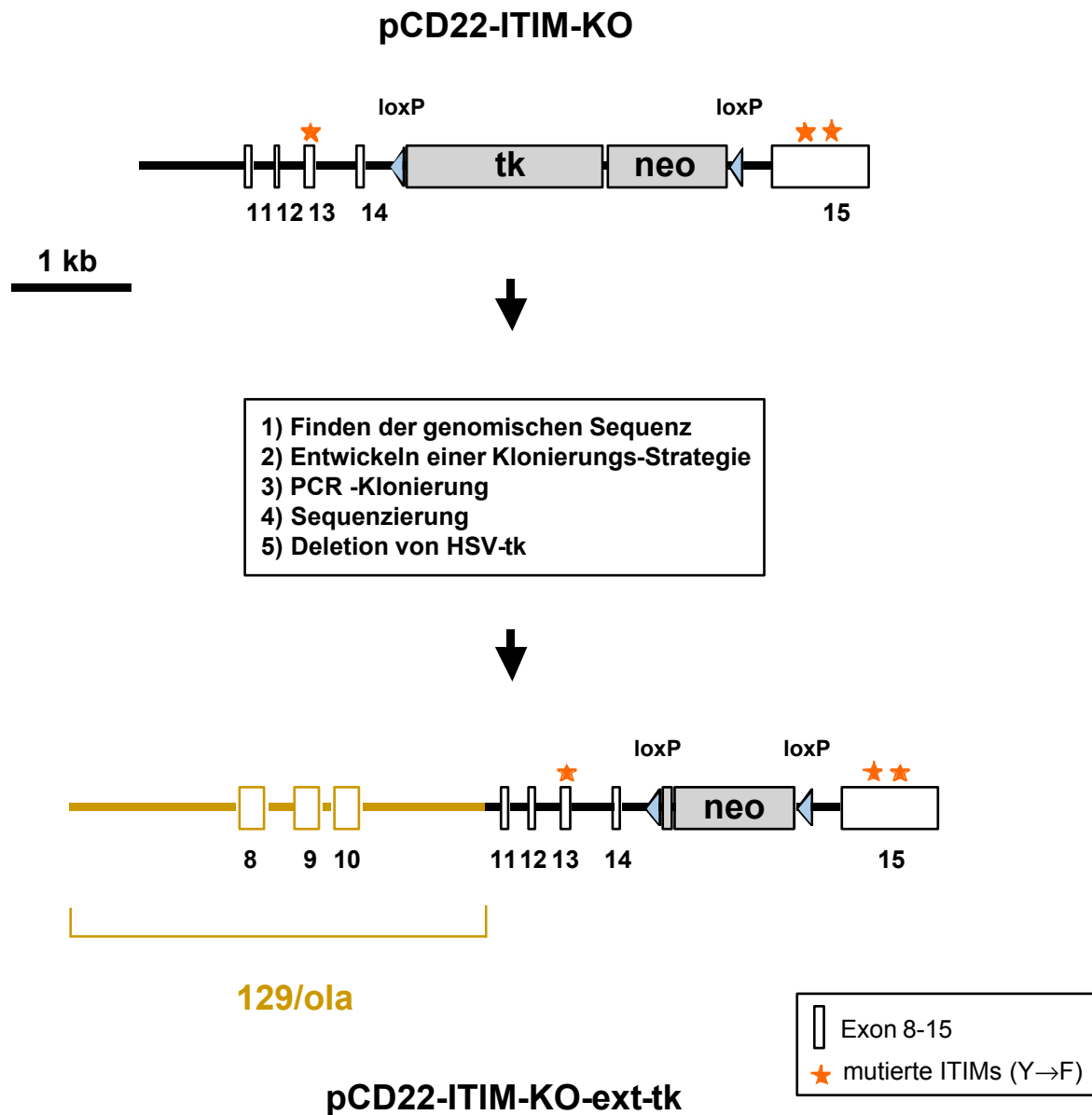


Abb. 17: Zur Erhöhung der Frequenz der homologen Rekombination des C57BL/6 Vektors pCD22-ITIM-KO in nicht-isogenen 129-ES-Zelllinien wurde der Vektor mit einem PCR-amplifizierten Stück E14Tg2a-DNA verlängert. Voraussetzung war das Finden einer fast vollständigen Sequenz von Maus-CD22 bei einer Datenbankrecherche. Mit der Zwischenstufe der beiden im Bild dargestellten Vektoren pCD22-ITIM-KO-ext (nicht dargestellt) wurde ein Targeting-Experiment in der ES-Zelllinie WW6 durchgeführt (s. Text).

Konstrukt	ES-Zelllinie	Anzahl gescreente Klone	PCR positive	PCR Wiederhlg.	Southern Blot	Bezeichn.
Tailless (03/99)	C57BL/6-III	300	8	-	4	M12 2.1, 2.3, 4.1, 4.2
ITIM-KO (11/99)	C57BL/6-III	500	5	3	3	YFtar3F1, 4E6, 10E3
Tailless (05/00)	C57BL/6-III	200	3	2	2	M12 8D1, 10D5
ITIM-KO (05/00)	C57BL/6-III	150	2	2	2	YFtar12B5, 12A4
ITIM KO (06/00)	C57BL/6-III	400	0	-	-	-
geänderte Kulturbedingungen: Neues Medium, PBS, Pen/Strep, Gln, β-ME						
ITIM-KO (08/00)	BALB/c-I	600	0	-	-	-
Wdhlg. nach PCR-Optim.		150	1	0	-	-
Tailless (08/00)	BALB/c-I	600	1	0	-	-
Wdhlg. nach PCR-Optim.		600	7	0	-	-
ITIM-KO (11/00)	C57BL/6-III	500	6	2	-	YFtar29D2, 30F1
Tailless (11/00)	C57BL/6-III	400	12	11	-	M12 15F5, 17B3, 17B7, 17C7, 18A3, 18B5, 19A1, 19F2, 21C4, 21E5, 21E6
ITIM-KO (02/01)	E14Tg2a	500	2	0	-	-
Tailless (07/01)	E14Tg2a	650	2	0	-	-
Umbau Targeting-Konstrukt pCD22-ITIM-KO \rightarrow pCD22-ITIM-KO-ext-tk, Verwendung ESGRO						
ITIM-KO (10/01)	WW6	400	0	-	-	-
ITIM-KO	E14Tg2a	960	0	-	-	-

Tab. 1: Überblick über sämtliche Gene-Targeting Experimente dieser Doktorarbeit und die dabei gewonnenen homolog rekombinierten Klone

Monat/Jahr	Klon	Passage	Injektor	Junge	Verpaarung
05/00	M12 2.3 M12 4.1	ca. P ₃₀ ca. P ₃₀	B. Ledermann	keine	-
06/00	YFtar3F1	ca. P ₂₁	B. Ledermann	keine	-
09/00	M12 10D5	ca. P ₁₇	B. Ledermann	keine	-
09/00	YFtar12B5	ca. P ₁₇	B. Ledermann	2 Chimäre	mit BL/6, keine Keimbahn- Transmissio n
12/00	YFtar3F1Cre C/B2	ca. P ₃₂	B. Kneitz	keine	-
	YFtar3F1Cre C/B4	ca. P ₃₂	B. Kneitz	8 Junge, 4 davon chimär	mit BL/6, keine Keimbahn- transmission
12/00	YFtar3F1Cre C/B2	ca. P ₃₂	B. Ledermann	keine	-
	YFtar3F1Cre C/B4	ca. P ₃₂		keine	-
01/01	YFtar3F1Cre C/B2, C/B4	ca. P ₃₄	B. Kneitz	2 tote, 6 tote	-
03/01	YFtar3F1Cre B1	ca. P ₃₂	B. Kneitz	5 Junge, 1 davon chimär	mit BL/6, keine Keimbahn- transmission
03/01	YFtar12B5 Cre S2F4, S2A5	ca. P ₂₆	B. Kneitz	7, 1 hoch- chimär (gestorben)	-
04/01	YFtar12B5 Cre S2C8, S1C8	ca. P ₂₆	B. Ledermann	keine	-
05/01	YFtar12B5 Cre S1F7, S2F7	ca. P ₂₇	B Kneitz	keine	-
07/01	YFtar12B5 Cre S1A1, S3A7, S3D8	ca. P ₂₇	B Kneitz	keine	-
08/01	YFtar12B5 CreS3B8	ca. P ₂₈	B. Kneitz	keine	-

Tab. 2: Überblick über alle während dieser Doktorarbeit durchgeführten Blastozysteninjektionen von homolog rekombinierten und vollständig charakterisierten ES-Zell-Klonen

3.2 Transfektionsexperimente mit einem CD22-ITIM-KO cDNA-Konstrukt in einer B-Zelllinie

Von der CD22-ITIM-KO Mauslinie wurde erwartet, daß die Phosphatase SHP-1 nicht mehr an CD22 binden kann. Da die Generierung neuer Mauslinien sehr arbeitsintensiv und langwierig ist, wurde angestrebt, die Funktionalität des CD22-ITIM-KO Targeting-Konstrukts noch vor oder während der Generierung der ITIM-KO Knockin-Maus durch Expression eines äquivalenten cDNA-Konstruktes in einer geeigneten Zelllinie zu testen. Dabei sollte zunächst Aufschluß über die korrekte Expression des CD22-Moleküls mit der veränderten cytoplasmatischen Domäne gewonnen werden. Zusätzlich sollte die Tyrosin-Phosphorylierung von CD22-ITIM-KO nach BCR-Stimulation untersucht werden. Außerdem sollte gezeigt werden, daß die Bindung von SHP-1 an CD22 in CD22-ITIM-KO nicht mehr funktioniert, und daher tatsächlich von den ITIMs abhängig ist.

Als Modellsystem wurde die Zelllinie J558L μ m3 gewählt, eine stabil mit einem B-Zell Rezeptor des IgM-Isotyps mit Spezifität für das NP (4-Hydroxy-3-Nitrophenyl)Acetyl)-Hapten transfizierte Variante der Zelllinie J558L (Wienands et al. 1996). J558L ist abgeleitet von einem Maus Plasmazell-Tumor (Myelom, Plasmozytom). Wie in anderen Plasmazytomen, so ist auch in J558L die Expression einer Reihe von B-Zell Oberflächenmarkern wie CD19, CD20, CD21, CD22, CD40 und CD45 abgeschaltet. Viele der für die intrazelluläre BCR-Signaltransduktion essentiellen proximalen Komponenten sind in J558L dagegen noch vorhanden, wie z.B. die Src-Kinase Lyn, Syk, Btk, das Adaptormolekül BLNK und andere. Stimulation oder Kreuzvernetzung des BCRs auf BCR-Transfektanten führt zu normaler Aktivierung von PTKs und zur Tyrosin-Phosphorylierung vieler dieser signaltransduzierenden Proteine (Kim et al. 1993).

J558L hat den Vorteil, daß kein endogenes CD22 vorhanden ist. Deshalb können Transfektanten mit veränderten Formen von CD22 erzeugt, und die Tyrosin-Phosphorylierung und SHP-1 Assoziation der CD22-Mutanten ohne störenden Hintergrund untersucht werden.

Noch wichtiger ist die Abwesenheit von endogenem CD22 für eine eventuelle Untersuchung des Einflusses von CD22-Mutanten auf die B-Zell Signaltransduktion. Da in J558L μ m3 nach BCR-Stimulation kein Ca²⁺-Signal erzeugt wird, muß bei einem funktionellen Test ein alternativer Parameter beobachtet werden. Ein weiteres mit den CD22-ITIM-KO Transfektanten geplantes Experiment war daher Untersuchung der Abhängigkeit des Effekts der ITIMs von CD22 auf die Phosphorylierung des für das BCR Ca²⁺-Signal wichtigen Adaptormoleküls BLNK. Versuche von Judith Gerlach in unserer Arbeitsgruppe in J558L deuteten vor Aufnahme der Experimente mit dem CD22-ITIM-KO Konstrukt darauf hin, daß BLNK in CD22 Transfektanten später und weniger effizient Tyrosin-phosphoryliert wird, als ohne CD22. Wichtige Voraussetzung für diesen Effekt schien die gleichzeitige Expression von α 2,6-Sialyltransferase und α 2,6-Sialinsäure auf der Zelloberfläche zu sein. Als Mechanismus wurde Bindung und Aktivierung der PTPase SHP-1 durch die phosphorylierten ITIMs von CD22 und daraus resultierende Dephosphorylierung von BLNK durch SHP-1 vermutet. In J558L μ m3 und in einer anderen B-Zelllinie war BLNK bereits als Substrat für SHP-1 identifiziert worden (Mizuno et al. 2000; Adachi et al. 2001).

Im Lauf der Transfektionen und der Charakterisierung der Transfektanten stellte sich jedoch heraus, daß die Änderung der BLNK-Phosphorylierung weder mit dem Vorhandensein von CD22 noch mit dessen Expressionslevel korreliert werden konnte. Bei den ursprünglichen Experimenten, die zu dieser Annahme geführt hatten, war offensichtlich mit einer Reihe von Klonen gearbeitet worden, die zufällig geringere BLNK-Phosphorylierung bei CD22 Expression ergaben. Trotz dieser Resultate wurde die BLNK Phosphorylierung nach BCR Stimulation bei mehreren CD22-ITIM-KO Klonen untersucht (s. unten).

3.2.1 Klonierung eines CD22-ITIM-KO Expressionsvektors für die B-Zelllinie J558L μ m3

Ausgehend von einem Expressionsvektor mit der cDNA für Wildtyp-CD22 aus C57BL/6, pcDNA3.1(+)*Zeo*CD22wt, wurde ein Expressionsvektor mit zerstörten ITIMs hergestellt. pcDNA3.1(+)*Zeo*CD22wt basiert auf dem Expressionsvektor pcDNA3.1(+)*Zeo* von Invitrogen (Karlsruhe). pcDNA3.1(+)*Zeo* hat einen hCMV-Promotor für ubiquitäre, starke Expression und ein Polyadenylierungssignal.

Die Mutationen in Exon 15 von CD22 wurden mit den Mutageneseprimern CD22-15mut1 bzw. CD22-15mut2 und den Primern Amp2 bzw. Amp1 wie unter 2.2.1.18 beschrieben eingeführt. Kolonien wurden mittels Kolonie-Screening und *Sall*-Verdau der PCR-Ansätze auf Vorhandensein der Mutation geprüft. Die *Sall* Schnittstelle wurde dabei durch das Mutagenese-Primerpaar generiert. DNA von 4 positiv getesteten Kolonien wurde präpariert, und der Abschnitt zwischen den singulären Schnittstellen *Bsu*36I und *Not*I sequenziert. Einer der Klone mit Mutation und ohne Amplifikationsfehler wurde ausgewählt und erhielt die Bezeichnung pcDNA3.1*Zeo*(+)*CD22-15mut*.

Zur Einführung der Mutation in Exon 13 wurde äquivalent mit den Primerpaaren CD22-13mut1/*Amp*2 bzw. CD22-13mut2/*Amp*1 verfahren. Die PCR-Produkte aus Kolonien nach Transformation wurden hier mit *Ssp*I getestet. Einer der korrekten Klone wurde ausgewählt und erhielt die Bezeichnung pcDNA3.1*Zeo*(+)*CD22-13mut*.

Ein 460 bp-*Bsu*36I/*Psy*I-Fragment aus pcDNA3.1*Zeo*(+)*CD22-13mut* und ein 250 bp-*Psy*I/*Not*I-Fragment aus pcDNA3.1*Zeo*(+)*CD22-15mut* wurden mit *Bsu*36I/*Not*I verdautem und dephosphoryliertem pcDNA3.1(+)*Zeo*CD22wt ligiert. Klone wurden wiederum mit PCR und Restriktionsverdau auf das Vorhandensein der richtigen Inserts geprüft. Zwei gleichwertige Klone wurden zur weiteren Untersuchung ausgewählt. Restriktionsverdau und Sequenzierung bestätigten die Korrektheit beider Klone. Der fertige Vektor erhielt die Bezeichnung pcDNA3.1(+)*Zeo*CD22-ITIM-KO.

3.2.2 Erzeugung stabiler Transfektanten

Zum Zeitpunkt der Transfektionen wurde es aus oben genannten Gründen als wichtig erachtet, Experimente zur Signaltransduktion in CD22/Sialyltransferase Doppeltransfektanten durchzuführen. 8ASia-Zellen (8ASia= stabile Sialyltransferase-Transfektanten von J558L μ m3) wurden mit pcDNA3.1(+)*Zeo*CD22-ITIM-KO-4 wie unter 2.2.6 transfiziert. Klone, die die Selektion mit Zeocin (CD22-ITIM-KO) und G418 (Sialyltransferase) überlebt hatten, wurden als einzelne Foci nach ca. 14 Tagen sichtbar. 50 Klone wurden isoliert, und im FACS auf Expression von IgM, CD22, und α 2,6-Sialinsäure geprüft.

Der Test im FACS zeigte, daß auch das veränderte CD22 mit zerstörten ITIMs auf der Oberfläche der J558L-Zellen exprimiert wurde, so daß davon ausgegangen werden konnte, daß dies auch bei einem CD22-ITIM-KO Mausmodells der Fall sein würde. Einzelne Klone wurden für weitere Experimente ausgewählt. In Abbildung 18 ist als Beispiel die Expression von CD22 und α 2,6-Sialinsäure der Klone J558L-CD22-ITIM-KO 4A1 und 6D4 in Histogrammen gezeigt.

3.2.3 Tyrosinphosphorylierung und SHP-1 Assoziation in CD22 ITIM KO

Zur Untersuchung des Einflusses der Zerstörung der ITIMs auf die Tyrosinphosphorylierung von CD22 und die Assoziation von SHP-1 im J558L μ m3-System wurden je zwei CD22-ITIM-KO/ Sialyltransferase (Klone 4A1 und 6D4) und zwei CD22wt/Sialyltransferase Doppeltransfektanten (Klone Ib.D4 und Vb.C3) mit laut FACS ähnlicher IgM, CD22, und Sialinsäureexpression mit NP-BSA stimuliert wie beschrieben (2.2.7). Nach 0 min bzw. 3 min

Stimulation wurde CD22 mit anti-CD22 Antiserum (Kaninchen anti-Maus) in Kombination mit Protein A-Sepharose präzipitiert, und nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf Nitrocellulosemembran transferiert. Auf der oberen Membranhälfte wurde Tyrosin-phosphoryliertes CD22 nachgewiesen (Abb. 18). Im Fall der durch Phenylalanine ersetzten Tyrosine in den ITIM-Motiven im cytoplasmatischen Anteil von CD22 war keine Tyrosin-Phosphorylierung von CD22 detektierbar.

Das völlige Fehlen jeglicher Tyrosinphosphorylierung könnte eventuell auf eine unter physiologischen Umständen bevorzugte Phosphorylierung der ITIM-Motive zurückzuführen sein. Welche der Tyrosine von CD22 jedoch in welchen physiologischen Situationen phosphoryliert werden, ist bislang nicht bekannt.

Es ist bekannt, daß die ITIM-Tyrosine (5 und 6) die Hauptbindungsstelle für die Src-Kinase Lyn bilden, die verantwortlich für den Großteil der Phosphorylierung von CD22 ist. Das Fehlen dieser Hauptanheftungsstellen für Lyn bietet ebenfalls eine Erklärung für die nicht beobachtbare Tyrosin-Phosphorylierung von CD22-ITIM-KO (s. ausführlicher Diskussion, Punkt 4.2).

Die erfolgreiche Immunpräzipitation von CD22 wurde in einer zweiten Anfärbung desselben Membranstückes überprüft. Die CD22-Expressionslevel der Klone 4A1 und Vb.C3 sind laut FACS-Färbung genau gleich. Das gleiche gilt für die Klone 6D4 und Ib.D4. Der Test zeigt, daß trotz gleicher Expression laut FACS-Färbung deutlich weniger CD22 von den CD22-ITIM-KO Transfektanten 4A1 und 6D4 präzipitiert wurde, als von den Wildtyp-Transfektanten Ib.D4 und Vb.C3. Da CD22 nicht nur an der Zelloberfläche, sondern auch im Zellinneren gefunden wird, ist es denkbar, daß sich trotz ähnlicher Expressionslevel von CD22wt und CD22-ITIM-KO auf der Oberfläche der Zellen die intrazelluläre Expression der Wildtyp-Form erheblich von der von CD22-ITIM-KO unterscheidet.

Es ist ebenfalls möglich, daß das Kaninchen Anti-CD22 Antiserum, das für die Immunpräzipitation verwendet wurde, das veränderte CD22-Molekül aufgrund von Konformationsänderungen in der cytoplasmatischen Domäne schlechter erkennt, als das Wildtyp-Molekül. Für die FACS-Anfärbung wurde dagegen ein monoklonaler Antikörper verwendet, bei dem ein solcher Effekt, da nur ein bestimmtes Epitop der extrazellulären Domäne erkannt wird, nicht auftreten würde. Der untere Membranteil wurde auf mit CD22 kopräzipitiertes SHP-1 getestet. Bei zerstörten ITIMs wurde kein SHP-1 mit CD22 kopräzipitiert. Dies steht in Übereinstimmung mit der nicht nachweisbaren Tyrosin-Phosphorylierung von CD22-ITIM-KO. Obwohl quantitativ weniger CD22 von den CD22-ITIM-KO-Klonen präzipitiert wurde, sollte SHP-1 im Falle von nennenswerter Assoziation trotzdem noch nachweisbar sein, was nicht der Fall ist.

Obwohl die Phosphorylierung von BLNK nach Stimulation mit NP-BSA in den Experimenten von Judith Gerlach mit CD22wt/Sialyltransferase Doppeltransfektanten nicht mit den Expressionsleveln von IgM, CD22wt, und α 2,6-Sialylinsäure korreliert werden konnten (s. 3.2), wurde ein äquivalentes Experiment mit CD22-ITIM-KO/Sialyltransferase Doppeltransfektanten durchgeführt. Auch hier konnte kein Zusammenhang zwischen der BLNK-Phosphorylierung und der Expression von CD22-ITIM-KO, IgM und Sialyltransferase gefunden werden (nicht gezeigt).

Zusammenfassend konnten aus dem hier verwendeten System wichtige Erkenntnisse gewonnen werden. Zunächst wurde gezeigt, daß auch das CD22 Molekül mit zerstörten ITIMs, und damit möglicherweise veränderter Feinstruktur der cytoplasmatischen Domäne, problemlos auf der Zelloberfläche exprimierbar ist. Dies ist ein wichtiger Test im Rahmen einer Fortführung der Generierung einer CD22-ITIM-KO Knockin-Mauslinie. Außerdem wurde in diesem System, wie in anderen vorher, gefunden, daß die ITIMs für die Bindung von SHP-1 verantwortlich sind. Deshalb ist auch die Funktionalität des Gene Targeting

Vektors pCD22-ITIM-KO hinsichtlich der unterbrochenen SHP-1 Bindung sehr wahrscheinlich.

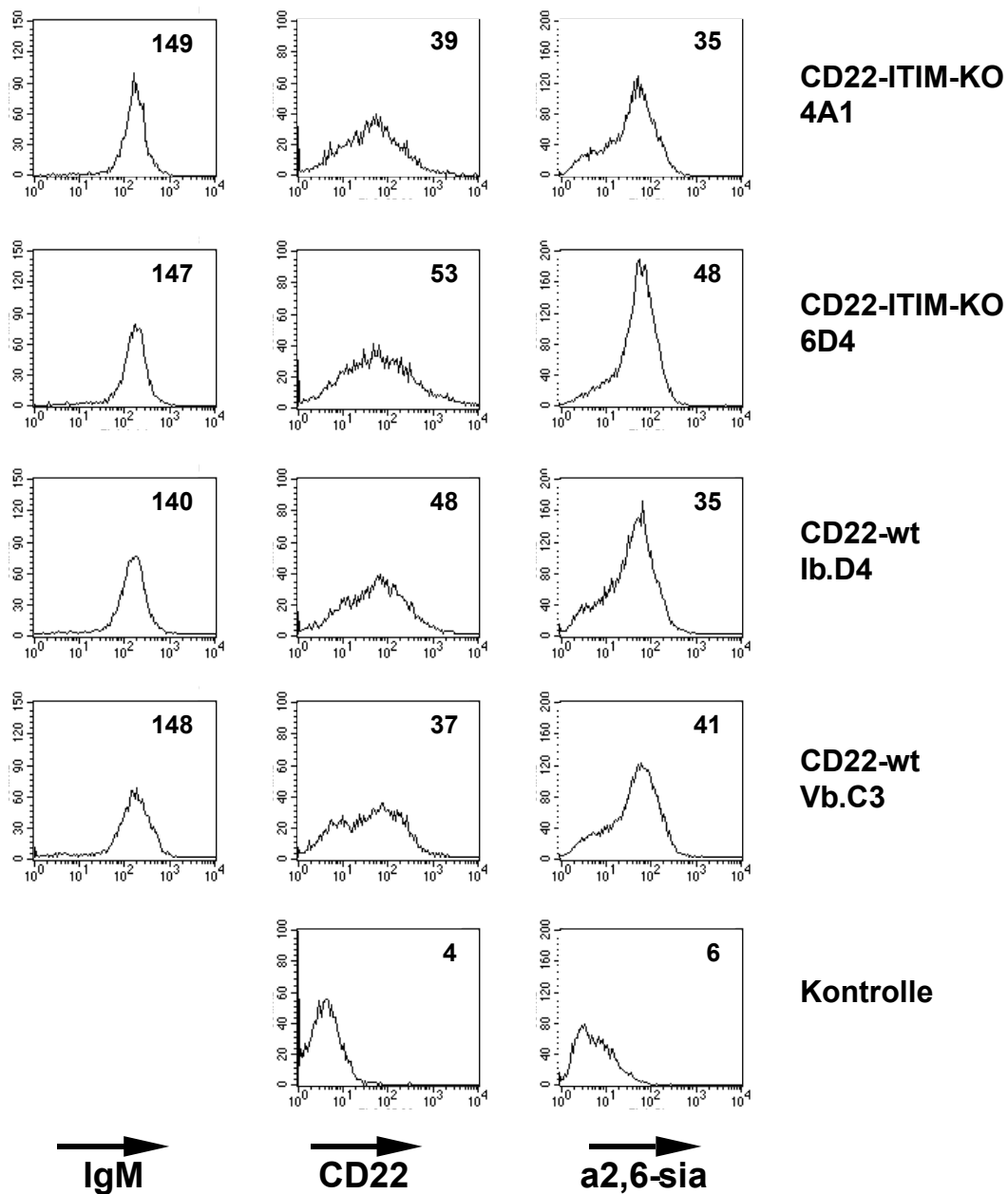


Abb. 18: Oberflächenexpression von CD22 und α2,6-Sialinsäure auf den für die Untersuchung der Tyrosinphosphorylierung und SHP-1 Assoziation von CD22 ausgewählten J558L-CD22-wt und J558L-CD22-ITIM-KO Klonen. Die Expression der Oberflächenmarker ist als Histogramm dargestellt, die MFI ist für jedes Histogramm angegeben.

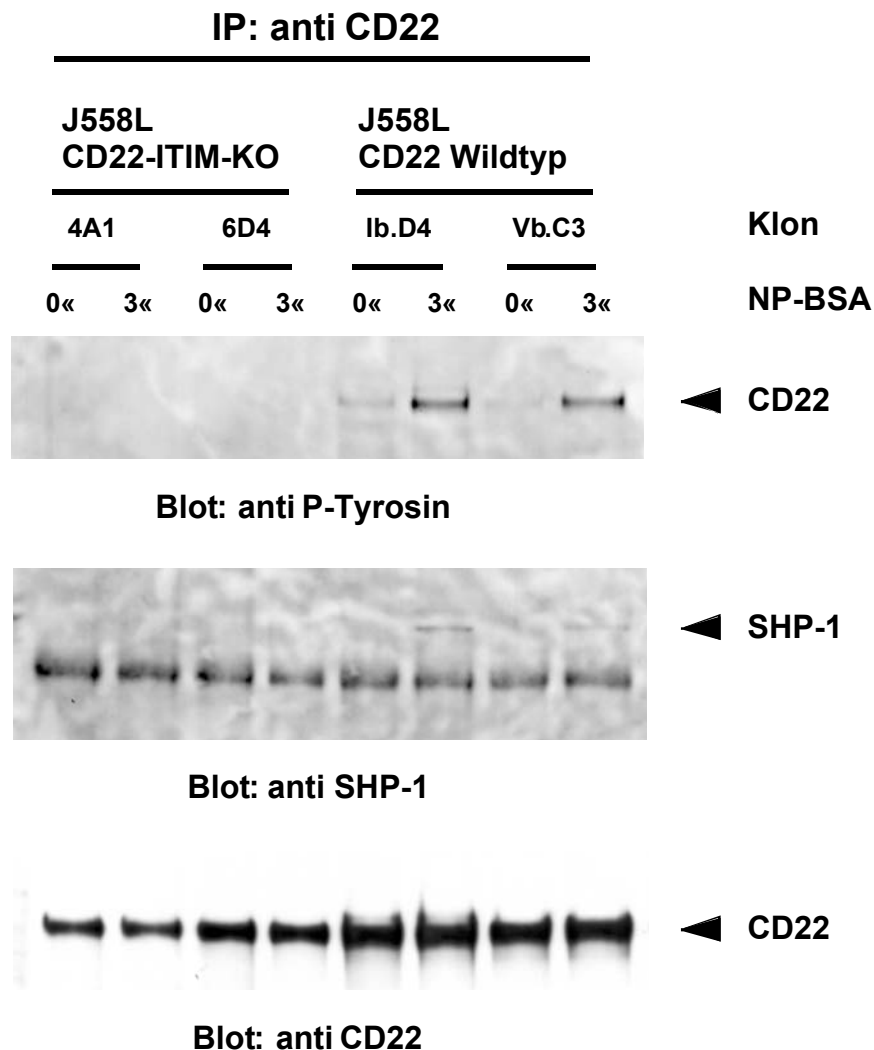


Abb. 19: Tyrosinphosphorylierung und SHP-1 Assoziation von CD22 nach BCR Stimulation. CD22-ITIM-KO bzw. CD22-wt transfizierte J558L Zellen wurden mit NP-BSA für die angegebenen Zeiträume stimuliert. Nach Immunpräzipitation von CD22 wurde die Tyrosinphosphorylierung, die Kopräzipitation von SHP-1, und die Effizienz der Immunpräzipitation im Western Blot untersucht. anti-P-Tyrosin: anti-Phosphotyrosin, NP: (4-Hydroxy-3-Nitrophenyl)Acetyl

3.3 Maskierung und Demaskierung von CD22

Ein weiteres Teilprojekt der hier vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit der Interaktion von CD22 mit seinem Liganden α 2,6-Sialinsäure in verschiedenen B-Zell Subpopulationen. Verschiedene Formen von Sialinsäure sind weitverbreitet auf Zelloberflächen und sezernierten Glykoproteinen. Durch ihre negative Ladung können sie z.B. über einen Abstoßungseffekt unspezifische Zell-Zell-Interaktion verhindern. Sialinsäuren werden jedoch auch spezifisch von Proteinen auf der Zelloberfläche, in Säugern von Mitgliedern der Siglec-Familie, erkannt (Kelm and Schauer 1997). CD22 ist ein Mitglied der Siglec-Familie, und kann mit seiner N-terminalen Ig-ähnlichen Domäne spezifisch mit α 2,6-Sialinsäure wechselwirken.

Die Identität des oder der Sialinsäure-tragenden Liganden von CD22 ist bis heute Gegenstand von Mutmaßungen. Ebenfalls nicht bekannt ist, ob sich mögliche Liganden auf denselben Zellen wie CD22, oder auf benachbarten Zellen befinden, oder ob beide

Möglichkeiten vorkommen. α 2,6-Sialinsäurereste tragende Proteine, und damit mögliche Liganden für CD22, findet man z.B. auf mit B Zellen interagierenden Zellen. So wurde CD45 auf T Zellen als Interaktionspartner vorgeschlagen. Ein anderes Beispiel ist die Wechselwirkung von CD22 mit Sialinsäure-tragenden Liganden auf Endothelzellen des Knochenmarks (Nitschke et al. 1999).

Auf der Oberfläche von B und T Zellen ist α 2,6-Sialinsäure sehr hoch exprimiert. Für humane B Zellen wurde gezeigt, daß die Liganden-Bindungsstelle von CD22 von endogener α 2,6sia maskiert ist (Razi and Varki 1998). Erst durch Entfernung der Sialinsäure von der Zelloberfläche durch Behandlung mit Sialidase wurde die Liganden-Bindungsstelle von CD22 für die Bindung einer speziellen Probe frei, die aus mehreren α 2,6-Sialinsäureresten gebunden an Polyacrylamid besteht (NeuAc-PAA). Für eine Detektion im FACS war die Probe zusätzlich biotinyliert. Mit der gleichen Probe wurde in einer fluoreszenzmikroskopischen Studie gezeigt, daß auch CD22 auf dem allergrößten Teil der peripheren B-Zellen von Mäusen maskiert ist (Floyd et al. 2000). Es wurden auch Zellen mit unmaskiertem CD22 gefunden, die jedoch nicht im FACS nachweisbar waren.

Es wurde kürzlich gezeigt, daß die Interaktion von CD22 mit endogener Sialinsäure wichtig für die inhibitorische Funktion von CD22 ist (Jin et al. 2002; Kelm et al. 2002). Maskierung und Demaskierung könnten deshalb eine wichtige regulatorische Funktion auf die Inhibition des BCR-Signals durch CD22 haben. Mögliche Liganden auf der selben Zelle sind der B-Zell Rezeptor, CD45, und auch CD22 selbst. Alle diese Moleküle stehen auch im Zusammenhang mit der BCR-Signaltransduktion. Maskierung könnte außerdem die Wechselwirkung von CD22 mit Liganden auf anderen Zellen („in trans“) regulieren, zum Beispiel mit Sialinsäure auf Cytokin-aktivierten Endothelzellen (Hanasaki et al. 1994). Für die Aufklärung der Funktion von CD22 ist es daher wichtig, herauszufinden, in welchen Situationen CD22 maskiert bzw. unmaskiert ist, bzw. ob Subpopulationen von B-Zellen mit unmaskiertem CD22 identifizierbar sind.

Um die Frage nach dem Maskierungszustand von CD22 auf unterschiedlichen B-Zell Populationen von Mäusen zu untersuchen, standen uns zwei Proben zur Verfügung. Beide trugen, im Gegensatz zu NeuAc-PAA, die N-Glykolyl-Form von α 2,6-Sialinsäure anstelle der N-Acetyl-Form. Für Untersuchungen mit B-Zellen von Mäusen ist das von großem Vorteil, da Maus-CD22 bevorzugt die N-Glykolyl-Form erkennt, während humanes CD22 die Acetyl- und die Glykolyl-Form gleich gut bindet (Kelm et al. 1994; van der Merwe et al. 1996; Brinkman-Van der Linden et al. 2000). Die ersten Experimente wurden mit einer Probe durchgeführt, bei der multiple Sialinsäurereste an biotinyliertes Polyacrylamid gekoppelt sind (NeuGc-PAA). Im späteren Verlauf der Arbeit kam noch eine weitere Probe zum Einsatz. Diese (NeuGc-SA) wurde uns freundlicherweise von J. Paulson (Scribbs Institut, La Jolla, USA) zur Verfügung gestellt, und basiert auf einem kommerziell erhältlichen Streptavidin/Alkalische-Phosphatase-Konjugat. Zwei Streptavidin Moleküle sind an ein Molekül alkalische Phosphatase gebunden. Daran gekoppelt werden biotinylierte Sialoside, im Durchschnitt 8 Sialoside pro Komplex. Für einfache durchflußcytometrische Detektion sind die oktavalenten Komplexe FITC markiert. Beide Proben sind, wie auch NeuAc-PAA, polyvalent, was wegen der schwachen Bindung von CD22 an α 2,6-Sialinsäure ($K_d \approx 0,3 \mu\text{M}$, (Powell et al. 1995)) wichtig ist. Abbildung 20 verdeutlicht die Bindung der beschriebenen Proben an Zellen mit unmaskiertem CD22.

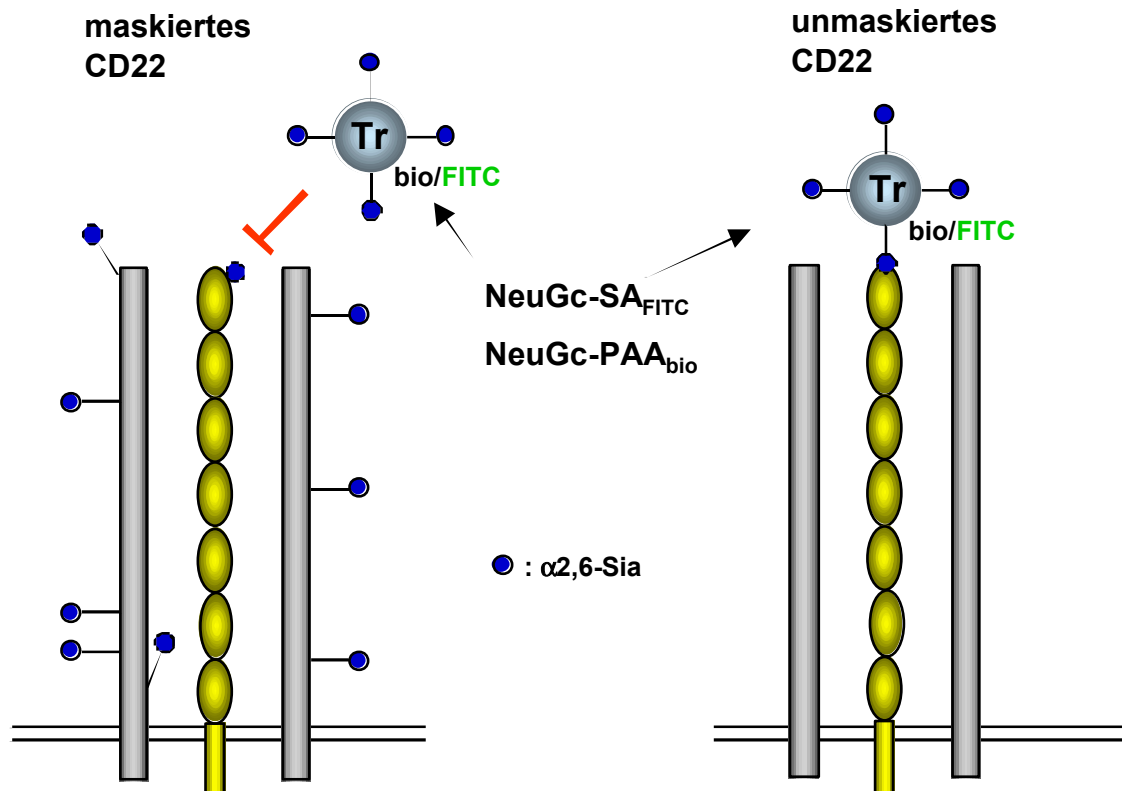


Abb. 20: Unmaskiertes CD22 kann von speziellen Proben gebunden werden. Ist die $\alpha 2,6$ -Sia-Bindungsstelle von CD22 von Sialinsäure auf Proteinen auf der selben Zelloberfläche besetzt (links), dann können NeuGc-SA bzw. NeuGc-PAA nicht an die jeweilige Zelle binden. CD22 ist „maskiert“. Ist CD22 unmaskiert (rechts), dann können beide Proben binden. Zur durchflußcytometrischen Detektion ist NeuGc-PAA biotinyliert, und NeuGc-SA mit FITC markiert. Tr: Trägerelement Polyacrylamid (PAA) oder Streptavidin₂-Alkalische Phosphatase (SA)

Beide Proben binden CD22 nur dann, wenn die Liganden-Bindungsstelle nicht durch endogene $\alpha 2,6$ sia maskiert ist. Die NeuGc-SA Probe erwies sich im Lauf unserer Experimente als sensitiver als NeuGc-PAA. Ein weiterer Vorteil lag im Vorhandensein einer Negativkontrolle (linker-SA). Diese ist genauso aufgebaut wie die Probe selbst, trägt aber keine $\alpha 2,6$ sia. Mit der Kontrolle konnte unspezifische Bindung des Linker-Streptavidin/Alkalische-Phosphatase-Gerüsts an Zellen überprüft und ausgeschlossen werden. Der Nachteil der neueren Probe war ihre relative Instabilität. Gute Resultate wurden erzielt, wenn ein Aliquot erst unmittelbar vor Beginn der Färbung aufgetaut und verdünnt wurde. Tests ergaben, daß eine Färbung mit NeuGc-SA bei einer Verdünnung von 1:100 die besten Resultate erbrachte.

3.3.1 CD22 auf Subpopulationen von B Zellen ist demaskiert

Zur Identifikation von Zellen mit maskiertem bzw. unmaskiertem CD22 wurden Milz-B-Zellen von CD22^{-/-} oder Wildtyp Mäusen jeweils mit der Probe NeuGc-SA (s. Abb. 21) bzw. NeuGc-PAA (nicht gezeigt) gefärbt. Die Färbungen zeigten, daß die meisten Zellen ohne Vorbehandlung nicht in der Lage sind, $\alpha 2,6$ -Sialinsäure zu binden. Dies ist in Übereinstimmung mit den Resultaten, die mit NeuGc-PAA früher für periphere B-Zellen aus Mensch und Maus gezeigt wurden (Razi and Varki 1998; Floyd et al. 2000). Alle B220⁺ Milzzellen der Wildtyp-Mäuse banden NeuGc-SA jedoch dann, wenn sämtliche Sialinsäure durch Sialidasebehandlung von der Oberfläche der Zellen entfernt waren. Daraus folgt, daß

die Zellen grundsätzlich die Fähigkeit besitzen, Sialinsäure zu binden, die Bindungsaktivität aber durch endogene Sialinsäure maskiert ist.

Im Gegensatz dazu banden nach Sialidasebehandlung nur 7,9% der B-Zellen aus CD22^{-/-}-Mäusen NeuGc-SA, die Hauptpopulation der B220⁺ Zellen jedoch nicht. Die Fähigkeit, α 2,6-Sialinsäure zu binden, war also zum allergrößten Teil von der Expression von CD22 abhängig. Färbung von Sialidase-behandelten Wildtyp- bzw. CD22^{-/-} B-Zellen mit der Kontrollverbindung Linker-SA zeigte, daß die Bindung von NeuGc-SA tatsächlich von α 2,6-Sialinsäure abhängig war, da weder Wildtyp noch CD22^{-/-} B-Zellen angefärbt wurden.

CD22 ist auf der Oberfläche der meisten B-Zellen maskiert, 10,5% der Milz-B-Zellen von Wildtyp-Mäusen waren aber in der Lage, NeuGc-SA zu binden. Nur 4,5% aller Milz-B-Zellen von CD22^{-/-} Mäusen banden dagegen NeuGc-SA, was zeigt, daß die Probenbindung tatsächlich zum größten Teil auf Demaskierung von CD22 zurückzuführen ist.

Äquivalente Experimente wie die eben beschriebenen, aber ohne eine der Probe Linker-SA entsprechende Kontrollverbindung, wurden auch mit NeuGc-PAA durchgeführt. 8,29% aller B220⁺ Zellen aus Wildtyp Mäusen banden NeuGc-PAA, im Gegensatz zu nur 3,4% aller B220⁺ Zellen aus CD22^{-/-} Mäusen, was die Ergebnisse mit der NeuGc-SA Probe bestätigt (nicht gezeigt).

Auch im Knochenmark wurde eine Population von B-Zellen mit demaskiertem CD22 identifiziert (s. Abb. 22). In der erwähnten fluoreszenzmikroskopischen Arbeit von Floyd et al. (Floyd et al. 2000) wurde gezeigt, daß eine Subpopulation von B-Zellen die demaskiertes CD22 trägt hauptsächlich aus IgD⁺-Zellen besteht, und daß diese Fraktion im Knochenmark gegenüber Milz 2-5 fach erhöht ist. In unseren FACS-Experimenten waren in der Milz nur ca. 40% aller B220⁺ Zellen mit demaskiertem CD22 auch IgD⁺ (nicht gezeigt). Der Anteil von IgD⁺ B-Zellen in der Milz mit unmaskiertem CD22 liegt demnach bei ca. 4% aller B-Zellen. Im Knochenmark fanden wir, daß ca. 16% aller rezirkulierenden, IgD⁺ B-Zellen demaskiertes CD22 tragen. Dies entspricht hier einer 4-fachen Anreicherung. Diese Ergebnis würde einem bestehenden Modell entsprechen, nach dem eine mögliche Funktion von CD22 die eines Rezeptors für die Lokalisation von rezirkulierenden B-Zellen ins Knochenmark ist (Nitschke et al. 1999; Floyd et al. 2000).

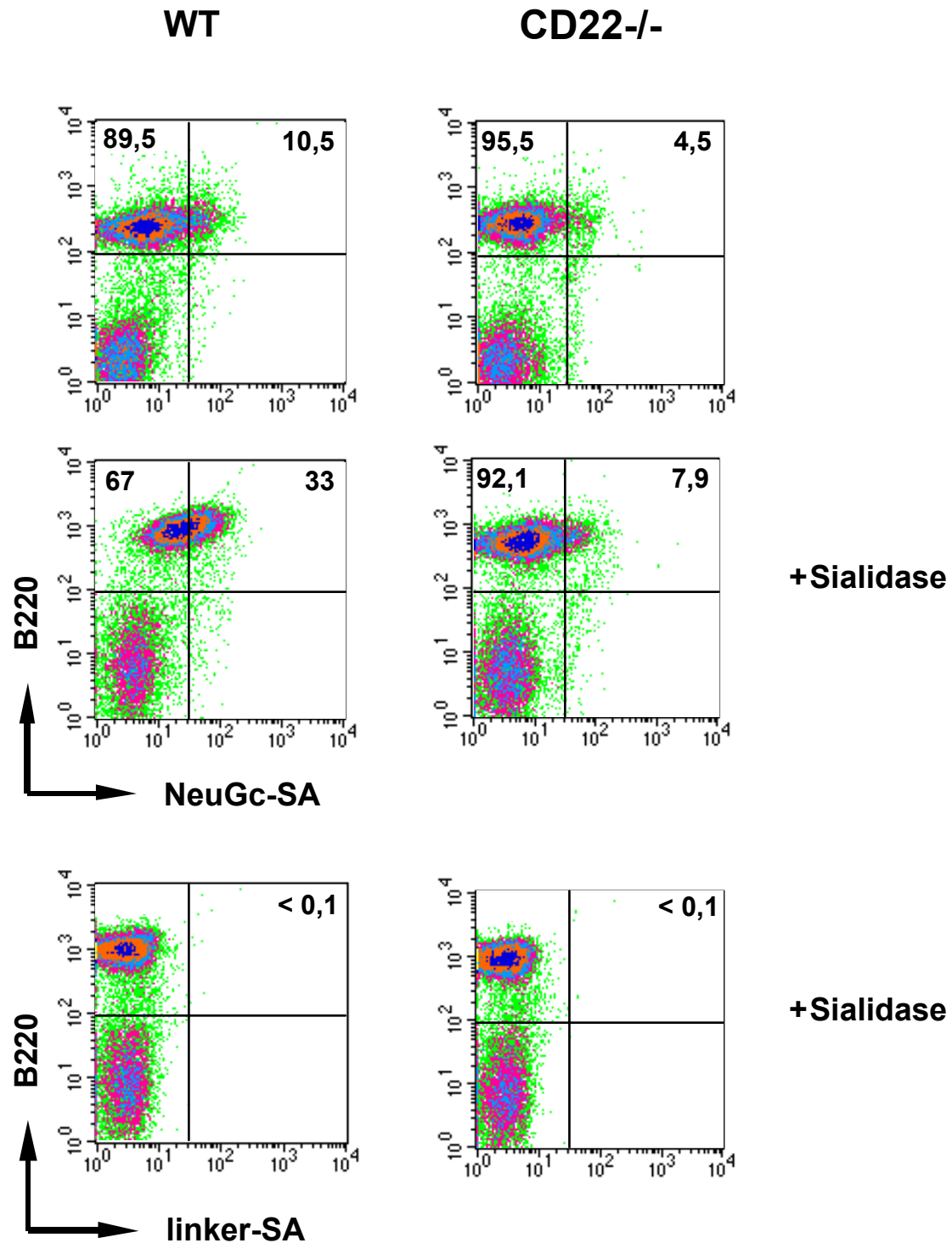


Abb. 21: Eine Subpopulation von Milz-B-Zellen aus Mäusen trägt demaskiertes CD22. Milzzellen von Wildtyp bzw. CD22^{-/-} Mäusen wurden zum Teil mit Sialidase behandelt, und dann mit antiB220 und NeuGc-SA bzw. linker-SA (Probenbeschreibung s. 3.3) gefärbt. 10,5% der B220⁺ Zellen aus Wildtyp B-Zellen, im Gegensatz zu nur 4,5% aus CD22^{-/-} Zellen banden NeuGc-SA (oben). Kontrollen mit Sialidase (Mitte) bzw. mit Sialidase und linker-SA (unten) zeigen, daß die NeuGc-SA Bindung zum größten Teil abhängig von CD22 und vollständig abhängig von α 2,6-Sialinsäure ist. Zahlen in den Quadranten: % B220 positive Zellen

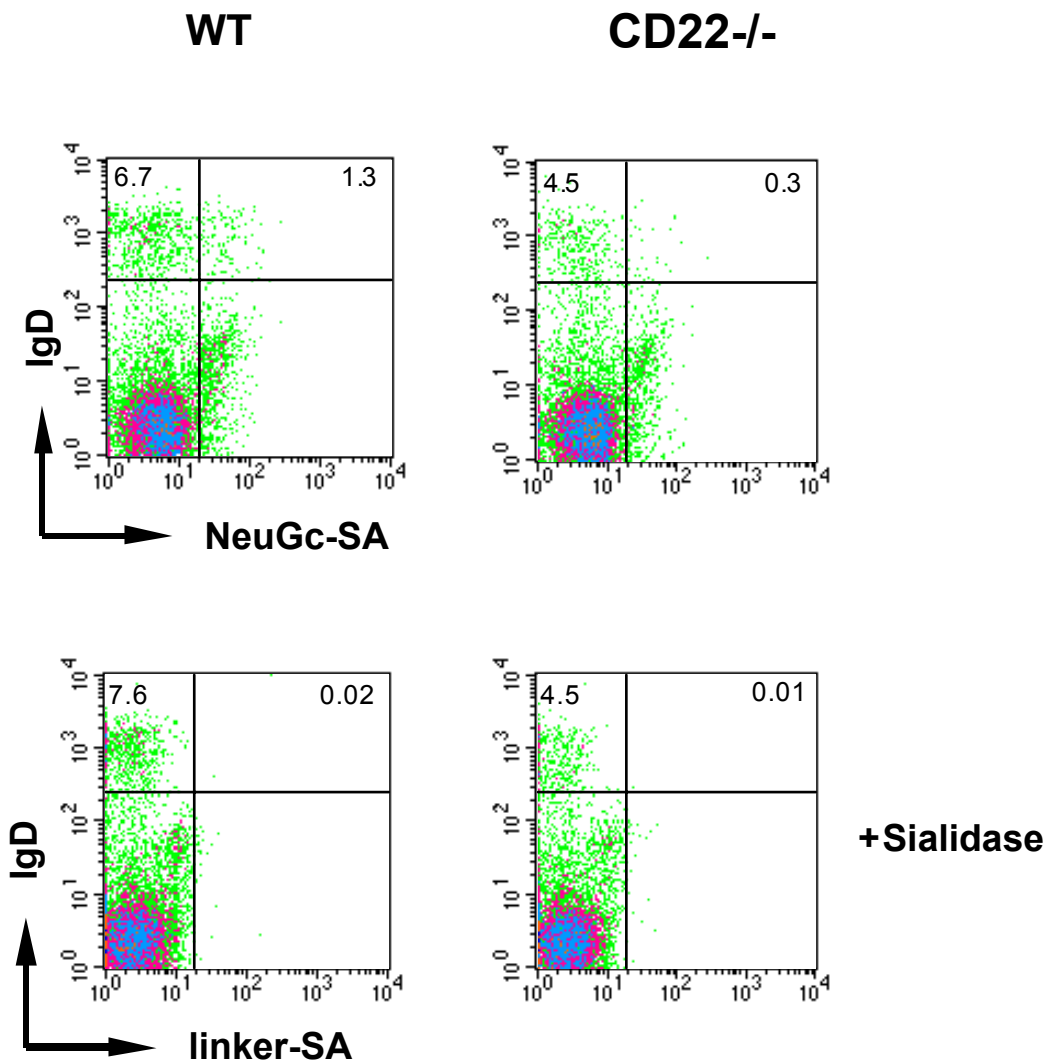


Abb. 22: Detektion von IgD⁺ B-Zellen mit unmaskiertem CD22 im Knochenmark von Mäusen. Knochenmark-Zellen von Wildtyp bzw. CD22^{-/-} Mäusen wurden mit Antikörpern gegen IgD und mit NeuGc-SA gefärbt. Zur Kontrolle wurden Zellen nach Sialidase-Vorbehandlung mit anti-IgD bzw. linker-SA gefärbt.

Zusammenfassend gelang es, erstmals im FACS eine Subpopulation von Maus-B-Zellen zu detektieren, die in der Lage sind, exogene α 2,6-Sialinsäure zu binden. Diese Bindung ist, wie der Vergleich von WT und CD22^{-/-} B-Zellen zeigt, zum größten Teil auf unmaskiertes CD22 zurückzuführen. Die Färbung mit NeuGc-SA erlaubte es, diese Population so gut abzugrenzen, daß eine weitere Charakterisierung und ein Vergleich mit bekannten B-Zell Subpopulationen möglich war.

3.3.2 Milz-B-Zellen mit demaskiertem CD22 sind im IgM^{hi}CD21^{hi}-Kompartiment angereichert

Mit der NeuGc-SA-Probe war es möglich, die B-Zell Population mit unmaskiertem CD22 im FACS näher zu charakterisieren (s. 3.3.1). Eine einfache Möglichkeit, verschiedene B-Zell-Subpopulationen der Milz im FACS voneinander zu unterscheiden, ist die Auftrennung verschiedener Entwicklungsstadien von B-Zellen in der Milz. Die Fähigkeit der verschiedenen B-Zell-Subpopulationen, NeuGc-SA zu binden, kann dann untersucht werden.

B-Zellen verlassen das Knochenmark als IgM^{hi}IgD⁺-Zellen, und schließen ihre Reifung in der Milz unter Durchschreiten voneinander abgrenzbarer Zwischenstufen ab. Aus IgM^{hi}IgD⁺-B-

Zellen (Transitionale B-Zellen Typ1, T1-B-Zellen) reifen Transitionale B-Zellen Typ2 (T2-B-Zellen). T2 B-Zellen sind die Vorläufer von reifen B-Zellen (engl.: mature B cells, M B-Zellen) (Loder et al. 1999). T1, T2, und M B-Zellen sind anhand einer Reihe von Oberflächenmarkern voneinander unterscheidbar. T1 B-Zellen sind $IgM^{hi}IgD^{lo}CD21^{lo}$, T2 B-Zellen sind $IgM^{hi}IgD^{hi}CD21^{hi}$, und reife B-Zellen sind $IgM^{lo}IgD^{hi}CD21^{int}$. Das ermöglicht es, diese verschiedenen Differenzierungsstadien in einer Färbung mit Antikörpern gegen CD21 und IgM darzustellen. Der Anteil der NeuGc-SA bindenden Zellen innerhalb der T1, T2 und M Subpopulationen wurde mit Dreifachanfärbungen untersucht (Abb. 23). Es konnte gezeigt werden, daß der Anteil an NeuGc-SA bindenden Zellen innerhalb der T2 B Zellen, verglichen mit dem in T1 und M B Zellen, erhöht ist. 30% aller T2 Zellen gegenüber jeweils ca. 10% T1 bzw. M B Zellen binden die Probe.

Neben den $IgM^{hi}IgD^{hi}CD21^{hi}$ T2 B-Zellen befinden sich im Fenster T2 auch noch die $IgM^{hi}IgD^{lo/-}CD21^{hi}$ MZ B-Zellen. Die MZ und die T2 B-Zellen sind unter anderem durch ihre unterschiedliche Expression von IgD und CD23 voneinander zu unterscheiden. Eine weitere Möglichkeit, T1, T2, und M B-Zellen voneinander zu unterscheiden, ist eine Färbung IgM gegen IgD. Die MZ B-Zellen tauchen dann im gleichen Fenster auf ($IgM^{hi}IgD^{lo}$) wie die T1 Zellen. Bei einer Darstellung IgM gegen IgD sind die NeuGc-SA bindenden Zellen wiederum im T2-Fenster am stärksten angereichert (Abb. 24). Dagegen binden mehr Zellen im T1-Fenster die Probe (ca. 16%). Es ist möglich, aber noch nicht klar, ob dies auf die MZ B-Zellen (und die B1 B-Zellen) zurückzuführen ist. MZ B-Zellen und B1 B-Zellen sind einander in Bezug auf einen preaktivierten Phänotyp, die schnelle Generation von Effektorzellen, die Funktion in der Immunantwort gegen thymusunabhängige Antigene, und das Antigen-Repertoire ähnlich. Es wäre deshalb möglich, daß beide Subpopulationen auch die Demaskierung von CD22 gemeinsam haben.

Welche B-Zell Subpopulation/en demaskiertes CD22 tragen, und ob diese einer oder mehreren der bisher definierten Populationen gleichen, werden zukünftige Experimenten aufklären. Ebenso folgen wird eine Analyse der Bindung von NeuGc-SA an B-Zellen aus Lymphknoten und aus der Peritonealhöhle.

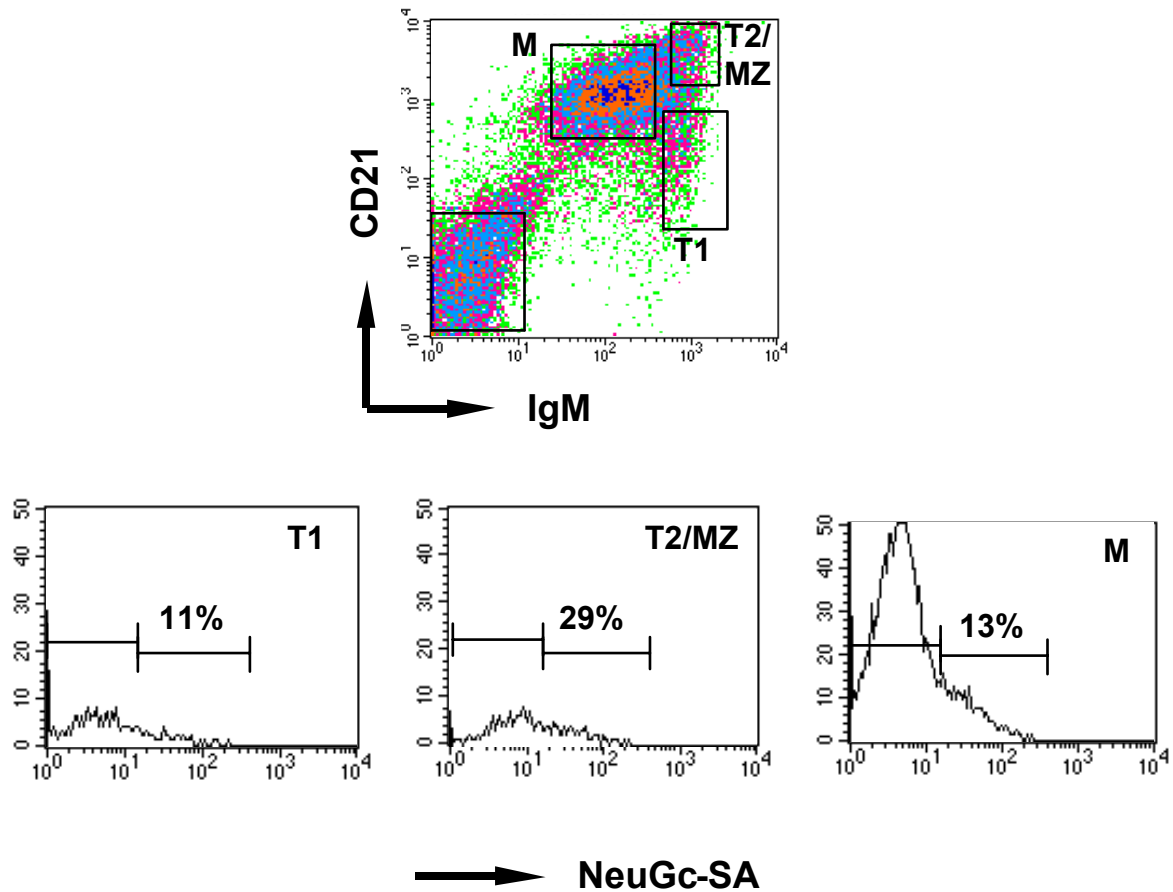


Abb. 23: Anreicherung von Zellen mit demaskiertem CD22 in der Fraktion der Transitionalen B-Zellen Typ2. Milzzellen von C57BL/6 Mäusen wurden mit Antikörpern gegen IgM, CD21, und mit der Probe NeuGc-SA gefärbt. Der Anteil der NeuGc-SA bindenden Zellen im T1, T2, bzw. M-Fenster ist in Histogrammen dargestellt. T1: Transitionale B-Zellen Typ1, T2: Transitionale B-Zellen Typ2, M: Reife B-Zellen, MZ: MZ-B-Zellen

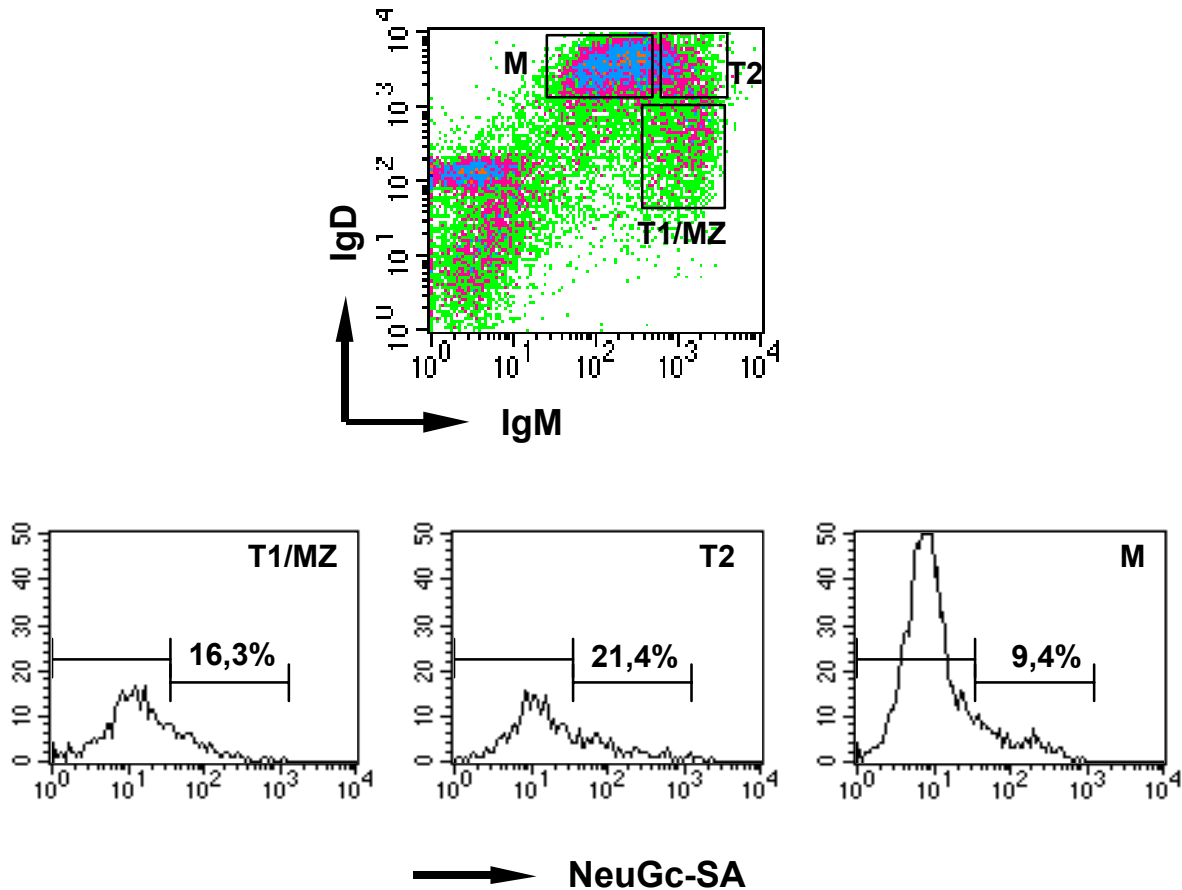


Abb. 24: Darstellung der Transitionalen B-Zellen (T1 und T2) und der reifen B-Zellen (M) mit einer Färbung IgM gegen IgD. Die relative Anreicherung der NeuGc-SA bindenden Zellen ist in Histogrammen dargestellt, und nicht so ausgeprägt wie in einer Darstellung CD21 gegen IgM (s. Abb. 23). T1: Transitionale B-Zellen Typ1, T2: Transitionale B-Zellen Typ2, M: Reife B-Zellen, MZ: MZ-B-Zellen

3.3.3 Milz-B-Zellen mit demaskiertem CD22 sind aktiviert

Um die B Zell Population mit unmaskiertem CD22 im FACS weiter zu analysieren, und für diese Population charakteristische Oberflächenmarker zu finden, wurden Dreifachanfärbungen mit B220 bzw. IgD bzw. IgM, NeuGc-SA, und jeweils einem dritten Antikörper durchgeführt. Anfärbungen mit B7.2/ B220/ NeuGc-SA, CD69/B220/NeuGc-SA und CD25/B220/NeuGc-SA zeigen, daß die B Zell Subpopulationen, die NeuGc-SA binden die Aktivierungsmarker B7.2, CD69 und CD25 verstärkt auf der Oberfläche exprimieren.

Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit der früher gemachten Entdeckung, daß Aktivierung von humanen peripheren mononukleären Blutzellen zu einer Demaskierung von CD22 führt (Razi and Varki 1998). Nicht festzustellen ist hierbei, ob die Demaskierung von CD22 der Aktivierung der B-Zellen folgt, oder vor/während der Aktivierung stattfindet. Zukünftige Experimente werden außerdem zeigen, ob Aktivierung und Demaskierung lediglich koinzident, oder auch kausal verknüpft sind.

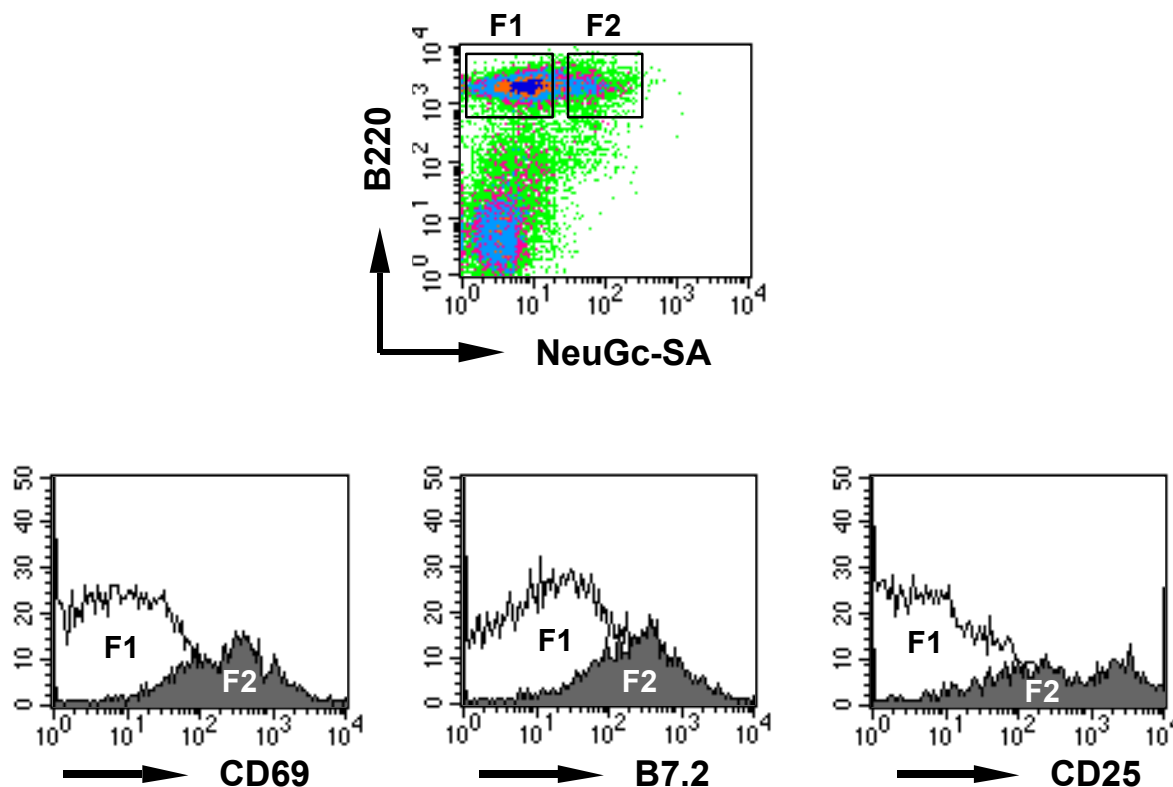


Abb. 25: Milz-B-Zellen mit demaskiertem CD22 sind aktiviert. Milzzellen von C57BL/6 Mäusen wurden präpariert und mit B220-PE, NeuGc-SA-FITC, und mit jeweils einem dritten (biotinylierten) Antikörper plus SA-Cyochrome gefärbt; die Färbung der B220⁺NeuGc-SA⁺ Zellen in Fenster 1 (F1) bzw. der B220⁺NeuGc-SA⁻ Zellen in Fenster 2 (F2) mit dem jeweils dritten Antikörper im Vergleich ist in Histogrammen dargestellt; gezeigt ist die Erhöhung der Aktivierungsmarker CD69, B7.2, und CD25 in der B220⁺NeuGc-SA⁺ Population

3.3.4 In vitro Aktivierung und Demaskierung

Die Analyse von Milz-B-Zellen aus Mäusen hatte ergeben, daß die Subpopulation mit demaskiertem CD22 aus aktivierten B-Zellen besteht. Wie erwähnt, hatte übereinstimmend damit eine frühere Veröffentlichung gezeigt, daß die Aktivierung humaner peripherer mononucleärer Blutzellen eine Demaskierung von CD22 zur Folge hat (Razi and Varki 1998). Wir hatten versucht, noch vor der Untersuchung der demaskierten Population (Abschnitt 3.3), den Maskierungszustand von CD22 auf Milzzellen von C57BL/6 bzw. CD22^{-/-} Mäusen durch in vitro Aktivierung mit verschiedenen polyklonalen Aktivatoren bzw. deren Kombinationen zu beeinflussen.

Milzzellen von CD22^{-/-} und C57BL/6 Mäusen wurden mit anti-IgM, IL4, anti-CD40, LPS, oder mit Kombinationen von diesen für 48 oder 72 h in vitro stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit NeuGc-PAA in Kombination mit Antikörpern gefärbt und im FACS analysiert. Zusätzlich zur Demaskierung von CD22 wurde die Aktivierung der Zellen anhand der Expression von B7.2 bestätigt (nicht gezeigt). α 2,6-Sialinsäure auf der Oberfläche der Zellen wurde durch Färbung mit CD22-Fc sichtbar gemacht. CD22-Fc ist ein Fusionsprotein bestehend aus den äußeren drei Ig-Domänen von Maus-CD22 und einem humanen Fc-Teil. Die Funktionalität der Probe und die Abhängigkeit der Färbung von CD22 wurde bei jedem Experiment durch Färbung sialidasebehandelter frischer Milzzellen kontrolliert (äquivalent der Abbildung 21).

Zur Auswertung der Experimente wurde die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) von NeuGc-PAA der B220⁺ Zellen als Maß für die Demaskierung von CD22 auf B-Zellen bestimmt. Das Ergebnis eines repräsentativen Experiments zeigt Abbildung 26. Durch Stimulation der Zellen mit IL4, anti IgM + anti CD40, LPS, anti IgM, anti CD40, wurde Fähigkeit, NeuGc-PAA zu binden erhöht. Die Stimuli, die dies am stärksten bewirkten waren anti CD40, anti IgM/anti CD40, und anti IgM/anti CD40/IL4. Bei Stimulation mit anti IgM/anti CD40 und mit anti CD40 wurde mehr α 2,6-Sia Bindung bei den Wildtyp, aber auch bei den CD22^{-/-} Zellen beobachtet. Die Bindung bei den Wildtyp-Zellen war gegenüber der der CD22^{-/-} Zellen nur leicht erhöht.

Es wird vermutet, daß andere Siglecs für die CD22 unabhängige Bindung von α 2,6-Sialinsäure verantwortlich sind. Maus-Siglecs sind bisher nur sehr unvollständig charakterisiert. Antikörper zur Untersuchung der Expression anderer Siglecs stehen noch nicht zur Verfügung. Die Expression anderer α 2,6-Sia bindender Siglecs könnte außerdem wie die Expression von CD22 durch unterschiedliche polyklonale Aktivatoren bzw. deren Kombinationen unterschiedlich reguliert werden. Der Anteil anderer Siglecs an den beobachteten Effekten kann deshalb im Augenblick noch nicht beurteilt werden (s. auch Diskussion 4.3.1).

Mit IL4 bzw. LPS dagegen war keine Erhöhung der α 2,6-Sia Bindung auf CD22^{-/-} Zellen in Folge der Stimulation zu beobachten. Der Demaskierungseffekt auf Wildtyp-Zellen war dagegen deutlich: Die MFIs bei IL4 und bei LPS Stimulation steigerten sich jeweils deutlich. Der Unterschied in der Demaskierung mit LPS in Abhängigkeit von CD22 war in allen durchgeführten Experimenten deutlich reproduzierbar. Der Demaskierungseffekt mit diesen beiden Stimulatoren war somit ausschließlich von CD22 abhängig.

Nach LPS-Stimulation war deutlich weniger α 2,6-Sia auf den Zelloberflächen von Wildtyp und von CD22^{-/-} B-Zellen. Die ursprüngliche Expression fiel nach in vitro Aktivierung auf jeweils ca. 30% des ursprünglichen Niveaus (s. Abb. 27). Die Verfügbarkeit von Liganden in cis ist damit massiv reduziert. Dadurch ergibt sich eine mögliche Erklärung für die Demaskierung von CD22. Bei Stimulation mit IL4 blieb die Höhe der Sialinsäureexpression gleich, so daß hier dieser Mechanismus für die Demaskierung nicht in Frage kommt. Die α 2,6-Sialinsäureexpression blieb nach Stimulation mit den anderen hier verwendeten Aktivatoren oder deren Kombinationen (anti-IgM/anti-CD40, anti-IgM, anti-CD40), wie auch nach Stimulation mit IL4 alleine, im wesentlichen unverändert (nicht gezeigt).

Bei einem Experiment wurden die T-Zellen durch Inkubation mit antiCD4 (RL174.1) und antiCD8 (3.168.1) Antikörpern mit nachfolgender Komplementlyse vor der in vitro Aktivierung entfernt. In diesem Experiment hatte keiner der Stimuli eine demaskierende Wirkung. Die Kontrollanfärbung von sialidasebehandelten frischen Zellen mit NeuGc-PAA funktionierte normal. Eine in vitro Aktivierung für sehr kurze Zeitintervalle, nämlich für 30 min bzw. 1,5 h zeigte keine Effekte auf die Demaskierung von CD22. Dieses Experiment war durchgeführt worden, weil in der Arbeit, in der ein Demaskierungseffekt auf CD22 auf humanen peripheren mononukleären Blutzellen infolge Stimulation erstmals beschrieben wurde, die Demaskierung nach kurzer Zeit am stärksten war (Razi and Varki 1998).

Insgesamt konnte gezeigt werden, daß CD22 durch in vitro Aktivierung von B-Zellen aus Milz mit LPS bzw. IL4 alleine demaskiert wird, und dadurch die Zellen in die Lage versetzt werden, α 2,6-Sialinsäure auf exogenen Liganden zu binden.

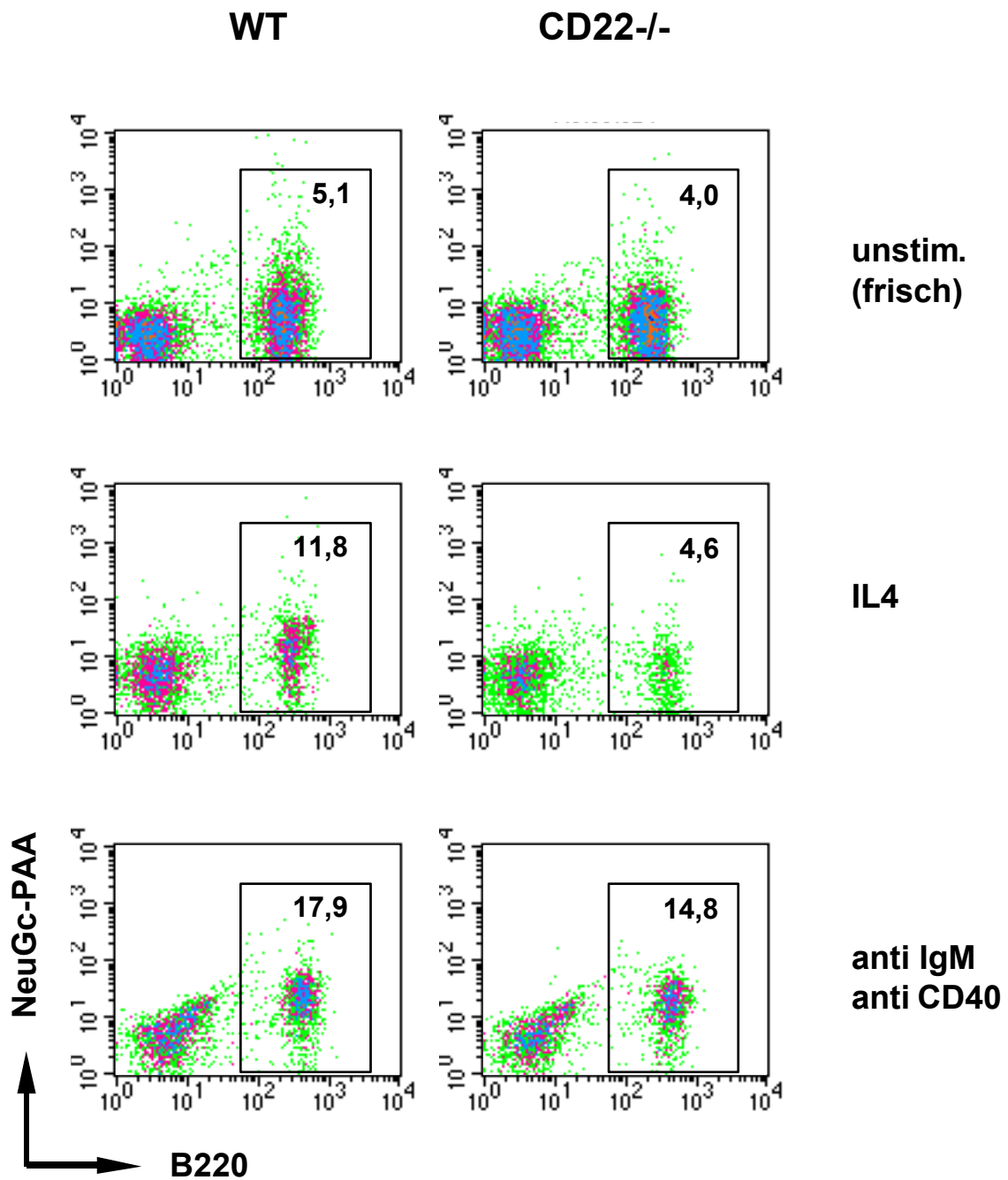


Abb. 26 a): Milzzellen von C57BL/6 (B6) bzw. CD22^{-/-} Mäusen wurden für 48 h in vitro mit IL4 (200 U/mL), Ziege anti-MausIgM (Fab')₂-Fragment (20 µg/µL), anti CD40 (10 µg/mL), LPS (30 µg/mL) bzw. mit Kombinationen dieser Stimuli behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit anti B220-FITC und mit NeuGc-PAA_{bio} + Streptavidin-PE gefärbt und im FACScan analysiert. Die Zahlen in den Fenstern geben die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) der Zellen für NeuGc-PAA im Fenster an.

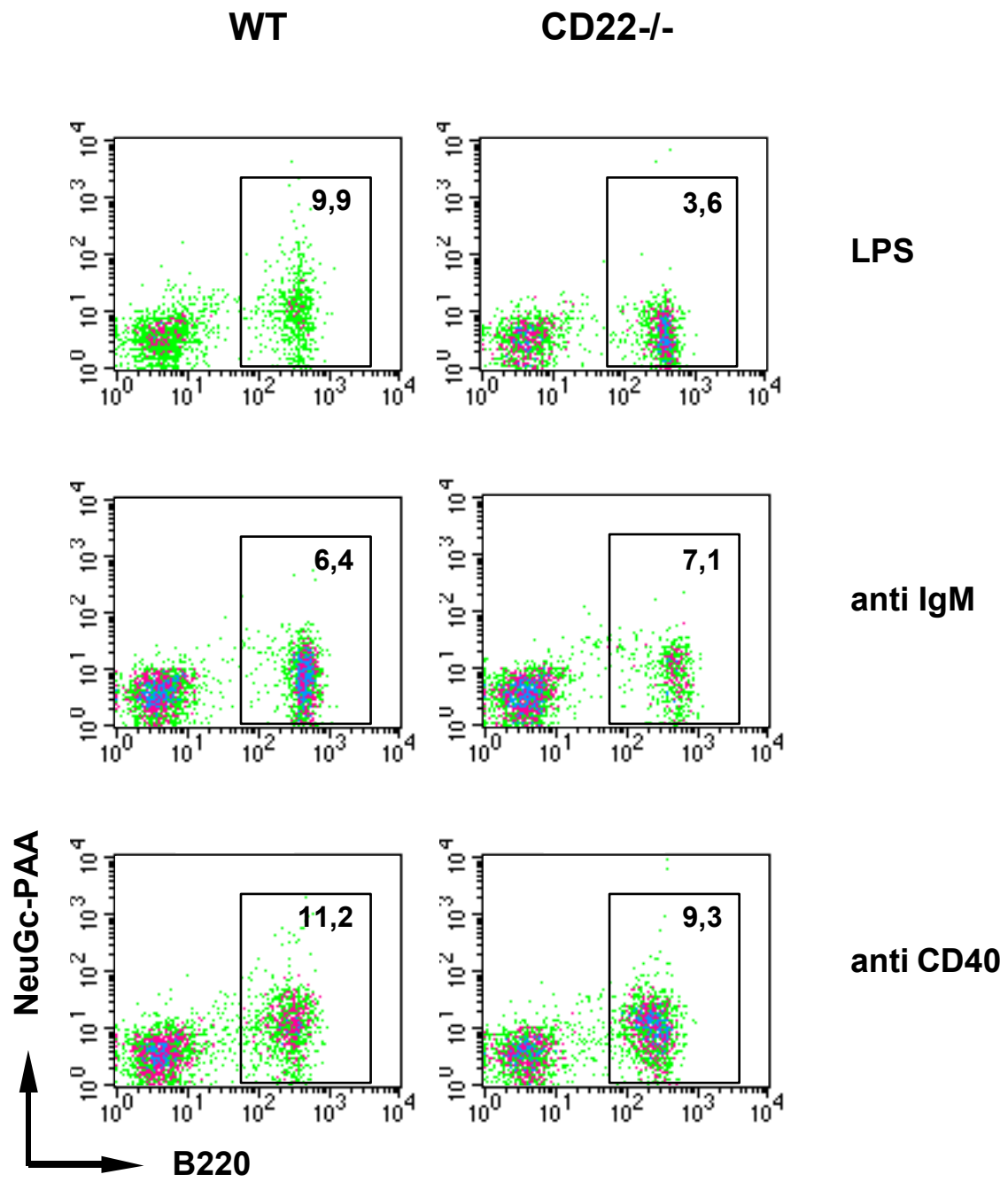


Abb 26 b): s. Legende Abb. 26 a)

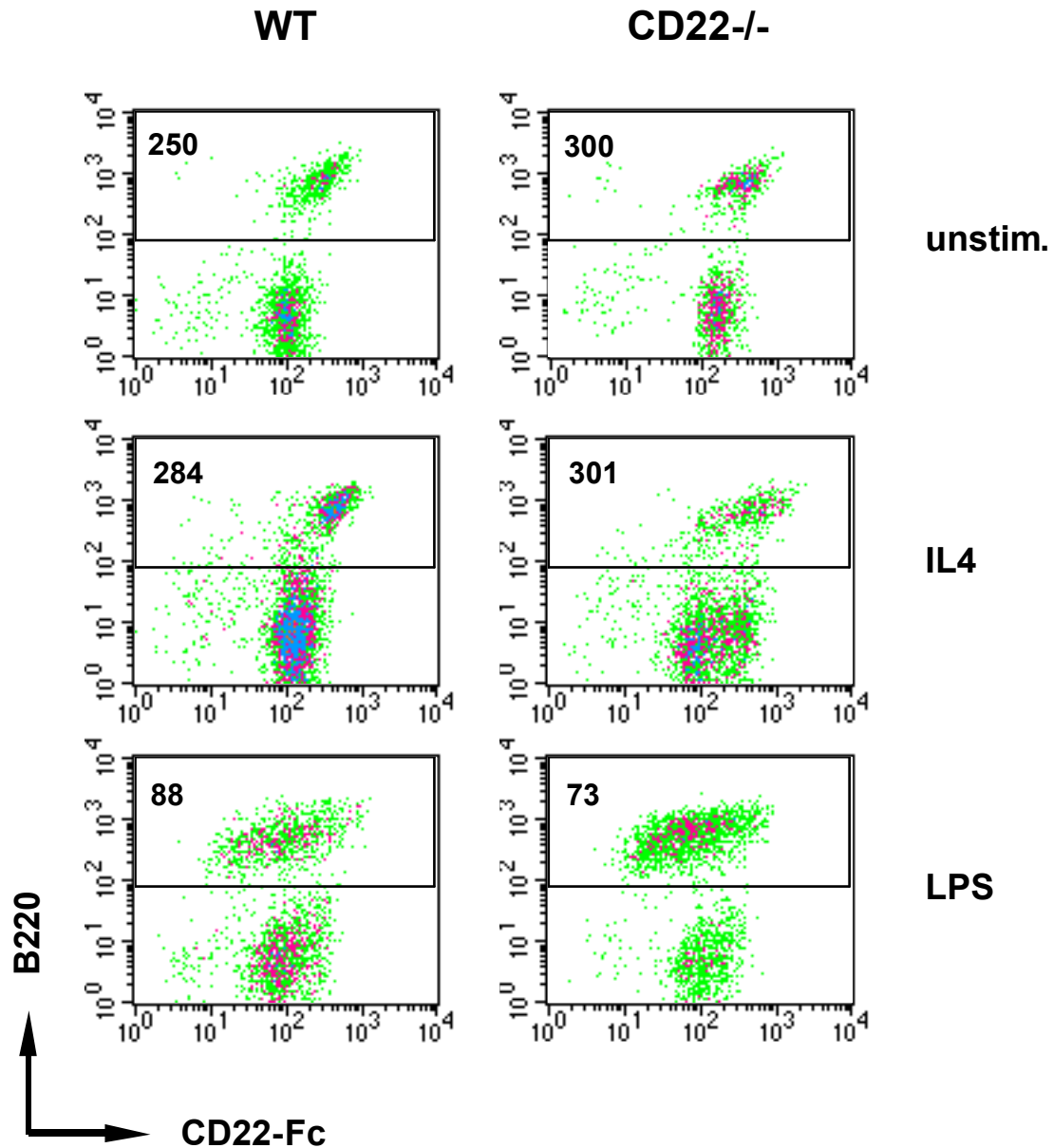


Abb. 27: Stimulation mit LPS, aber nicht mit IL4, führt zu geringerer Expression von α 2,6-Sialinsäure auf C57BL/6 und CD22^{-/-} Milz-B-Zellen. Milzzellen wurden für 48 h mit LPS oder IL4 stimuliert bzw. unstimuliert kultiviert. α 2,6-Sialinsäure auf der Oberfläche der Zellen wurde mit einem Fusionsprotein aus mCD22 und einem humanen Fc-Teil in Kombination mit anti-Mensch IgG-FITC gefärbt. Die MFI für CD22-Fc der B220⁺ Zellen sind im jeweiligen Plot angegeben. Die Stimulation mit anti-IgM/anti-CD40, anti-IgM, oder anti-CD40 führte weder bei Wildtyp-, noch bei CD22-defizienten B-Zellen zu wesentlichen Veränderungen der Expression von α 2,6-Sialinsäure auf der Oberfläche, und ist hier nicht dargestellt.

3.4 Marginalzonen B Zellen in CD22 defizienten Mäusen

3.4.1 Reduktion von Marginalzonen (MZ) B Zellen in CD22 defizienten Mäusen

Ein weiterer Teilaspekt dieser Doktorarbeit war die Untersuchung der Marginalzonen B-Zellen (MZ) der Milz in CD22^{-/-} Mäusen. Marginalzonen B Zellen sind eine distinkte Subpopulation von B Zellen, die ausschließlich in der Milz vorkommen. Sie befinden sich am äußeren Rand der PALS (Periarterioläre Lymphatische Scheide), jenseits des Marginalsinus (Übersichtsartikel s. (Martin and Kearney 2000)). MZ B-Zellen sind durch eine Reihe von Oberflächenmarkern von anderen B-Zell Subpopulationen zu unterscheiden. Reife B Zellen sind IgM^{lo}IgD^{hi}CD21^{int}CD23^{hi}CD1d^{neg}, MZ B Zellen dagegen IgM^{hi}IgD^{lo}CD21^{hi}CD23^{lo}CD1d^{hi}. MZ B-Zellen sind preaktiviert, und exprimieren bereits im Ruhezustand B7.2 und B7.1. Nach kurzer Stimulation (6-8 h) entwickeln sie sich zu potenten Antigen-präsentierenden Zellen, und nachfolgend in kurzer Zeit zu Plasmablasten (ca. 24 h) und reifen Plasmazellen (ca. 3 Tage) (Oliver et al. 1999). Zusammen mit den B1 B-Zellen des Peritoneums sind MZ B-Zellen die hauptsächlich für thymusunabhängige Immunantworten Typ-2 (T12 Immunantworten) verantwortliche Population [Lane, 1986 #90; Martin, 2000 #91]. Ihre Preaktivierung und ihre besondere anatomische Lokalisation prädestinieren MZ B-Zellen zu einer sehr schnellen Immunantwort gegen T12 Antigene, besonders gegen solche, die mit dem Blutstrom herangetragen werden. Diese treffen in der Milz nach ihrem Weg durch Zentral- und terminale Arteriole sofort auf die Marginalzone.

Einer der Faktoren, die die Entwicklung von MZ B-Zellen beeinflussen, ist die Stärke des BCR-Signals. Ein stärkeres Signal ist ungünstig für die Entwicklung von MZ B-Zellen (Cariappa et al. 2001; Kraus et al. 2001; Seo et al. 2001). Da in CD22^{-/-} Mäusen das BCR Ca²⁺-Signal wesentlich erhöht ist, bestand daher die Möglichkeit, daß sich dies in einem verkleinerten MZ B-Zell Kompartiment auswirkt. Ein weiterer Hinweis auf eine mögliche geringere Anzahl von MZ B-Zellen in CD22^{-/-} Mäusen ergab sich aus der Tatsache, daß bei normaler B1 B-Zell Entwicklung die T12-Antworten in CD22^{-/-} Mäusen reduziert sind. Dies könnte auf einer Verringerung der MZ B-Zellen beruhen. Das MZ B-Zell Kompartiment in CD22^{-/-} Mäusen sollte deshalb hinsichtlich Größe und Funktion beurteilt werden.

MZ B-Zellen können in einer Färbung von CD21 gegen CD23, oder in einer Färbung von B220 gegen CD1 dargestellt werden. Milzzellen aus Wildtyp bzw. CD22^{-/-} Mäusen wurden mit Antikörpern gegen CD21, CD23, und CD1d gefärbt. Die Färbungen ergaben (s. Abb. 28), daß das MZ B Zell Kompartiment in CD22^{-/-} Mäusen gegenüber Wildtyp tatsächlich um ca. 70%-80% reduziert sind.

Dieses Resultat wurde durch Ergebnisse der mit uns kooperierenden Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Wirth an der Universität Ulm gestützt. In Milzschnitten von CD22^{-/-} Mäusen waren fast keine B-Zellen in der Marginalzone zu erkennen (Samardzic et al. 2002)

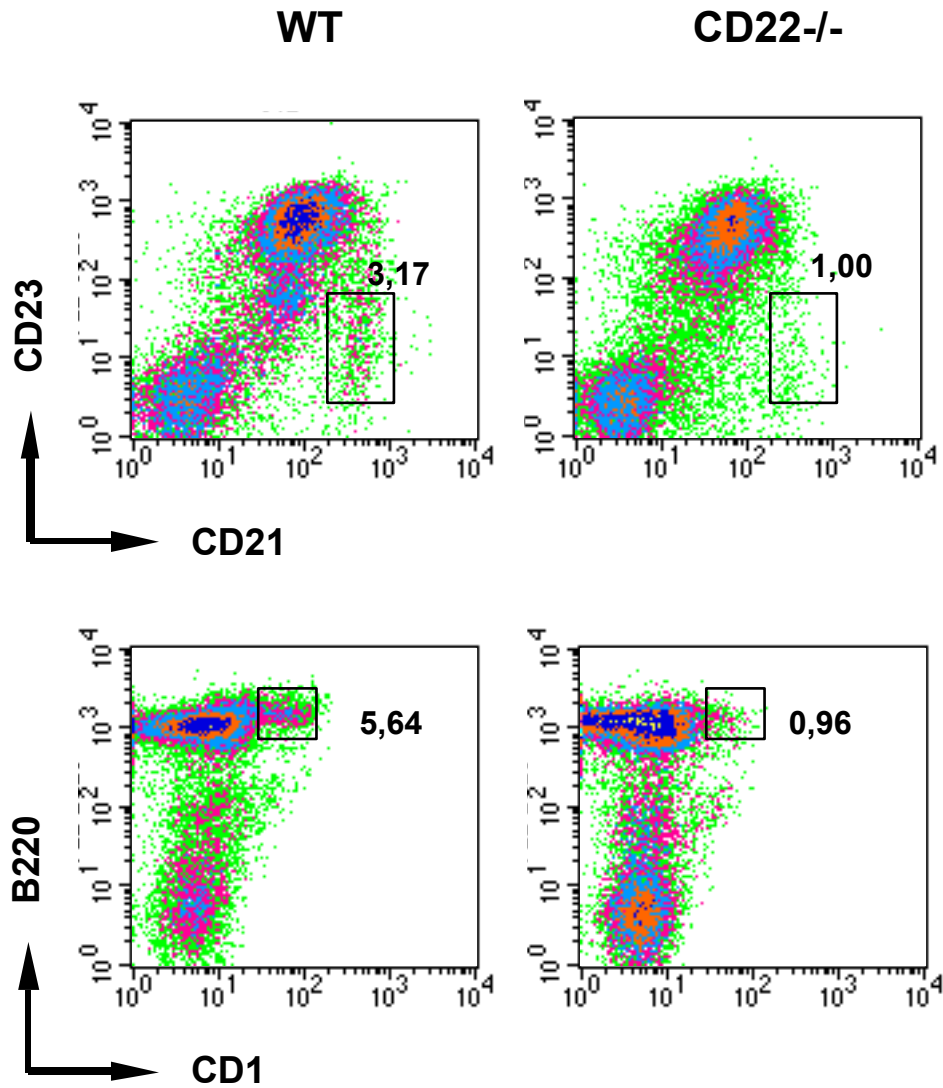
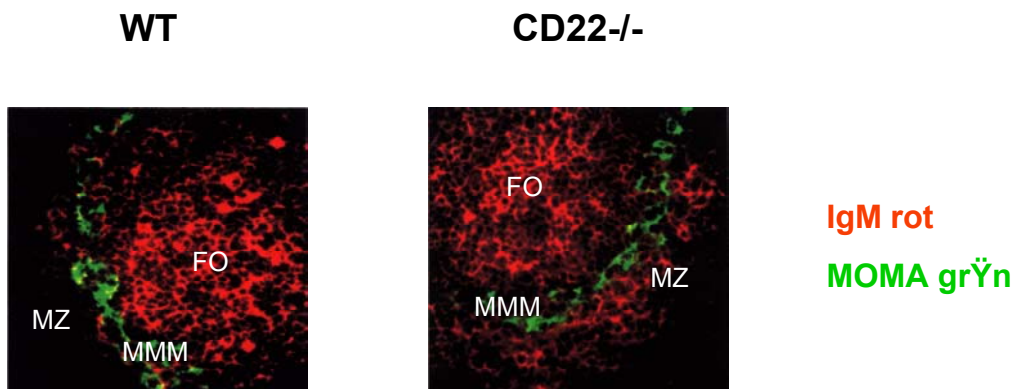


Abb. 28 MZ B-Zellen sind in CD22^{-/-} Mäusen um 70-80% reduziert. a): Milzzellen von Wildtyp bzw. CD22^{-/-} Mäusen wurden mit Antikörpern gegen CD21 und CD23, bzw. gegen CD1 und B220 gefärbt; die Marginalzonen B-Zellen (MZ B-Zellen, CD21^{hi}CD23^{lo} bzw. B220⁺CD1^{hi}) sind in den Fenstern dargestellt. b) Transversalschnitte der weißen Pulpa von Milzen von Wildtyp bzw. CD22^{-/-} Mäusen. MOMA ist ein charakteristischer Marker der Metallophilen Marginalzonen-Makrophagen, die die innere Grenze der Marginalzone markieren. FO: Follikel, MMM: Metallophile Marginalzonen-Makrophagen, MZ: Marginalzone (Samardzic et al. 2002)



(Tatjana Samardzic und Thomas Wirth, Universität Ulm)

3.4.2 Reduzierte Immunantwort gegen intravenös applizierte thymusunabhängige Antigene in CD22 defizienten Mäusen

Es sollte untersucht werden, ob die Verminderung von MZ B Zellen für die reduzierte Antwort gegen TI2-Antigene in CD22^{-/-} Mäusen verantwortlich sein könnte. In einer Veröffentlichung war kurz vor unseren Experimenten gezeigt worden, daß bei intraperitonealer Injektion eines TI2 Antigens hauptsächlich die B1 B-Zellen des Peritoneums, bei intravenöser Injektion jedoch bevorzugt die MZ B-Zellen der Milz für die frühe Immunantwort verantwortlich sind (Martin et al. 2001).

Um tendenziell bevorzugt B1 Zellen oder MZ B Zellen mit Antigen in Kontakt zu bringen injizierten wir Wildtyp bzw. CD22^{-/-} Mäusen das TI2 Antigen TNP (Trinitrophenyl)-Ficoll intraperitoneal (i.p.) bzw. intravenös (i.v).

Charakteristische Immunglobulin-Isotypen bei frühen Antworten gegen TI2 Antigene sind IgM und IgG3. IgG3 ist gegenüber IgM höher induzierbar. Zur Quantifizierung der Immunantwort wurde daher der Serumspiegel von IgG3 0, 5, bzw. 7 Tage nach Injektion per ELISA bestimmt (Abb. 29).

Wurde TNP-Ficoll intraperitoneal injiziert, war, wie auch früher schon gezeigt, die Immunantwort in CD22^{-/-} Mäusen zweifach gegenüber der in Wildtyp Mäusen reduziert (Otipoby et al. 1996; Nitschke et al. 1997). Wurde das Antigen dagegen in die Schwanzvene gespritzt, war die Immunantwort noch stärker eingeschränkt (3-4 fach). Da MZ B Zellen in der Abwehr mit dem Blutstrom herangetragenere Antigene eine wichtige Rolle spielen (Martin et al. 2001) könnte die verminderte TI2 Antwort in CD22^{-/-} Mäusen auf deren verkleinertes MZ B Zell Kompartiment zurückzuführen sein.

In der Gruppe von Thomas Wirth wurde außerdem gezeigt, daß TNP-Ficoll 30 min nach i.v.-Injektion deutlich in den Marginalzonen von Milzen von Wildtyp-Mäusen, jedoch nicht in denen von CD22^{-/-} Mäusen festgehalten wird. (s. Abb. 30).

Zusammenfassend wurde in diesem Teilprojekt eine deutliche Reduktion von MZ B-Zellen in CD22^{-/-} Mäusen im FACS gezeigt. Durch histologische Untersuchungen von Tatjana Samardzic und Thomas Wirth (Universität Ulm) wurde dieses Ergebnis gestützt. Wie schon früher gezeigt, wurde bestätigt, daß TI2 Immunantworten bei i.p.-Injektion des Antigens in CD22^{-/-} Mäusen gegenüber Wildtyp-Mäusen etwa 2-fach reduziert sind. Bei i.v.-Injektion des Antigens, in einer Situation, in der bevorzugt die MZ B-Zellen der Milz mit Antigen in Kontakt kommen, waren die TI2 Antworten in CD22^{-/-} Mäusen signifikant stärker reduziert, als nach i.p.-Injektion. In histologischen Untersuchungen von Samardzic und Thomas Wirth konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, daß das verwendete Antigen, TNP-Ficoll, nur in der Marginalzone der Milz von Wildtyp-Mäusen, nicht aber in der von CD22^{-/-} Mäusen, effizient festgehalten wird.

daß MZ B-Zellen in CD22^{-/-} Mäusen stark reduziert sind, und daß die verminderten TI-2 Antworten dieser Tiere darauf zurückzuführen sein könnten.

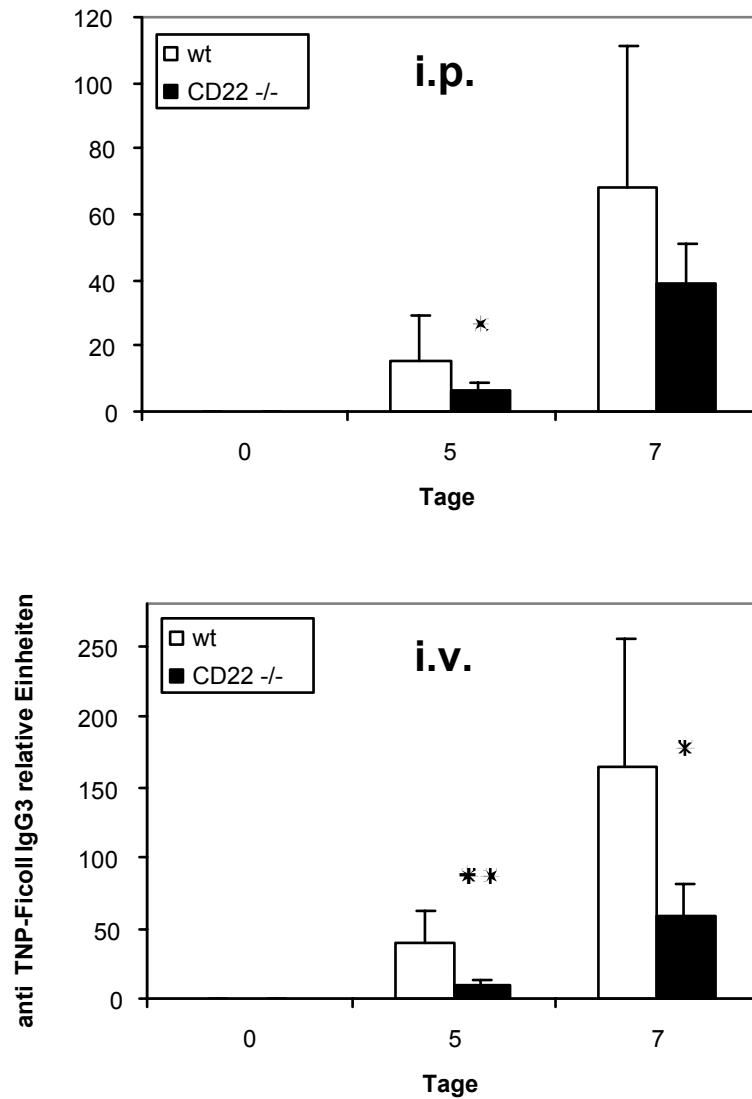
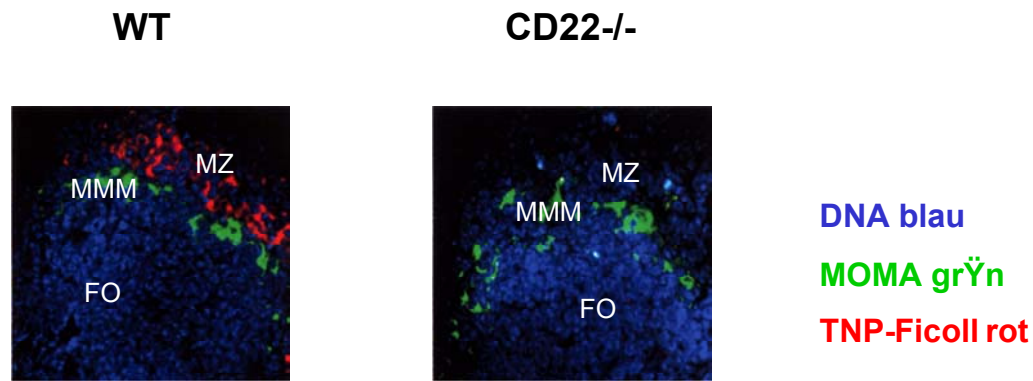


Abb. 29: Die Antwort gegen Thymusunabhängige Antigene Typ-2 in CD22^{-/-} Mäusen ist nach intravenöser Applikation des Antigens signifikant stärker reduziert als nach intraperitonealer Injektion. TNP-Ficoll wurde in das Peritoneum oder die Schwanzvene von C57BL/6 bzw. CD22^{-/-} Mäusen gespritzt. Nach 0, 5, und 7 Tagen wurden die IgG3 Serumspiegel per ELISA bestimmt. Die Reduktion der Immunantwort in CD22^{-/-} Mäusen war bei i.p.-Injektion ca. 2-fach reduziert, bei i.v. Injektion 3-4-fach. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ Student's T-Test



(Tatjana Samardzic und Thomas Wirth, Universität Ulm)

Abb. 30: TNP-Ficoll wird nur effizient in der Marginalzone von Wildtyp-Mäusen, aber nicht in der Marginalzone von CD22^{-/-} Mäusen festgehalten. TNP-Ficoll wurde in die Schwanzvene von Wildtyp bzw. CD22^{-/-} Mäusen injiziert. Die Tiere wurden 30 min später getötet, und Milzschnitte wurden mit Antikörpern gegen TNP (biotinyliert, + Streptavidin-Cyochrome, rot) und gegen MOMA (charakteristischer Marker für Metallophile Marginalzonen-Makrophagen, Markierung der inneren Grenze der Marginalzone, grün), bzw. mit DAPI (färbt alle DNA-haltigen Zellen) gefärbt. FO: Follikel, MMM: Metallophile Marginalzonen-Makrophagen, MZ: Marginalzone (Samardzic et al. 2002)

4. Diskussion

4.1 Generierung chimärer Mäuse mit CD22 Knockin-Konstrukten

4.1.1 Die verwendeten Targeting Konstrukte

Die Frequenz der homologen Rekombination war für das Konstrukt pCD22-ex12-Stop mit 2,3% befriedigend. Deutlich geringer war die Frequenz bei pCD22-ITIM-KO. Lediglich 0,375% waren korrekt rekombiniert. Der Unterschied in der Frequenz könnte durch die Länge der langen Arme der Konstrukte bedingt sein, nur 2,3 kb (1,7 kb ununterbrochene Homologie) bei pCD22-ITIM-KO gegenüber 3,57 kb (ununterbrochene Homologie von 3,2 kb) bei pCD22-ex12-Stop. Es wurde gezeigt, daß homologe Rekombination kritisch von der Länge der ununterbrochenen isogenen Homologie abhängt. Eine generelle Maßregel ist die Verwendung von 5-10 kb Homologie (Thomas and Capecchi 1987; Hasty et al. 1991). Bei Identifikation homolog rekombinanter Klone mit PCR wie in dieser Doktorarbeit ist es notwendig, die Homologie in einen langen und in einen kurzen Arm zu unterteilen. Eine Reduktion der Homologie des kurzen Arms unter 1 kb wird als kritisch beschrieben (Thomas et al. 1992). Beide hier verwendeten Konstrukte erreichen diese Länge ziemlich genau. Bei einer größeren Länge wird die Amplifikation analytischer PCR-Produkte kritischer. Bei Verwendung von PCR als erster Methode zur Identifikation homolog rekombinanter Klone muß also ein Kompromiß zwischen diesen beiden Kriterien gefunden werden.

Es ist bekannt, daß heterologe Sequenzen am Ende der Homologie die Frequenz der homologen Rekombination negativ beeinflussen. In einer systematischen Arbeit wurde gefunden, daß dies abhängig von der Länge der Heterologie ist. Am Ende des langen Arms wirken sich Fremd-Sequenzen stärker aus als am kurzen Arm (Kumar and Simons 1993). Es existiert aber auch die gegenteilige Meinung, daß es für die homologe Rekombination äußerst wichtig ist, die heterologen Sequenzen am kurzen Arm so kurz wie möglich zu halten (Klaus Pfeffer, unveröffentlichte Beobachtung). Ist die letzte Ansicht korrekt, so würde sich daraus eine zusätzliche Erklärung für die höhere HR Frequenz von pCD22-ex12-Stop gegenüber pCD22-ITIM-KO ergeben. Durch die Linearisierung bleiben am kurzen Arm nur etwa 100 bp des Plasmid-Gerüsts im Vergleich mit 1,6 kb bei pCD22-ITIM-KO zurück.

Sogar kleine Unterschiede in den Sequenzen der homologen Bereiche zwischen Targeting Vektor und dem entsprechenden genetischen Locus senken die Frequenz der homologen Rekombination erheblich (de Wind et al. 1995). Es gibt gute Hinweise darauf, daß die Ursache hierfür in der Reparatur von Basenfehlpaarungen („mismatch repair“) seitens der Zelle liegt. Die Reparaturenzyme erkennen Fehlpaarungen, die in Heteroduplex-Zwischenstufen während des Rekombinationsvorgangs sich unterscheidender Sequenzen entstehen und blockieren die homologe Rekombination. Die Targeting-Frequenzen nicht isogener Konstrukte sind genauso hoch wie die von isogenen Konstrukten, wenn die Fehlpaarungs-Reparatur durch Mutation defekt ist (de Wind et al. 1995).

Die hier verwendeten Vektoren zerstören nicht ein Gen durch Einführen einer Selektionskassette, sondern insertieren Mutationen in einer gewissen Entfernung von der Kassette in den CD22-Locus. Die Homologie in den Targeting Vektoren ist jeweils durch die einzuführenden Mutationen unterbrochen, was die Frequenz der homologen Rekombination senken könnte. Besonders in pCD22-ITIM-KO könnten die Mutationen der ITIMs im kurzen Arm in Exon 15 einen negativen Einfluß haben, was ebenfalls eine Erklärung für die geringere Frequenz gegenüber pCD22-ex12-Stop wäre. Bei letzterem Vektor besteht der kurze Arm nur aus homologer Sequenz. Insgesamt war die Frequenz von pCD22-ex12-Stop

in BL/6-III ausreichend, und es wurden genug rekombinierte Klone erhalten. pCD22-ITIM-KO rekombinierte weitaus weniger oft korrekt. Bei den korrekten Klonen wiederum zeigte sich, daß die Mutation in Exon 13 oftmals nicht im rekombinierten Locus enthalten war. Insgesamt war die Rekombinationsfrequenz also bereits in isogener C57BL/6-DNA sehr gering.

Unterschiede in der DNA-Sequenz kommen auch im gleichen Gen bei unterschiedlichen Mausstämmen vor. Diese können abhängig vom Mausstamm und vom betrachteten Gen oder sogar innerhalb eines Gens stark variieren. Introns divergieren stärker als Exons. In einer Veröffentlichung wurde gezeigt, daß die Frequenz der HR mit dem Retinoblastoma (Rb)-Gen in 129 ES-Zellen mit einem 129 Targeting Konstrukt 20 mal so hoch ist, als mit einem identischen BALB/c Konstrukt (te Riele et al. 1992). Kürzlich wurde ein 9,3 kb Abschnitt des Gens für den mu-Opoid Receptor aus 129/Sv und C57BL/6 analysiert (Zhou et al. 2001). Die Sequenz der beiden enthaltenen Exons war zwischen den beiden Mausstämmen vollständig konserviert, während die Introns relativ stark (2,5%) divergierten. Ähnlich gebaute C57BL/6 bzw. 129/Sv Targeting-Konstrukte erreichten mit isogener DNA Rekombinationsfrequenzen von ca. 2,9% bzw. 2,5%. Diese Frequenz reduzierte sich, wenn mit dem C57BL/6 Vektor 129/Sv ES-Zellen transfiziert wurden auf 0,05% (58-fach).

Eine weitere Frequenzveringerung der HR wurde dementsprechend in dieser Arbeit bei Targeting-Experimenten mit den C57BL/6 Targeting-Vektoren in nicht-isogenen Zelllinien beobachtet. Transfektionen in BALB/c ES-Zellen resultierte in keinem korrekt homolog rekombinierten Klon, auch nicht mit dem Konstrukt mit der höheren Frequenz, pCD22-ex12-Stop (2,3% in C57BL/6). Ebenso erfolglos waren Versuche mit der Zelllinie E14Tg2a (129/Ola), obwohl die Verwandtschaft mit C57BL/6 höher ist als die zwischen BALB/c und C57BL/6. Wie eben angesprochen kann allerdings auch die HR Frequenz zwischen 129 und C57BL/6 erhebliche Unterschiede aufweisen.

Durch eine Verlängerung der Homologie von pCD22-ITIM-KO wurde versucht, effizientere homologe Rekombination zu erreichen. Da mit der als sehr stabil bekannten Linie E14Tg2a weitergearbeitet werden sollte, wurde ein Stück DNA aus dieser Linie PCR amplifiziert, und dem ursprünglichen Konstrukt am langen Arm angehängt. Das prinzipielle Funktionieren dieser Strategie wurde in einem zur gleichen Zeit in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Knockin-Projekt demonstriert. Bei einem C57BL/6 Vektor zur Einführung einer Punktmutation im N-terminalen Bereich von CD22 wurde ein Teil der publizierten Promotor-Sequenz mit einem ähnlichen Protokoll angehängt. Das zusätzliche Stück war dabei ebenfalls aus 129/ola-DNA amplifiziert. Mit dem resultierenden Vektor wurden homolog rekombinante Klone in E14Tg2a erhalten. Allgemeingültige Rückschlüsse läßt das jedoch nicht zu. So ist es z.B. eine Frage des Zufalls, ob ein DNA-Molekül mit Amplifikationsfehler bei einer PCR-Klonierung eingebaut wird, oder eines ohne. Im individuellen Fall könnten unentdeckte Amplifikationsfehler zu Unterbrechungen der Homologie und damit zu einer geringeren Rekombinationsfrequenz beitragen.

Die PCR-Klonierungsstrategie ist bei dieser Strategie genauso wie die Konstruktion eines 129/B6 Vektors ein Kompromiß. Obwohl ein Amplifikationssystem mit Korrekturlese-(engl.: proof-reading) Aktivität verwendet wurde, sind Nukleotid-Fehleinbauten natürlich nicht auszuschließen. Wegen der PCR-Klonierungsstrategie mußten zumindest die Exons sequenziert werden, um eine fehlerfreie Aminosäuresequenz von CD22 zu gewährleisten. Bei drei verschiedenen Klonen des verlängerten Vektors pCD22-ITIM-KO wurden daher die Exons 8, 9, und 10 des angehängten DNA-Stückes sequenziert. Die Exons stimmten, bis auf eine durch die PCR verursachte Mutation in einem der Klone, überein. Auf das Sequenzieren der höchstwahrscheinlich stärker in der Sequenz divergierenden Introns wurde verzichtet, da dies einen verhältnismäßig großen Aufwand dargestellt hätte. Bei einer ersten Transfektion in E14Tg2a wurde dieser Umstand in Kauf genommen. Es wurden aber dann keine homologen Rekombinanten erhalten, obwohl mit 960 Klonen eine relativ große Anzahl von Klonen gescreent wurde.

Insgesamt ist der verlässlichste Weg, homolog rekombinierte Klone in ES-Zellen zu erhalten, die Konstruktion eines Targeting-Vektors mit langen Teilen nicht unterbrochener Homologie mit genomischer DNA der gewählten Zelllinie. Bei Wahl der Zelllinie E14Tg2a hätte dies bedeutet, pCD22-ITIM-KO aus 129/ola DNA neu zu klonieren, was in der verbleibenden Zeit als unrealistisch erschien. Mit der nun zur Verfügung stehenden genomischen Sequenz von CD22 und damit der Übersicht über sämtliche Schnittstellen sind die Voraussetzungen einen einfachen und schnellen Weg für eine Klonierung zu finden aber prinzipiell gut. Wichtige Basis wäre dabei die Verfügbarkeit eines Klons mit der genomischen Sequenz (129/ola) von CD22.

Eine weitere Alternative ist, trotz der relativen Instabilität von C57BL/6 ES-Zellen (s. nächster Abschnitt) und der geringen Anzahl etablierter Linien die Verwendung einer alternativen B6 ES-Zelllinie (z.B. Bruce4 (Kontgen et al. 1993), ND-1 (Neil Dear, persönliche Mitteilung), MPI-Serie (Auerbach et al. 2000)). Sehr schnell zu realisieren wäre die Verlängerung der Homologie äquivalent zu pCD22-ITIM-KO-ext-tk unter Verwendung genomischer C57BL/6 DNA, die sofort zur Verfügung stünde. Zum einen würde sich durch die Verlängerung wahrscheinlich die Frequenz der HR erhöhen. Zum anderen ergäbe sich mit dem verlängerten Vektor ein alternativer Weg der Vorbereitung zur Elektroporation durch Verdau mit dem Restriktionsenzym PfiMI. Dadurch würde sich zwar am langen Arm die Homologie auf 2,8 kb reduzieren, das übertrifft aber immer noch die des langen Arms in pCD22-ITIM-KO (2,3 kb). Andererseits würden aber sämtliche heterologe Sequenzen am langen und am kurzen Arm entfernt, was, wie erwähnt, vorteilhaft sein kann. Durch das fehlende HSV-tk Gen wäre außerdem eine Cre-Deletion in vivo möglich, was die Zeit in Kultur erheblich reduzieren würde. Damit ergäbe sich eine größere Wahrscheinlichkeit von Chimerismus und Keimbahntransmission der Nachkommen (s. nächster Abschnitt).

4.1.2 Zur verwendeten Zelllinie und den Kulturbedingungen

Bei Beginn der Arbeit gab es eine Reihe von Argumenten für die verwendete C57BL/6-III ES-Zelllinie. C57BL/6 ist ein für immunologische Studien sehr weit verbreiteter Mausstamm. Genetisch veränderte Mäuse zur Beantwortung immunologischer Fragestellungen werden daher bevorzugt mit einem C57BL/6 Hintergrund generiert. Dies geschieht sehr oft auf einem Umweg, wobei zuerst die gewünschte Mauslinie mit einer 129 ES-Zelllinie hergestellt, und diese dann über mehrere Generationen auf einen C57BL/6 Hintergrund zurückgekreuzt wird. Dieses Vorgehen wird gewählt, weil traditionell viele verschiedene, relativ stabile 129 ES-Zelllinien zur Verfügung stehen, und weil C57BL/6-Zelllinien allgemein als sehr instabil hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Keimbahnzellenbildung gelten. Dieser Umstand wird generell auf eine Änderung des Karyotyps und Differenzierung während Kultivierung in vitro zurückgeführt (Robertson 1987; Brown et al. 1992). Eine kürzlich veröffentlichte Studie, die die Keimbahntransmission mehrerer 129 und C57BL/6 ES-Zelllinien untersucht, bestätigt die relative Instabilität von C57BL/6-Linien (Auerbach et al. 2000).

Der direkte Weg, genetisch veränderte C57BL/6 Mäuse herzustellen, ist die Verwendung einer ES-Zelllinie dieses Stamms. Die in dieser Arbeit verwendeten CD22 defizienten Mäuse waren unter der Verwendung der Zelllinie C57BL/6-III entstanden (Nitschke et al. 1997). Diese Linie wurde 1991 von Birgit Ledermann etabliert (Ledermann and Burki 1991), und in der Folge unter anderem am Max-Planck-Institut für Immunbiologie erfolgreich verwendet. Um die entstehenden Phänotypen vor einem reinen C57BL/6-Hintergrund untersuchen zu können, sollten die beiden CD22 Knockin-Mauslinien CD22-tailless und CD22 ITIM KO ebenfalls in dieser Zelllinie generiert werden. Angesichts der positiven Erfahrungen in der Vergangenheit schien das machbar, und versprach außerdem eine große Zeitersparnis da die aufwendige Rückkreuzung entfallen würde.

Injektionsversuche mit in vitro manipulierten C57BL6/-III Klonen verliefen unerfolgreich. Wurden Chimäre erhalten, so war der Grad an Chimerismus in fast allen Fällen relativ niedrig, und Keimbahntransmission blieb aus. Nur in einem Fall, bei Injektion Cre-deletierter Tochterklone des CD22-ITIM-KO Klons YFtar12B5 wurde ein sehr stark chimäres Tier erhalten, das aber nach Tagen verstarb. Tests zeigten, daß Zellen der am jüngsten uns zur Verfügung stehenden Passage (P₁₁) zur Produktion hochchimärer Tiere und Keimbahntransmission beitragen konnten. Es ist allgemein bekannt, daß hoher Chimerismus und Keimbahntransmission korrelieren.

Verschiedene Studien zeigen, daß diese Eigenschaft mit zunehmendem Alter der Zellen in Kultur abnimmt. In einer systematischen Studie wurde gezeigt, daß der Grad an Chimerismus, die absolute Anzahl der chimären Nachkommen, und das Verhältnis der Anzahl chimärer zu nicht chimären Tieren direkt mit dem Anteil euploider Metaphasen in dem injizierten ES-Zell Klon korrelieren (Longo et al. 1997). Die meisten der getesteten Klone mit 50-100% euploiden Metaphasen, aber keiner der Klone mit weniger als 50% war fähig zur Keimbahntransmission. Zudem wurde hier gezeigt, daß mit wachsender Anzahl der Passagen und damit der Zeit in Kultur der Anteil der Aneuploidie steigt, was wiederum mit Chimärenerzeugung und Keimbahntransmission korrelierte. Eine altersabhängige Reduktion des Potentials zur Keimbahntransmission einer Reihe verschiedener ES-Zelllinien wurde auch von Fedorov et al. gezeigt (Fedorov et al. 1997). Auch in dieser Studie wurde ein Zusammenhang zwischen dem Grad an Chimerismus und der Keimbahntransmission empirisch gezeigt. Chromosomale Aberrationen können außerdem unter Umständen Subpopulationen von Kulturen einen selektiven Wachstumsvorteil verschaffen, was zu Überhandnahme bestimmter Klone führt. Dies wurde für Trisomie 8 gezeigt (Liu et al. 1997). Zellen mit Trisomie 8 zeigten auch hier gegenüber der chromosomal normalen Elternzelllinie ein nur marginales Potential zur Keimbahntransmission. Bemerkenswert ist, daß Klone mit hohem Potential zur Keimbahntransmission in dieser Arbeit anhand ihrer geringeren Größe und ihres langsameren Wachstums morphologisch identifizierbar waren, was jedoch nicht ohne weiteres generalisierbar ist.

Die Ergebnisse unserer Injektionsversuche stehen dahingehend mit den angesprochenen Studien in Einklang, als auch bei uns ein höheres Kulturalter der injizierten ES-Zellen generell zu weniger Chimären, geringerem Chimerismus, und fehlender Keimbahntransmission führte. Es wurde von uns nicht mittels Karyotypanalyse untersucht, ob dies ebenfalls mit Chromosomenaberrationen einherging. Verschiedene Autoren empfehlen, eine solche Karyotypanalyse den arbeitsintensiven Injektionen und nachfolgenden Verpaarungen vorzuschicken. Karyotypanalyse selbst ist aber eine relativ aufwendige Technik, die zudem in vielen Labors einschließlich unserem nicht etabliert ist. Die gängige und in vielen Fällen funktionelle Praxis ist daher, ein Experiment mit ES-Zellen mit unter den gegebenen Kulturbedingungen nachgewiesener Keimbahntransmission zu starten, und verschiedene voll charakterisierte Klone zu injizieren, wie auch bei uns geschehen. Im Falle des CD22-ITIM-KO Konstrukts wurden beide erhaltenen Mutterklone (YFtar3F1 und YFtar12B5), und eine Reihe Cre-deletierter Subklone injiziert. Dagegen stehen noch 12 wiederholt PCR-positive CD22-Tailless Klone zur Verfügung, die noch nicht injiziert wurden. Ausgehend von einer Karyotypanalyse könnten einwandfreie Klone, falls vorhanden, für eine Cre-Transfektion ausgewählt, und Subklone anschließend injiziert werden.

Eine Injektion mit den jüngsten zur Verfügung stehenden C57BL/6-III ES-Zellen ergab 4 chimäre (3 hochchimäre) Männchen, davon eines mit Keimbahntransmission. Vor Injektion wurden die Zellen 5 mal passagiert. Dieses Experiment zeigt, daß die verwendete Zelllinie vor unseren Experimenten prinzipiell noch das Potential für Keimbahntransmission besaß. Die Ausbeute keimbahntransmittierender Männchen aus der Injektion der Wildtyp-Linie war zufriedenstellend und entsprach den mit dieser Linie früher gemachten Erfahrungen. Studien der Vergangenheit belegen jedoch die unvermeidliche Akkumulation chromosomaler

Veränderungen (s. oben) oder subtilerer genetischer Veränderungen (Nagy et al. 1993) während der Zeit in Kultur. Deshalb ist zu vermuten, daß die ES-Zellen während unserer Gene-Targeting Experimente durch die Zeit in Kultur und unter Selektion Veränderungen ansammelten, die über einen kritischen Wert stiegen. Die Konsequenz war, daß ältere Klone nicht mehr das Potential hatten, zu Keimbahnzellen zu differenzieren.

Bemerkenswert ist, daß ein Cre-deletierter Tochterklon von YFtar3F1, YFtar3F1CreC/B4 bei einer Injektion einen Wurf von 4 nicht-chimären aber auch 4 chimären Tieren produzierte, obwohl der Mutterklon nie etwas ergab. Es ist möglich und dokumentiert, daß durch das Herausgreifen eines einzelnen Klons einer Population ein Subklon isoliert wird, der ein höheres Potential zur Keimbahntransmission besitzt, als der Ausgangsklon (Fedorov et al. 1997). Bis zum Erwachsenenalter überlebende Mäuse konnten aus jungen R1 ES-Zellen der Passage 6-8, aber nicht mehr von älteren Zellen ($\geq P_{14}$) gewonnen werden. Aus einzelnen neuen Subklonen bis P_{24} konnten jedoch wieder Mäuse generiert werden (Nagy et al. 1993). Ein weiteres Beispiel gibt die Subklonierung von E14 ES-Zellen. Einzelne Subklone wurden getestet, und die resultierende Linie E14.1 wurde in einer Reihe von Transfektionen verwendet. Die meisten resultierenden Klone hatten hohes Potential zur Keimbahntransmission (Ralph Kühn, unveröffentlichte Beobachtung). Eine mögliche und wahrscheinliche Erklärung dieser Resultate begründet sich in der Annahme, daß ES-Zell Populationen heterogen sind. Ein Teil der Zellen besitzt einen korrekten Karyotyp bzw. ist undifferenziert und totipotent. Durch in vitro Kultur verringert sich diese Fraktion sukzessive. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, exzessiv kultivierte Klone zu retten, indem man diploide Subklone zur Injektion heranzieht (Longo et al. 1997). Übertragen auf unsere Experimente wäre es mit einem solchen Vorgehen möglich, Klone mit dem Potential zur Keimbahntransmission aus den Subklonen von z.B. YFtar12B5 auszuwählen, und zu injizieren.

Ein weiterer zu berücksichtigender Aspekt bei der Generierung chimärer Mäuse ist der Mausstamm, aus dem die Blastozysten für die Injektion gewonnen werden. Die Injektionen bei B. Ledermann wurden in FVB/NJ-Blastozysten vorgenommen. Es wurde gezeigt, daß der Grad an Chimerismus und Keimbahntransmission von C57BL/6 ES-Zellen deutlich ansteigt, wenn koisogene C57BL/6-Tyr(c)-2J (c2J) anstelle von FVB/NJ (FVB) Blastozysten verwendet werden. Der Chimerismus kann bei Injektion von B6-Zellen in c2J Blastozysten aufgrund der Fellfarbe beurteilt werden, da es sich bei C57BL/6-Tyr(c)-2J (c2J) um einen Albinostamm handelt (Schuster-Gossler et al. 2001). Für künftige Experimente mit BL/6 ES-Zellen könnte die Verwendung dieses Wirtsstammes in Betracht gezogen werden. Als problematisch bei der Arbeit mit c2J hat sich allerdings in der Praxis die geringe Ausbeute an Blastozysten erwiesen (Marinus Lamers, unveröffentlichte Beobachtung).

Die Kulturbedingungen sind nachgewiesenermaßen entscheidend für den Erhalt der Totipotenz von ES-Zellen in vitro (Brown et al. 1992). Diese wurden im Laufe dieser Doktorarbeit mehrmals verändert. Zu Beginn wurde noch Medium in Pulverform im Haus selbst zubereitet, und dieses in Flaschen abgefüllt, die im Spülumlauf des Hauses bereits mit Tensiden in Kontakt gekommen waren, was potentiell schädlich für die Zellen ist. Sobald dieser Umstand bekannt wurde, wurde auf Fertigmedium und PBS in Kunststoffflaschen umgestellt. Mycoplasmenkontaminationen in ES-Zellen können ebenfalls die Gewinnung von Chimären in der beobachteten Art von Totgeburten, sowie die Keimbahntransmission beeinträchtigen. Infektionen haben dabei nicht immer einen offensichtlichen Effekt auf Zellwachstum und Morphologie. Die verwendeten Zelllinien wurden von Zeit zu Zeit per PCR auf Mycoplasmen getestet und waren stets Mycoplasmenfrei. Kritisch für den Zustand von ES-Zellen in Kultur ist auch die Qualität des benützten FCS. Von uns wurde entweder ES-Zell getestetes FCS von Gibco/Invitrogen oder FCS von PAN verwendet. Alle von uns verwendeten Chargen erwiesen sich in einem einfachen Proliferationstest als gleichwertig und zufriedenstellend. Das FCS von PAN wurde von B. Ledermann mit der Zelllinie C57BL/6-III sogar erfolgreich auf Keimbahntransmission getestet. Aus den Ergebnissen der durchgeführten Injektionen können nur schwer Rückschlüsse gezogen werden. Klone, die

letztendlich injiziert wurden, waren noch unter alten Bedingungen durch die homologe Rekombination gegangen (M12.2.3, M12.2.1, M12.10D5, YFtar3F1, YFtar12B5). Deshalb kann ein negativer Einfluß der alten Kulturbedingungen bei sämtlichen Injektionen nicht ausgeschlossen werden. Es wurden zwar im fortgeschrittenen Stadium der Doktorarbeit bei Injektionen von Klonen, die später unter verbesserten Bedingungen gehalten wurden, bessere Ergebnisse erzielt, aber die Injektionen fanden in Blastozysten eines anderen Wirtsstammes (BALB/c) statt und wurden von Burkhard Kneitz (anstelle von B. Ledermann) durchgeführt. Insgesamt ist es schwierig, die Kulturbedingungen für ES-Zellen während dieser Doktorarbeit zu vergleichen, und daher empfehlenswert, allgemeine Maßregeln so gut wie möglich zu beachten. Zukünftige Experimente werden deshalb mit den am Ende verwendeten Bedingungen durchgeführt werden.

4.2 Transfektionsexperimente mit einem CD22-ITIM-KO cDNA-Konstrukt in einer B-Zelllinie

Die Expression von CD22 ohne ITIMs, sowie dessen Tyrosinphosphorylierung und die Assoziation mit SHP-1 wurden in der Myelom-Zelllinie J558L_μm3 untersucht.

Ein sehr wichtiger Grund für die Durchführung der Transfektionsexperimente war, die korrekte Expression von CD22-ITIM-KO vor oder während der Generation einer entsprechenden Mauslinie zu überprüfen. Der Targeting-Vektor selbst kann für einen solchen Test nicht verwendet werden. Der bestmögliche indirekte Test war die Expression mit Hilfe eines cDNA-Konstruktes, das die entsprechenden Mutationen trägt, in einer geeigneten Zelllinie, wie hier geschehen. Im FACS konnte gezeigt werden, daß die veränderte Form von CD22 problemlos exprimiert wird. Dies war ein sehr wichtiger Test und Voraussetzung für eine Fortführung der weit aufwendigeren Generierung eines CD22-ITIM-KO Mausmodells (s. 3.1).

Nach Stimulation mit NP-BSA war keine Tyrosinphosphorylierung von CD22-ITIM-KO zu detektieren. Das könnte darauf zurückzuführen sein, daß in der Immunpräzipitation weniger CD22 präzipitiert wird. Zudem bleiben nach Zerstörung der ITIMs nur drei phosphorylierbare Tyrosine in der cytoplasmatischen Domäne zurück. Bis jetzt ist außerdem nicht geklärt, welche Tyrosine in welcher physiologischen Situation tatsächlich phosphoryliert werden. Es besteht die theoretische Möglichkeit, daß nicht alle der drei verbleibenden Tyrosine unter den Umständen des Experiments phosphoryliert werden.

Es ist bekannt, daß die Src-Familien Tyrosinkinase Lyn eine wichtige Rolle in der Tyrosinphosphorylierung von CD22 und der nachfolgenden Rekrutierung von SHP-1 spielt (Chan et al. 1998; Cornall et al. 1998; Nishizumi et al. 1998; Smith et al. 1998; Otipoby et al. 2001). Nur ein sehr kleiner Teil der Phosphorylierung ist auf Aktivität von Syk zurückzuführen (Otipoby et al. 2001). In vitro Studien schlagen vor, daß Lyn bereits im nicht-phosphorylierten Zustand an CD22 bindet. Durch Tyrosin-Phosphorylierung wird die Assoziation von Lyn um ein vielfaches verstärkt. Bevorzugte Bindungsstellen sind jetzt die Tyrosine 5 und 6, in sehr viel geringerem Umfang auch 2,3 und 4 (Tuscano et al. 1996). Falls die Phosphorylierung von Tyrosin 5 und 6 für die Initiierung einer Phosphorylierungskaskade wichtig ist, wäre unter Umständen sogar ein Fehlen jeglicher Lyn-abhängiger Phosphorylierung bei fehlenden ITIM-Tyrosinen 5 und 6 erklärbar.

Der zweite wichtige Test auf dem Weg zur Etablierung einer CD22-ITIM-KO Mauslinie war die Bestätigung der Funktionalität des Targeting-Konstrukts hinsichtlich SHP-1 Bindung. Bei zerstörten ITIMs wurde kein SHP-1 mit CD22 kopräzipitiert. Dies steht in Übereinstimmung mit der nicht nachweisbaren Tyrosin-Phosphorylierung von CD22-ITIM-KO. Obwohl quantitativ weniger CD22 von den CD22-ITIM-KO-Klonen präzipitiert wurde, sollte SHP-1 im Falle von nennenswerter Assoziation trotzdem noch nachweisbar sein, was nicht der Fall ist.

Darum ist der Rückschluß zulässig, daß tatsächlich die phosphorylierten ITIMs für die SHP-1 Bindung verantwortlich sind.

Die Expression von CD22-ITIM-KO Form konnte in dieser Arbeit nicht mit einer im Vergleich zu Wildtyp-Transfektanten höheren Tyrosinphosphorylierung des Adaptormoleküls BLNK korreliert werden. Auch die Phosphorylierung von BLNK in CD22wt Transfektanten schwankte zufällig, ohne mit der Höhe der CD22 Expression zu korrelieren (Experimente von Judith Gerlach). Das Potential von CD22 zur Inhibition hing in dem benutzten System auch nicht, wie ursprünglich angenommen, von einer gleichzeitigen Expression von α 2,6-Sialinsäure ab. Das ist bemerkenswert, da von unserer und einer anderen Arbeitsgruppe in unterschiedlichen Systemen gezeigt wurde, daß eine cis-Interaktion von CD22 mit Sialinsäure für die inhibitorische Funktion des Moleküls notwendig ist (Jin et al. 2002; Kelm et al. 2002).

CD72 ist ein weiterer B-Zell spezifischer Rezeptor, der mit dem BCR assoziiert, und die B-Zelle über SHP-1 negativ reguliert. In Studien mit CD72 Transfektanten von J558L μ m3 ist gezeigt, daß die Expression dieses Rezeptors mit einem ITIM-Motiv in der cytoplasmatischen Domäne die Phosphorylierung von BLNK, Ig α /Ig β , und Syk negativ reguliert. Dieser Effekt ist abhängig von SHP-1, da er durch eine gleichzeitige Expression einer dominant negativen Form dieser Phosphatase aufgehoben werden konnte. Darüber hinaus wurde gezeigt, daß CD72 der einzige Aktivator von SHP-1 in diesem System ist. Der inhibitorische Effekt von CD72 war ITIM-abhängig (Adachi et al. 2001). In einer anderen Arbeit wurde in einer B-Zelllinie BLNK als direktes Substrat von SHP-1 identifiziert (Mizuno et al. 2000).

Warum diese Beobachtungen in unserem äquivalenten System nicht nachvollziehbar sind bleibt fraglich. CD72 ist, im Gegensatz zu CD22, konstitutiv Tyrosin-phosphoryliert, und mit SHP-1 assoziiert, und benötigt folglich keinen Liganden für seine inhibitorische Funktion (Kumanogoh et al. 2000). CD22 wird dagegen sehr wahrscheinlich von einem Liganden auf der selben Zelloberfläche reguliert (Jin et al. 2002; Kelm et al. 2002). Wie erwähnt (s. 3.2) sind viele Oberflächenmarker auf der verwendeten Plasmazytomlinie J558L herunterreguliert, darunter auch ein potentieller Ligand von CD22, CD45. Falls der natürliche Ligand von CD22 nicht vorhanden ist, wäre das eine gute Erklärung für die nicht funktionale Inhibition des BCR-Signals durch CD22. Transfektionen in andere B-Zelllinien könnten helfen, dies näher zu untersuchen. Ein für ein solches Vorhaben potentiell gut geeignetes System wurde kürzlich beschrieben. J2-44 ist eine CD22-/- Zelllinie, die einen B-Zell Rezeptor, CD45, und α 2,6-Sialinsäure exprimiert (Jin et al. 2002). Alternativ könnte versucht werden, noch weitere Oberflächenmarker in den bestehenden Sialyltransferase/CD22-(ITIM-KO)-Transfektanten zu exprimieren, und so die physiologisch regulierte Inhibition durch CD22 zu rekonstituieren. Falls es gelänge, ein solches System zu etablieren, könnte die Signaltransduktion von CD22 untersucht, und wertvolle Hinweise auf den physiologischen Liganden von CD22 gewonnen werden.

Schließlich ist es sehr wahrscheinlich, daß die Phosphorylierung Tyrosin 4, daß für die Bindung von Grb-2 notwendig und ausreichend ist, unabhängig von Lyn stattfindet (Otipoby et al. 2001). Ein weiteres Potential unseres J558L/CD22-ITIM-KO Systems liegt daher der Untersuchung des Einflusses von CD22 auf den Grb-2/MAPK Signaltransduktionsweg.

Insgesamt wurde mit den ITIM-KO Transfektanten von J558L ein System geschaffen, daß zeigt, daß CD22-ITIM-KO korrekt exprimiert wird und funktionell hinsichtlich Bindung von SHP-1 ist. Weitere Analysen werden zeigen, ob die Tyrosin-Phosphorylierung von CD22 tatsächlich durch die Eliminierung der drei ITIM-Tyrosine vollständig inhibiert wird. Die gefundenen Resultate sind eine wichtige Voraussetzung für die Fortführung des CD22-ITIM-KO Knockin-Projekts, und bestätigen die ITIM-Abhängigkeit der SHP-1 Assoziation mit CD22.

4.3 B-Zell Populationen mit demaskiertem CD22

4.3.1 B-Zell Populationen mit demaskiertem CD22 in vivo

CD22 interagiert spezifisch mit bisher nicht genau definierten, α 2,6-Sialinsäure tragenden Liganden. Wechselwirkung mit Liganden auf der selben Zelloberfläche spielen dabei eine entscheidende Rolle: von CD22 auf humanen peripheren Blutzellen und humanen B-Zelllinien wurde gezeigt, daß die Bindungsstelle von endogener Sialinsäure besetzt ist (Razi and Varki 1998). Es wurde diskutiert, daß die cis-Maskierung von Siglecs durch endogene Sialinsäure unter anderem in die Regulation von Zell-Zell-Kontakten oder Protein-Protein-Interaktionen in cis involviert sein könnte (Crocker and Varki 2001). Liganden in cis haben offensichtlich einen wichtigen Einfluß auf die Signaltransduktion von CD22 (Jin et al. 2002; Kelm et al. 2002). Demaskiertes CD22 könnte dagegen die Wechselwirkung der B-Zelle mit Endothelzellen oder Lymphozyten unterstützen (Hanasaki et al. 1994; Hanasaki et al. 1995; Nitschke et al. 1999). Für ein Verständnis der Funktion von CD22 in Signaltransduktion und Adhäsion ist es wichtig, den Maskierungszustand von CD22 auf B-Zellen zu beurteilen, und B-Zell Subpopulationen mit demaskiertem CD22 zu identifizieren.

Auch bei Mäusen tragen die meisten peripheren B-Zellen maskiertes CD22. Eine kleine Subpopulation von ca. 2-5% der IgD^{hi} rezirkulierenden B-Zellen aus Milz und Lymphknoten von Mäusen ist jedoch in der Lage, das für humanes CD22 spezifische NeuAc-PAA zu binden. Die Fraktion der Zellen mit unmaskiertem CD22 ist im Knochenmark 2-5-fach erhöht (Floyd et al. 2000). Dies steht im Einklang mit einer Rolle von CD22 bei der Rezirkulation reifer B-Zellen ins Knochenmark (Nitschke et al. 1999). Eine durchflußcytometrische Detektion der unmaskierten Population in der Arbeit von Floyd et al. war erfolglos geblieben. Ein möglicher Grund hierfür war, daß eine für Maus-CD22 spezifische Probe mit N-Glykolyl α 2,6-Sialinsäure nicht zur Verfügung stand. Die NeuAc-PAA Probe war vielleicht nicht sensitiv genug, um unmaskierte Zellen im FACS zu detektieren.

Wir untersuchten die Fähigkeit von Maus-B-Zellen, exogene α 2,6-Sialinsäure zu binden mit zwei verschiedenen N-Glykolyl Sialinsäure-Proben, von denen eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber Maus-CD22 zu erwarten war. Eine dieser Proben war neuartig und basierte auf einem Streptavidin/Alkalische-Phosphatase-Konjugat, an das biotinylierte Sialinsäurereste gekoppelt waren. Besonders diese Probe erwies sich in unseren Experimenten als sehr sensitiv.

Auch mit den hier verwendeten Proben NeuGc-PAA und NeuGc-SA wurde gefunden, daß CD22 auf den allermeisten Maus-B-Zellen maskiert ist, und daß erst Behandlung mit Sialidase die Bindungsstelle von CD22 einer Bindung durch NeuGc-PAA bzw. NeuGc-SA zugänglich macht. Andererseits wurde hier erstmals eine Subpopulation von B-Zellen in Milz und Knochenmark von Mäusen im FACS identifiziert, die unmaskiertes CD22 trägt. Ungefähr 10% aller B220⁺ Milz-Zellen aus Wildtyp, im Gegensatz zu nur 4,5% aller B220⁺ Milz-Zellen aus CD22^{-/-} Mäusen banden NeuGc-SA. Mit NeuGc-PAA wurden ähnlich viele demaskierte Zellen in Wildtyp bzw. CD22^{-/-} B-Zellen gefunden (s. Abschnitt 3.3.1). Die Kontrollen mit CD22^{-/-} B-Zellen zeigten, daß die Probenbindung tatsächlich zum größten Teil von CD22 abhängig ist.

Wie erwähnt, bindet jedoch auch ein Teil der CD22^{-/-} B-Zellen NeuGc-SA. Andere Siglecs könnten für die CD22-unabhängige Bindung von α 2,6-Sialinsäure verantwortlich sein. Beim Menschen sind neben CD22 noch die CD33-verwandten Siglecs 5, 6, 9, und 10 auf B-Zellen exprimiert. Siglec-5, 9, und 10 binden sowohl α 2,3-sia als auch α 2,6-sia, letztere allerdings schwächer als CD22 (Crocker and Varki 2001). Sowohl die CD33-verwandten Maus-Siglecs, als auch die CD33-verwandten humanen Siglecs sind in Gruppen auf dem Maus-Chromosom 7 bzw. dem menschlichen Chromosom 19 angeordnet. Eine direkte Zuordnung von Maus-Orthologen der humanen CD33-verwandten Siglecs ist schwierig, da die Maus-

Gengruppe nur 4 Gene, die humane Gengruppe aber 7 Siglec-Gene enthält. Die Maus-Siglecs werden daher temporär mit einem Buchstaben-Code bezeichnet. Maus-Siglec-E (mSiglec-E) ist am stärksten verwandt mit Siglec-7, -8, und -9. mSiglec-E entspricht Siglec-5 und -6, und mSiglec-G ist verwandt mit Siglec-10. Ein CD33-verwandtes Siglec in der Maus ohne humane Entsprechung ist Siglec-H (Angata et al. 2001). Eine den Siglecs-5, -9, und -10 entsprechende Gewebsexpression und Bindungsspezifität vorausgesetzt, könnten die Siglecs-E, -F die Ursache für die CD22-unabhängige Bindung von α 2,6-Sialinsäure auf Milz-B-Zellen sein.

4.3.2 Anreicherung demaskierter Zellen im IgM^{hi}CD21^{hi} Kompartiment

Zur Charakterisierung der Subpopulation von Milz-B-Zellen mit demaskiertem CD22 (s. 3.3) wurden verschiedene durch Oberflächenmarker voneinander abgrenzbare Population hinsichtlich ihrer Bindung der Probe NeuGc-SA untersucht. Dabei wurde eine starke relative Anreicherung demaskierter Zellen innerhalb der IgM^{hi}CD21^{hi} -Fraktion von Milz-B-Zellen beobachtet. Der größte Teil dieser Zellen sind Transitionale B-Zellen Typ2 (T2 B-Zellen) (70-85%), mit dem Phänotyp IgM^{hi}IgD^{lo}CD23⁺CD21^{hi}. Ungefähr 15-30% sind MZ B-Zellen mit dem Phänotyp IgM^{hi}IgD^{hi}CD23⁻CD21^{hi}. Aus den T2 B-Zellen, die sich in der Milz im Primärfollikel befinden, entwickeln sich reife B-Zellen (engl. mature, M B-Zellen) (Loder et al. 1999). Auch Vorläufer von MZ-B-Zellen werden unter den IgM^{hi}IgD^{hi}CD21^{hi} T2 B-Zellen vermutet (Cariappa et al. 2001). In der Darstellung IgM gegen CD21 konnte nicht zwischen T2 B-Zellen und MZ-B-Zellen unterschieden werden, und ob Zellen einer oder beider Subpopulationen demaskiert sind. Es wurde berichtet, daß CD22 auf MZ B-Zellen ähnlich hoch exprimiert ist, wie auf reifen B-Zellen (Erickson et al. 1996).

T2 B-Zellen können aufgrund ihrer hohen Expression von IgM und IgD auch mit einer Färbung IgM gegen IgD dargestellt werden. Die MZ B-Zellen befinden sich dann zusammen mit den T1 B-Zellen in der IgM^{hi}IgD^{lo}-Fraktion. MZ B-Zellen machen etwa 3-5% aller B-Zellen in der Milz aus, T2 B-Zellen etwa 15-20%. Auch die B1 B-Zellen der Milz sind IgM^{hi}CD21^{hi}, stellen aber nur einen verschwindend kleinen Anteil der B-Zellen der Milz dar. Es ist möglich, daß es sich bei einem Teil der demaskierten Zellen in T2 um MZ B-Zellen (und evtl. B1 B-Zellen) handelt. Der Anteil der Zellen mit demaskiertem CD22 unter den T1 Zellen erhöht sich in tatsächlich in dieser Darstellung, in der T2-Fraktion dagegen sind weniger demaskierte Zellen zu erkennen, was in Übereinstimmung mit dieser Idee wäre.

Eine daraufhin durchgeführtes FACS-Experiment in der die Probenbindung der MZ B-Zellen und der B1 B-Zellen der Peritonealhöhle spezifisch untersucht werden sollte, scheiterte aufgrund der bereits erwähnten Instabilität der NeuGc-SA-Probe. Bis zum Ende dieser Arbeit stand keine neue Präparation zur Verfügung. Die Frage nach der Maskierung von CD22 auf MZ-B-Zellen und den verwandten B1-Zellen wird in zukünftigen Experimenten mit neuen Chargen der Probe abschließend beantwortet werden.

FACS-Analyse hatte ergeben, daß Zellen mit demaskiertem CD22 Aktivierungsmarker, unter anderem B7.2 exprimieren. Für die MZ B-Zellen der Milz wurde gefunden, daß diese B7.2 bereits im Ruhezustand exprimieren, und daher eine preaktivierte Subpopulation von B-Zellen bilden (Oliver et al. 1999). Die Feststellung, daß Zellen mit unmaskiertem CD22 B7.2 exprimieren, zusammen mit der Beobachtung des hohen Anteils unmaskierter Zellen innerhalb der IgM^{hi}CD21^{hi} Zellen ist eventuell ein weiteres Indiz dafür daß MZ B-Zellen oder Vorläufer zumindest einen großen Anteil demaskierter Milz-B-Zellen darstellen.

Im T2 B-Zell Kompartiment findet man Vorstufen für reife, folliculäre (M) B-Zellen und MZ-B-Zellen. Die Differenzierung in diese verschiedenen Subkompartiments ist sehr wahrscheinlich der positiven Selektion der Vorstufen durch (Selbst-)Antigen unterworfen. Dabei spielen sowohl BCR-Signale als auch Signale von Korezeptoren eine Rolle (Martin and Kearney 2000; Cariappa and Pillai 2002). Der relativ große Anteil an Zellen mit

demaskiertem CD22 könnte im Zusammenhang mit Selektionsvorgängen in diese Subkompartimente stehen. Es wurde gezeigt, daß die Signalstärke für die Entwicklung von reifen und MZ B Zellen entscheidende Bedeutung hat (Cariappa et al. 2001). Ein starkes BCR-Signal bevorteilt die Entwicklung von reifen (bzw. B1) B-Zellen, ein schwächeres Signal dagegen führt tendenziell zur Entwicklung von MZ B-Zellen. CD22 wiederum ist ein wichtiger Regulator des B-Zell Signals. Die Assoziation von CD22 mit einem Liganden auf der selben B-Zelle, und damit vielleicht die Demaskierung, ist entscheidend für die inhibitorische Funktion von CD22. Die Maskierung von CD22 könnte deshalb ein Parameter sein, der die BCR-Signalstärke, und damit die Selektion von B-Zellen in Subkompartimente kontrolliert. Das Ausmaß der Assoziation von CD22 mit Liganden auf der Zelloberfläche oder der Grad zu dem CD22 mit Liganden in trans interagieren kann, weil die Bindungsstelle unmaskiert ist, könnten in der Differenzierung von B Zell Subpopulationen eine wichtige Rolle spielen.

Dabei ist unklar, in welcher Richtung die Demaskierung von CD22 die B-Zell Signaltransduktion bzw. das Ca^{2+} -Signal beeinflusst. In der humanen B-Zelllinie Daudi führt die Unterbrechung der Wechselwirkung von CD22 mit seinem Liganden in cis durch einen Inhibitor zu einem stärkeren Ca^{2+} -Signal (Kelm et al. 2002). In dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, daß Aktivierung mit LPS zur Demaskierung von CD22 auf B-Zellen führt (s. 3.3.4). Falls die Dissoziation von CD22 von seinem natürlichen Liganden durch den Inhibitor im Daudi-System durch die Demaskierung von CD22 durch LPS auf Maus B-Zellen reflektiert wird, so wäre ein stärkeres Ca^{2+} -Signal LPS-aktivierter B-Zellen zu erwarten. Experimente mit bzw. ohne Bindung von CD22 durch Antikörper vor BCR-Stimulation zeigen jedoch, daß CD22 auch nach 48 h LPS-Stimulation das Ca^{2+} -Signal noch inhibieren kann (Rudge et al. 2002).

4.3.3 Demaskierung nach in vitro Aktivierung

In dieser Doktorarbeit wurde eine neue Subpopulation von B-Zellen mit demaskiertem CD22 definiert. Anhand der starken Expression der Aktivierungsmarker CD69, B7.2, und CD25 wurde gezeigt, daß Zellen dieser Population aktiviert sind. Diese Beobachtung wird durch eine Studie unterstützt, aus der hervorging, daß die Liganden-Bindungsstelle von CD22 normalerweise von endogener $\alpha 2,6$ -Sia maskiert ist, aber daß eine Aktivierung peripherer humaner Blutzellen zu einer Demaskierung einer $\alpha 2,6$ -Sia spezifischen Lectin-Funktion auf CD22 positiven Zellen führt (Razi and Varki 1998). Zeitgleich zur Identifikation der Subpopulationen, die demaskiertes CD22 tragen, versuchten wir auch, mit Hilfe der NeuGc-PAA-Probe diesen Demaskierungseffekt in Folge von Aktivierung ex vivo nachzuvollziehen und genauer zu analysieren.

Milzzellen von Wildtyp und CD22^{-/-} Mäusen wurden dazu mit verschiedenen polyklonalen Aktivatoren für 48 oder 72 h stimuliert, und anschließend im FACS analysiert. Demaskierung $\alpha 2,6$ -Sialinsäure bindender Aktivität war prinzipiell bei allen Stimuli mit Ausnahme von IgM alleine zu beobachten. Auch bei B Zellen aus CD22 defizienten Tieren war mit den meisten Stimuli ein Demaskierungseffekt zu beobachten. Dieser war oft nur geringfügig kleiner, als bei Wildtyp-Zellen. Die Ausnahme bildete die Stimulation mit LPS bzw. IL4 alleine. Hier trat eine Demaskierung nur nach Aktivierung von Wildtyp, aber nicht nach Aktivierung von CD22^{-/-} Zellen auf.

Wie auch schon unter 4.3.1 (B-Zell Populationen mit demaskiertem CD22 in vivo) diskutiert, könnten andere Siglecs könnten für die CD22-unabhängige Bindung von $\alpha 2,6$ -Sialinsäure verantwortlich sein.

Die Aktivierung der Zellen selbst könnte die Expressionslevel verschiedener Siglecs einschließlich CD22 auf der Zelloberfläche beeinflussen. Früh wurde berichtet, daß CD22 auf aktivierten B-Zellen generell höher exprimiert ist, als auf ruhenden B-Zellen (Torres et al. 1992). Später wurde gezeigt, daß LPS bzw. rekombinanter trimerer CD40-Ligand (CD40L),

jeweils in Kombination mit IL4 und für 4 Tage, zu einer 5-fach höheren CD22 Expression verglichen mit frisch isolierten B-Zellen aus Milz führt (Erickson et al. 1996). Die Hochregulation von CD22 durch LPS zusammen mit IL4 wurde in einer anderen Veröffentlichung bestätigt (Mary et al. 2000). Im Widerspruch dazu wurde in einer jüngst publizierten Studie eine geringere CD22 Expression nach Stimulation mit IL4 zusammen mit LPS gefunden (Rudge et al. 2002).

In einer zum Zeitpunkt des Abschlusses dieser Doktorarbeit noch nicht publizierten Arbeit wurde die Änderung der Expression von CD22 auf B1 und B2-Zellen infolge von Behandlung mit verschiedenen Stimuli charakterisiert (Lajaunias 2002). Hier wurde auf B2 B-Zellen deutlich mehr CD22 in Folge von 24 h bzw. 48 h Aktivierung der Zellen mit LPS alleine nachgewiesen. In geringerem Maße erhöhte auch Behandlung mit anti CD40 Antikörpern die CD22 Expression. Im Gegensatz dazu wurde CD22 auf der Zelloberfläche nach Stimulation mit verschiedenen anti IgM Antikörpern jedoch stark herunterreguliert. Dieser Effekt war abhängig von der Konzentration des jeweiligen Antikörpers. Auf CD5⁺ B1 Zellen wurde CD22 durch LPS (und CpG-ODN) herunterreguliert, auf den restlichen B1-Zellen wurde keine stärkere Expression beobachtet.

Bei Aktivierung mit anti IgM alleine war praktisch kein Unterschied in der NeuGc-PAA-Bindung zwischen Wildtyp und CD22^{-/-} Zellen feststellbar. Es wurde gezeigt, daß durch Kreuzvernetzung des BCRs weniger CD22 auf B-Zellen exprimiert wird (Lajaunias 2002). Durch geringere Oberflächen-Expression von CD22 könnte die Abhängigkeit der NeuGc-PAA Probenbindung von CD22 gegenüber der von anderen Siglecs so stark an Gewicht verlieren, daß der geringe Bindungsunterschied erklärbar wird. Wurde IgM in Kombination mit anderen Aktivatoren eingesetzt, war der Unterschied in der Probenbindung zwar immer vorhanden, aber meist sehr gering, was die Vermutung nahelegt, daß der Effekt von anti IgM auf die CD22 Expression dominant gegenüber der Wirkung anderer Aktivatoren ist. Anti-IgM zusammen mit IL4 z.B. führte zu weniger CD22-Expression (Rudge et al. 2002). Die Expression von CD22 nach gleichzeitiger Stimulation mit anti-IgM und LPS wurde von uns noch nicht getestet, so daß keine Aussage darüber getroffen werden kann.

Als Mechanismus für die Demaskierung ist neben einer Änderung der Expression von Siglecs auch eine Änderung der Menge von Sialinsäure auf der Zelloberfläche denkbar. Diese könnte z.B. durch die Aktivität einer an der Zelloberfläche aktiven Sialidase, oder durch eine veränderte Regulation der intrazellulär aktiven Sialyltransferase, und daraus resultierender veränderter Sialylierung von Proteinen an der Zelloberfläche bewirkt werden. Ein weiterer möglicher Mechanismus ist eine Reorganisation von Membran-Domänen und eine daraus resultierende Dissoziation von Siglecs von sialylierten Liganden (Crocker and Varki 2001). In unseren Experimenten konnten wir wiederholt zeigen, daß α 2,6-Sialinsäure auf Wildtyp und CD22^{-/-} B-Zellen durch Stimulation mit LPS deutlich herunterreguliert wird. Dieser Effekt wurde mit keinem der anderen Stimuli beobachtet. Bei einer gleichzeitigen Mehrexpression von CD22 (s. oben) könnte das bedeuten, daß weniger Liganden-Bindungsstellen durch endogene Sialinsäure belegt sind. Das könnte den beobachteten Demaskierungseffekt erklären. Die Demaskierung durch IL4 muß jedoch nach einem anderen Mechanismus ablaufen. Behandlung von B-Zellen mit IL4 alleine für 48 h beeinflusst die Expression von CD22 nicht (Rudge et al. 2002). In unseren eigenen Experimenten blieb die Expression von α 2,6sia auf der Zelloberfläche während IL4 Behandlung konstant. Die Demaskierung von CD22 durch IL4 Aktivierung könnte durch räumliche Dissoziation von CD22 von seinem/n Sialinsäure-tragenden Liganden auf der Zelloberfläche hervorgerufen werden.

Die polyklonalen Stimulanzen, die in dieser Reihe von Experimenten verwendet werden, wirken auf unterschiedliche B-Zell Subpopulationen unterschiedlich. So wurde z.B. gezeigt, daß MZ (und B1) B-Zellen im Gegensatz zu B2 B-Zellen infolge von BCR Kreuzvernetzung in vitro nicht proliferieren, sondern in Apoptose gehen (Oliver et al. 1999). T2 und reife B-Zellen dagegen proliferieren nach BCR-Stimulation. MZ B-Zellen wiederum proliferieren nach

Behandlung mit LPS (und CD40) viel schneller als reife B-Zellen. Je nach Aktivator oder Kombination von Aktivatoren könnten einzelne Populationen von B-Zellen selektiv expandiert werden, die evtl. unterschiedlich viel CD22 exprimieren oder deren CD22 maskiert bzw. unmaskiert ist, und so zu den beobachteten Effekten beitragen.

Wie erwähnt, werden potentiell noch eine Reihe weiterer α 2,6-Sialinsäure bindender Siglecs auf B-Zellen exprimiert. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß auch deren Expression der Regulation durch polyklonale Aktivatoren unterliegt. Es wird interessant sein, diesen Umstand in weiterführenden Experimenten zu untersuchen. Voraussetzung ist aber zunächst eine genaue Charakterisierung der murinen Homologe humaner Siglecs. Die Ergebnisse werden Aufschluß darüber geben, wie die Expression und die cis-Maskierung anderer Siglecs durch Aktivierung reguliert wird, und wie sich der Anteil anderer Siglecs an der α 2,6-Sialinsäurebindung dadurch ändert. Die so gewonnenen Kenntnisse werden helfen, den geringen Unterschied in der Demaskierung zwischen CD22^{-/-} und Wildtyp-Zellen bei Aktivierung mit bestimmten Kombinationen von Aktivatoren zu erklären.

Die Demaskierung der Bindungsstelle könnte CD22 in die Lage versetzen, Liganden in trans zu binden. Es wurde z.B. vorgeschlagen, daß durch Interaktion von CD22 mit CD45 auf CD4⁺ T-Zellen CD22 vom B Zell Rezeptor getrennt und dadurch das BCR Signal in dieser Situation verstärkt werden kann (Sgroi et al. 1995). Solch eine Situation könnte beim Kontakt einer Antigen-präsentierenden B-Zelle mit einer T_H2-Zelle im Zuge einer Thymus-abhängigen Immunantwort auftreten. Daß die Thymus-abhängigen Immunantworten in CD22^{-/-} Mäusen normal sind (Nitschke et al. 1997), würde einem solchen Modell nicht widersprechen, falls wirklich nur die Entfernung von CD22 vom BCR entscheidend ist, nicht aber eine von der Kontrolle des BCR-Signals unabhängige Signalfunktion von CD22.

Es ist gezeigt, daß CD22 eine Rolle bei Thymus-unabhängigen (TI) Immunantworten spielt (Nitschke et al. 1997). Dies wurde anhand der Produktion von Immunglobulinen nach Injektion des TI2 Antigens TNP-Ficoll festgestellt. Bei einer realen bakteriellen Infektion ist zu erwarten, das neben Kreuzvernetzung von B-Zell Rezeptoren durch multivalente Antigene auch durch mikrobielle Lipopolysaccharide vermittelte Signale eine Rolle spielen. Nach LPS-Stimulation war der Unterschied in der Demaskierung zwischen B-Zellen aus Wildtyp bzw. CD22^{-/-} Mäusen besonders groß. Zukünftige Experimente werden die Bedeutung dieser Beobachtung aufklären. Zum Beispiel wurde gezeigt, daß α 2,6-Sia auf Endothelzellen durch die Entzündungsmediatoren TNF- α und IL-1, aber auch durch LPS hochreguliert werden kann (Hanasaki et al. 1994). Die Demaskierung und die gleichzeitige Verstärkung der Expression von CD22 auf B-Zellen könnte zu einer Rekrutierung von B-Zellen zu Regionen bakterieller Infektion auf endothelialen Oberflächen führen. Weiterhin könnte die Demaskierung in Synergie mit der Exposition von α 2,6-Sia auf Endothelzellen zu einer Unterbrechung sialinsäureabhängiger cis-Interaktion von CD22 führen. Die Inhibition der BCR-Signaltransduktion durch CD22 könnte durch einen solchen Mechanismus in adäquaten Situationen unterbrochen werden.

Neben LPS konnte in unseren Experimenten auch IL4 eine ausschließlich von CD22 abhängige Bindung von NeuGc-PAA bewirken. Auch IL4 konnte in einer Studie die Exposition von α 2,6-Sia auf Endothelzellen bewirken (Hanasaki et al. 1995). Insgesamt scheint möglich, daß durch gleichzeitige Stimulation von noch näher zu definierenden Epithelien und B-Zellen mit LPS und/oder IL4 eine CD22 vermittelte interzelluläre Interaktion bewirkt wird.

Liganden für CD22 wurden auch auf sinusoidalen Endothelzellen des Knochenmarks gefunden (Nitschke et al. 1999), und mit der Wanderung von Plasmazellvorstufen ins Knochenmark in Zusammenhang gebracht. Demaskierung durch LPS könnte in diesem

Zusammenhang insbesondere bei der B-Zell Aktivierung und Differenzierung bei bakteriellen Infektionen wichtig sein.

Die Erhöhung der CD22 Expression im Zusammenhang einer Verringerung des Liganden auf der selben Zelloberfläche machen in jedem Fall eine wichtige trans-Interaktion sehr wahrscheinlich. Es wird interessant sein, in weiterführenden Experimenten den Liganden und die physiologische Situation des Auftretens dieses Phänomens zu untersuchen.

4.4 Marginalzonen B-Zellen in CD22^{-/-} Mäusen

Marginalzonen B Zellen (MZ B Zellen) sind eine spezialisierte B Zell Subpopulation die ausschließlich in der Milz vorkommen. Dort befinden sie sich am äußeren Rand der PALS (Periarterioläre Lymphatische Scheide), jenseits des Marginalsinus (Übersichtsartikel s. (Martin and Kearney 2000)). MZ B Zellen sind durch eine Reihe von Oberflächenmarkern charakterisierbar, und anhand dieser von anderen B Zell Subpopulationen der Milz unterscheidbar. Reife B Zellen sind IgM^{lo}IgD^{hi}CD21^{int}CD23^{hi}CD1d^{neg}, MZ B Zellen dagegen IgM^{hi}IgD^{lo}CD21^{hi}CD23^{lo}CD1d^{hi}.

4.4.1 Marginalzonen B-Zellen in CD22^{-/-} Mäusen sind reduziert

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Durchflußcytometrie gezeigt, daß das MZ B-Zell Kompartiment in CD22 defizienten Mäusen um 70-80% reduziert ist. Die Reduktion der MZ B-Zellen scheint in der Färbung mit B220 und CD1 ausgeprägter zu sein, als in der Färbung CD21 gegen CD23. Der Grund hierfür könnte in der Expression von CD1 auch in anderen B Zell Subpopulationen der Milz liegen. Das Expressionslevel steigt von T1 über M und T2 B Zellen bis hin zu den MZ B Zellen kontinuierlich an (Batten, Groom et al. 2000). Transitionale B-Zellen mit relativ hoher CD1 Expression sind in CD22 defizienten Mäusen ebenfalls leicht reduziert (Nitschke, Carsetti et al. 1997). Es wäre daher denkbar, daß die B220/CD1 Färbung die Reduktion in beiden Kompartiments widerspiegelt. Die Population der MZ B Zellen ist unter den B220+CD1^{hi}-Zellen trotzdem dominant, so daß Unterschiede zwischen Wildtyp und CD22^{-/-} tatsächlich auf ein kleineres MZ B Zell Kompartiment zurückzuführen sind. Immunhistochemische Studien die zur gleichen Zeit von einer kooperierenden Gruppe in Ulm (T. Samardzic, D. Marinkovic, Thomas Wirth) durchgeführt wurden, unterstreichen die Reduktion von B-Zellen in der MZ von CD22-defizienten Mäusen (Samardzic, Marinkovic et al. 2002).

Die Frage, die sich stellt ist, wie CD22 die Größe des MZ B-Zell Kompartiments beeinflusst. Neben der Spezifität des BCRs ist unter anderem die Stärke des BCR-Signals entscheidend für die Entwicklung von MZ B-Zellen. In der Vergangenheit hat sich gezeigt, daß Mutationen, die die Stärke des BCR-Signals beeinflussen, auch Auswirkungen auf die Größe des B1 B-Zell Kompartiments und/oder die Größe des MZ B-Zell Kompartiments haben. Ein starkes BCR-Signal scheint die Differenzierung in Richtung reifer bzw. B1 B-Zellen zu treiben. MZ B-Zellen entwickeln sich dagegen bevorzugt bei einem schwächeren BCR-Signal. In Btk^{-/-} Mäusen ist dagegen das BCR-Signal abgeschwächt. Die Gesamtzahl an peripheren B-Zellen in diesen Tieren ist reduziert, dennoch führt das relativ schwache Signal dazu, daß der relative Anteil an MZ B-Zellen stark erhöht ist (Martin and Kearney 2000; Cariappa, Tang et al. 2001). Abwesenheit von Aiolos, einem Zink-Finger Transkriptionsfaktor, führt ebenso wie Lyn-Defizienz und Igα-Defizienz zu einem stärkeren BCR-Signal (Chan et al. 1997; Wang et al. 1998; Kraus et al. 1999; Torres and Hafen 1999). Das MZ B Zell Kompartiment ist jeweils stark reduziert (Wang et al. 1998; Kraus et al. 2001; Seo et al. 2001). CD22 ist ebenfalls ein negativer Regulator des BCR-Signals, und Defizienz für diesen Rezeptor führt zu einem verstärkten BCR-Signal. Die Reduktion von MZ B-Zellen in CD22^{-/-} Mäusen findet daher eine mögliche Erklärung in der „Signalstärke-Hypothese“.

Die Src-Familien Kinase Lyn ist, so wie CD22, wichtig für die Inhibition des BCR-Ca²⁺-Signals. Beide Moleküle sind darüber hinaus funktionell eng miteinander verknüpft. Lyn ist für die Phosphorylierung von CD22 und für dessen inhibitorische Funktion essentiell (Chan et al. 1998; Cornall et al. 1998; Smith et al. 1998; Otipoby et al. 2001). Weiterhin wurde in einer eleganten genetischen Studie gezeigt, daß Lyn, CD22, und SHP-1 Komponenten eines Signalwegs sind (Cornall et al. 1998). Da Lyn-defiziente Mäuse keine MZ B Zellen besitzen (Seo et al. 2001) lag deshalb Vermutung nahe, daß das Fehlen von CD22 ebenfalls einen Einfluß auf die Größe des MZ B Zell Kompartiments haben könnte, was sich in unseren Experimenten dann auch bestätigte.

Entscheidend für ein normales MZ B-Zell Kompartiment ist auch die funktionierende Migration der Zellen in die richtige Umgebung in der Marginalzone und deren anschließender Verbleib dort. Kürzlich wurde gezeigt, daß die blockierte Entwicklung von MZ B-Zellen in Pyk-2^{-/-}, Lsc^{-/-}, und Dock2^{-/-} Mäusen mit einer geänderten Beweglichkeit von B-Zellen einhergeht (Guinamard et al. 2000; Fukui et al. 2001; Girkontaite et al. 2001). Pyk-2 ist eine cytosolische Tyrosinkinase, die wichtig für die Signaltransduktion von Chemokinrezeptoren ist. Lsc und DOCK2 sind in die Polymerisierung und Reorganisation von Aktin involviert. Es ist möglich, daß auch die Reduktion von MZ B-Zellen in CD22^{-/-} Mäusen ihren Ursprung in einem veränderten Migrationsverhalten hat. Tatsächlich wurde beobachtet, daß das Migrationsverhalten von CD22^{-/-} B-Zellen gegenüber den Chemokinen MIP-3 β und SDF-1 α im Vergleich zu Wildtyp-B-Zellen verstärkt ist (Samardzic et al. 2002). CD22 könnte auf verschiedenen Wegen die Chemokin-Signaltransduktion in B-Zellen beeinflussen. Es wurde gezeigt, daß das BCR-Signal die Antwort der Zelle auf Chemokine beeinflusst (Bleul et al. 1998). Der Mechanismus für diese veränderte Antwort auf Chemokine könnte z.B. in einer BCR-induzierten Veränderung des Expressionsmusters von Chemokinrezeptoren auf der B-Zelle begründet sein. Kürzlich wurde demonstriert, daß Migration von B-Zellen in die T-Zell Zone der Milz durch Antigen-induzierte Hochregulation von CCR7, einem Chemokinrezeptor für T-Zell-Zonen-Chemokine, vermittelt ist (Reif et al. 2002). CD22 ist ein wichtiger Regulator des BCR-Signals, und könnte in einem äquivalenten Prozess die Expression von noch zu definierenden, für die Migration oder die Retention von MZ B-Zellen wichtigen Chemokinrezeptoren regulieren. Alternativ dazu könnte CD22 auch die Signaltransduktion von Chemokin-Rezeptoren direkt kontrollieren. Pyk-2 ist eine für die Signaltransduktion von Chemokinrezeptoren wichtige Tyrosinkinase (s. oben). Nach Aktivierung von CCR5 wird SHP-1 aktiviert und bindet an Pyk-2 (Ganju et al. 2000). CD22 ist ein Aktivator von SHP-1, und könnte so die Signaltransduktion über CCR5 direkt beeinflussen.

4.4.2 Die schwachen Thymus-unabhängigen Immunantworten in CD22^{-/-} Mäusen könnten auf das verkleinerte MZ B-Zell Kompartiment zurückzuführen sein

Die funktionellen Konsequenzen der Reduktion der MZ B Zellen in CD22^{-/-} Mäusen wurden in Immunisierungsexperimenten untersucht. Zusammen mit B1 B-Zellen sind MZ B-Zellen hauptsächlich verantwortlich für die Immunantwort gegen Thymusunabhängige Antigene Typ-2 (TI2 Antigene) (Lane et al. 1986; Martin and Kearney 2000). Aus früheren Arbeiten war bereits bekannt, daß CD22^{-/-} Mäuse verminderte TI2-Antworten bei normalem B1 B-Zell Kompartiment haben. Es bestand die Möglichkeit, daß die Reduktion der MZ B-Zellen die Ursache für die schwächeren TI2-Antworten in CD22^{-/-} Mäusen ist.

Wegen ihrer Position unmittelbar jenseits des Marginalsinus an der Grenze zwischen weißer und roter Pulpa der Milz sind MZ B Zellen eine der ersten Populationen, die mit Antigenen im Blut in Kontakt kommen. MZ B Zellen sind außerdem preaktiviert. Sie exprimieren bereits im Ruhezustand die Aktivierungsmarker B7.1 und B7.2. Wegen dieser Preaktivierung können sie nach Aktivierung viel schneller Effektorzellen bilden als reife B Zellen, und binnen ca.24 Stunden zu IgM produzierenden Plasmablasten differenzieren (Oliver et al. 1999). In einer

kürzlich publizierten Arbeit wurde demonstriert, daß der Weg der Immunisierung den relativen Beitrag von B1 Zellen und MZ B Zellen zur Immunantwort bestimmt (Martin et al. 2001). Antigene, die intraperitoneal appliziert werden, erreichen vornehmlich die B1 Zellen des Peritoneums, so daß diese die Zellen sind, die in dieser Situation hauptsächlich die Immunantwort bestimmen. Intravenös gespritzte Antigene dagegen erreichen sehr schnell mit dem Blutstrom die Milz, und dort zuerst die Marginalzone. Bei intravenöser Applikation von TI-2-Antigenen bestimmen daher hauptsächlich die MZ B-Zellen die Immunantwort.

Hier wurde mittels ELISA bestätigt, daß, wie auch schon früher gezeigt (Otipoby et al. 1996; Nitschke et al. 1997), die Immunantwort gegen das TI2 Antigen TNP-Ficoll in CD22^{-/-} Mäusen bei intraperitonealer Applikation gegenüber Wildtyp-Mäusen ca. 2 fach reduziert ist. Darüber hinaus wurde gezeigt, daß bei Injektion der gleichen Menge TNP-Ficoll in die Schwanzvene die Immunantwort signifikant stärker reduziert war, nämlich 3-4 fach. Die Verringerung der MZ B Zellen liefert eine gute Erklärung für diese Beobachtung. Die wichtige Rolle der MZ B-Zellen bei intravenöser Applikation von Antigen wurde durch Immunhistochemische Experimente von T. Samardzic und Thomas Wirth unterstrichen. Für das hier verwendete TI2-Antigen TNP-Ficoll wurde demonstriert, daß es bei intravenöser Injektion sehr effizient in der Marginalzone von Wildtyp, aber nicht von CD22^{-/-} Mäusen festgehalten wird (Samardzic et al. 2002).

Die Abhängigkeit der Lokalisation von intravenös injiziertem TNP-Ficoll in der Marginalzone von MZ B-Zellen, sowie der Mechanismus der Retention wurde von Guinamard et al. untersucht. In Pyk-2 defizienten Mäusen, die keine MZ B-Zellen besitzen, wurde TNP-Ficoll, wie in der Arbeit von Samardzic et al., nicht in der Marginalzone festgehalten. Darüber hinaus wurde hier mit Hilfe von Knockout-Mäusen demonstriert, daß die Retention von TNP-Ficoll durch MZ B-Zellen sowohl von der Komplement-Komponente C3d, als auch vom Komplement-Rezeptor CR1/2 (CD21/35) abhängt. MZ B-Zellen exprimieren, wie erwähnt, CD21 (den Komplement-Rezeptor 1) besonders hoch. Die Interpretation dieser Beobachtung ist, daß an TNP-Ficoll gebundenes C3d über CD21 die Bindung des Antigens an MZ B-Zellen vermittelt. Antigen-C3d Komplexe könnten im Zuge dieses Prozesses den B-Zell Rezeptor mit CD19 verbinden, was die Schwelle der Signalinduktion deutlich herabsetzen würde (Guinamard et al. 2000).

Insgesamt konnte in unseren Experimenten gezeigt werden, daß das MZ B-Zell Kompartiment in CD22^{-/-} Mäusen 3-4 fach reduziert ist. Ergebnisse aus Immunisierungsexperimenten deuteten außerdem auf die Reduktion der MZ B-Zellen als eine mögliche Erklärung für die reduzierten TI2-Immunantworten in CD22^{-/-} Mäusen hin.

5. Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung von Aspekten der Funktion von CD22, einem B-Zell spezifischen Transmembran-Rezeptor der Siglec-Familie (Sialinsäure-bindende Immunglobulin-ähnliche Lectine). Mit der äußersten der 7 extrazellulären Ig-ähnlichen Domänen kann CD22 spezifisch mit α 2,6-Sialinsäure interagieren. In der cytoplasmatischen Domäne von CD22 befinden sich 6 konservierte Tyrosine, 3 davon in ITIMs (Immunrezeptor tyrosinhaltige inhibitorischen Motiven). Nach Kreuzvernetzung des B-Zell Rezeptors wird CD22 tyrosinphosphoryliert. Die cytosolische Tyrosin-Phosphatase SHP-1 bindet in der Folge an die phosphorylierten ITIMs, wird aktiviert, und inhibiert das BCR Ca^{2+} -Signal. Gleichzeitig binden jedoch auch positive Modulatoren des BCR-Signals (Lyn, Syk, PLC γ PI3K, und Grb-2) an CD22, deren Rolle im Zusammenhang mit CD22 bislang ungeklärt ist.

1. In einem Hauptteil der Arbeit sollten zwei Knockin Mausmodelle generiert werden. Das eine Mausmodell (CD22-ITIM-KO) sollte zerstörte ITIM-Motive enthalten. Bei dem anderen (CD22-Tailless) sollte die gesamte cytoplasmatische Domäne von CD22 fehlen. Beide Modelle sollten der Untersuchung der Rolle der an CD22 bindenden positiven Modulatoren des BCR-Signals, und des Zusammenhangs zwischen Signaltransduktion und Ligandenbindung in vivo dienen. Die Klonierung der Targeting-Vektoren für CD22-ITIM-KO (pCD22-ITIM-KO) und CD22-Tailless (pCD22-Tailless) wurde abgeschlossen. Mit Hilfe ebenfalls klonierter Kontrollvektoren wurden PCRs zur Identifizierung homolog rekombinanter ES-Zell Klone etabliert. Für beide Targeting-Konstrukte wurden nach Transfektion von C57BL/6 ES-Zellen homolog rekombinante Klone erhalten, und mittels Southern Blot und Sequenzierung der eingeführten Mutationen vollständig charakterisiert. Nach Cre/lox-vermittelter Deletion der Selektionskassette des Targeting-Konstrukts folgte Injektion voll charakterisierter CD22-ITIM-KO Klone in BALB/c-Blastozysten. Es wurden 5 chimäre Tiere erhalten, von denen keines die Mutationen durch die Keimbahn weitergab. Transfektionen der C57BL/6 Targeting-Konstrukte in anderen, nicht-isogenen ES-Zell Linien ergaben keine homologen Rekombinanten. Das Auffinden der genomischen Sequenz von CD22 in einer Internet-Datenbank ermöglichte die Verlängerung von pCD22-ITIM-KO um ca. 4 kb mit 129/ola-DNA. Eine Transfektion dieses neuen Konstruktes in eine 129/ola ES-Zelllinie ergab keine homologen Rekombinanten. Jedoch öffnet die nun bekannte genomische CD22-Sequenz den Weg zu einfacher Neukonstruktion von pCD22-ITIM-KO mit 129/ola-DNA, oder zu einer Veränderung und Verbesserung der vorhandenen C57BL/6-Vektoren.

2. Zur Untersuchung der Auswirkung der zerstörten ITIMs auf Tyrosinphosphorylierung und SHP-1 Assoziation von CD22 in vitro in einer Zelllinie wurde ein CD22-ITIM-KO-Expressionsvektor konstruiert, und Sialyltransferase/CD22-ITIM-KO Doppeltransfektanten der Plasmozytom-Zelllinie J558L gewonnen. CD22-ITIM-KO wurde nach BCR-Stimulation nicht tyrosinphosphoryliert, SHP-1 konnte entsprechend nicht mit CD22-ITIM-KO assoziieren. Die Ergebnisse zeigen die Funktionalität des CD22-ITIM-KO Konstrukts hinsichtlich ITIM-Phosphorylierung und SHP-1 Bindung. Weiterhin zeigten die Ergebnisse, daß die ITIM-Tyrosine wichtig für die Phosphorylierung der nicht-ITIM-Tyrosine sind.

3. Interaktion von CD22 mit α 2,6-Sialinsäure auf der selben Zelloberfläche (in Cis) spielt eine wichtige Rolle bei der Zell-Zell-Interaktion und bei der intrazellulären Signaltransduktion. In dieser Arbeit wurden erstmals mittels Durchflußcytometrie B-Zellen mit CD22, dessen Liganden-Bindungsstelle nicht durch endogene α 2,6-Sialinsäure besetzt ist (demaskiertes CD22), identifiziert. Ca. 10,5% aller B220⁺ Milzzellen von Wildtyp-Mäusen, aber nur ca. 4,5% der B220⁺ Milzzellen aus CD22^{-/-} Mäusen waren in der Lage, exogene α 2,6-Sialinsäure zu binden. Dieser Effekt ist zum Großteil auf CD22 zurückzuführen. Genauere FACS-Analyse zeigte, daß Zellen mit demaskiertem CD22 in der Fraktion der Transitionalen B-Zellen Typ 2

(T2-Zellen) angereichert sind, und Zeichen von Aktivierung (B7.2, CD25, CD69) zeigen. In Übereinstimmung damit führte in vitro Aktivierung von B-Zellen mit LPS oder IL4 zu CD22-abhängiger Demaskierung.

4. FACS-Färbungen zeigten, daß das Marginalzonen (MZ) B-Zell Kompartiment in CD22^{-/-}-Mäusen um ca. 70-80% gegenüber wt-Mäusen verkleinert ist. In Bestätigung früherer Arbeiten war die Immunantwort gegen i.p.-injizierte Thymusunabhängige Antigene Typ 2 (TI2-Antigene) in CD22^{-/-} Mäusen 2-fach reduziert. Die Antwort war jedoch signifikant stärker reduziert (3-4-fach), wenn die gleiche Antigen-Menge i.v.-injiziert wurde, eine Situation, in der bevorzugt die MZ B-Zellen der Milz in Kontakt mit im Blutstrom transportierten Antigenen kommen. Es ist wahrscheinlich, daß die bekannte Defizienz in TI2-Immunantworten in CD22^{-/-} Mäusen auf die verringerte MZ B-Zell Anzahl zurückzuführen ist.

6. Summary

Aim of this thesis was to investigate aspects of the function of CD22, a B-cell specific member of the Siglec-family (sialic acid binding immunoglobulin-like lectins). CD22 can specifically bind α 2,6-sialic acid with the outermost of its 7 extracellular Ig-domains. There are 6 conserved tyrosine residues in the cytoplasmic domain, 3 of which lie within ITIMs (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs). Following BCR engagement, CD22 becomes tyrosine-phosphorylated. Consecutively, the cytosolic tyrosin-phosphatase SHP-1 binds to the phosphorylated ITIMs, becomes activated and inhibits the BCR-signal. There are also some positive modulators of the BCR-signal which bind to CD22 (Lyn, Syk, PLC γ PI3K, und Grb-2). The role of these molecules in the context of CD22 remains to be elucidated.

1. One main goal of this work was the generation of two new knockin mouse lines. In the first line (CD22-ITIM-KO), the ITIMs of CD22 were to be destroyed. A second line in which CD22 lacks its cytoplasmic tail was to be generated (CD22-Tailless). Both models were supposed to serve the *in vivo* investigation of the role of the positive modulators of the BCR-signal and the interrelation of CD22 signaling and ligand binding. Cloning of the targeting vectors pCD22-ITIM-KO and pCD22-tailless was completed. Using control vectors, which were also cloned, screening-PCRs for the identification of homologous recombined ES-cell clones were established. C57BL/6 ES-cells were transfected with the targeting constructs, and homologous recombinants were identified with PCR and Southern blot. The introduced mutations were confirmed by sequencing. Following cre/lox-mediated deletion of the selection cassette, fully characterised CD22-ITIM-KO clones were injected into BALB/c-blastocysts. Five chimaeras were obtained, none of which transmitted the mutations through the germline. No homologous recombinants were obtained upon injection of the C57BL/6 targeting constructs into other, non-isogenic ES-cell lines. Finding of the genomic sequence of murine CD22 in a database made it possible to extend pCD22-ITIM-KO by 4 kb with DNA from a 129/ola mouse strain. The new construct was used to transfect 129/ola ES-cells, which are generally known to be karyotypically more stable than C57BL/6 ES-cells. No homologous recombinants were obtained. The now known sequence of the CD22 gene will make it possible to reconstruct pCD22-ITIM-KO based on 129-DNA or to modify and improve the already existing C57BL/6-constructs.

2. To investigate the consequences of the destroyed ITIMs on tyrosine-phosphorylation and SHP-1 association of CD22 *in vitro*, a CD22-ITIM-KO expression-vector was constructed and sialyl-transferase/CD22-ITIM-KO double-transfectants of the murine plasmocytoma-line J558L were generated. CD22 tyrosine-phosphorylation after BCR-stimulation was completely abolished in CD22-ITIM-KO transfectants. Accordingly, SHP-1 couldn't associate with CD22-ITIM-KO. The results prove the functionality of the CD22-ITIM-KO construct with respect to ITIM-phosphorylation and binding of SHP-1. Furthermore the results show that the ITIM-tyrosines are also important for the phosphorylation of the non-ITIM-tyrosines.

3. Interaction of CD22 with its ligand α 2,6-sialic acid on the surface of the same cell (*in cis*) plays an important role in cell-cell-interaction and intracellular signal transduction. In this work B-cells on which the ligand binding site of CD22 is not occupied by endogenous α 2,6-sialic acid (demasked CD22) were identified by FACS for the first time. 10,5% of all B220⁺ spleen cells from wild type mice, in contrast to only 4,5% B220⁺ spleen cells from CD22^{-/-} mice were able to bind exogenous α 2,6-sialic acid. This effect is mainly due to the presence or absence of CD22, respectively. Detailed FACS-analyses revealed that cells with demasked CD22 are enriched in the fraction of the transitional B-cells type 2 (T2 cells) and show signs of activation. Accordingly, *in vitro* activation of B-cells with LPS or IL4 resulted in CD22-dependent demasking.

4. FACS-analyses showed that the marginal zone (MZ) B-cell compartment in CD22^{-/-} mice is strongly reduced (by about 70-80%). Earlier results showing that the immune response against i.p.-injected TI2-antigens is about 2-fold reduced in CD22^{-/-} mice could be confirmed. However, the response was significantly more impaired (3-4-fold) when the same dose of antigen was applied i.v., a situation where preferentially the MZ B-cells of the spleen come in contact with antigen carried along with the blood flow. The known deficiency in TI2-responses in CD22^{-/-} mice is likely due to non-sufficient MZ B-cell numbers in these animals.

7. Literatur

7.1 Originalarbeiten

Adachi, T., et al. (2001). "SHP-1 requires inhibitory co-receptors to down-modulate B cell antigen receptor-mediated phosphorylation of cellular substrates." J Biol Chem **276**(28): 26648-55.

Ahearn, J. M., et al. (1996). "Disruption of the Cr2 locus results in a reduction in B-1a cells and in an impaired B cell response to T-dependent antigen." Immunity **4**(3): 251-62.

al-Shawi, R., et al. (1991). "The herpes simplex virus type 1 thymidine kinase is expressed in the testes of transgenic mice under the control of a cryptic promoter." Mol Cell Biol **11**(8): 4207-16.

Angata, T., et al. (2001). "Cloning and characterization of a novel mouse Siglec, mSiglec-F: differential evolution of the mouse and human (CD33) Siglec-3-related gene clusters." J Biol Chem **276**(48): 45128-36.

Auerbach, W., et al. (2000). "Establishment and chimera analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-derived mouse embryonic stem cell lines." Biotechniques **29**(5): 1024-8, 1030, 1032.

Bakker, T. R., et al. (2000). "Determination of the affinity for the interaction between CD22 and CD45: Contribution of CD45 protein structure." Immunobiology **203**(1-3): 29.

Baribault, H. and Kemler, R. (1989). "Embryonic stem cell culture and gene targeting in transgenic mice." Mol Biol Med **6**(6): 481-92.

Blasioli, J., et al. (1999). "Definition of the sites of interaction between the protein tyrosine phosphatase SHP-1 and CD22." J Biol Chem **274**(4): 2303-7.

Bleul, C. C., et al. (1998). "B lymphocyte chemotaxis regulated in association with microanatomic localization, differentiation state, and B cell receptor engagement." J Exp Med **187**(5): 753-62.

Blum, J. H., et al. (1993). "Role of the mu immunoglobulin heavy chain transmembrane and cytoplasmic domains in B cell antigen receptor expression and signal transduction." J Biol Chem **268**(36): 27236-45.

Braun, R. E., et al. (1990). "Infertility in male transgenic mice: disruption of sperm development by HSV-tk expression in postmeiotic germ cells." Biol Reprod **43**(4): 684-93.

Brinkman-Van der Linden, E. C., et al. (2000). "Loss of N-glycolylneuraminic acid in human evolution. Implications for sialic acid recognition by siglecs." J Biol Chem **275**(12): 8633-40.

Brown, D. G., et al. (1992). "Criteria that optimize the potential of murine embryonic stem cells for in vitro and in vivo developmental studies." In Vitro Cell Dev Biol **28A**(11-12): 773-8.

Cambier, J. C., et al. (1994). "Signal transduction by the B cell antigen receptor and its coreceptors." Annu Rev Immunol **12**: 457-86.

- Campana, D., et al. (1985).** "Human B cell development. I. Phenotypic differences of B lymphocytes in the bone marrow and peripheral lymphoid tissue." J Immunol **134**(3): 1524-30.
- Campbell, M. A. and Klinman, N. R. (1995).** "Phosphotyrosine-dependent association between CD22 and protein tyrosine phosphatase 1C." Eur J Immunol **25**(6): 1573-9.
- Cariappa, A. and Pillai, S. (2002).** "Antigen-dependent B-cell development." Curr Opin Immunol **14**(2): 241-9.
- Cariappa, A., et al. (2001).** "The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision is regulated by Aiolos, Btk, and CD21." Immunity **14**(5): 603-15.
- Carsetti, R., et al. (1995).** "Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment." J Exp Med **181**(6): 2129-40.
- Carter, R. H., et al. (1991).** "Tyrosine phosphorylation of phospholipase C induced by membrane immunoglobulin in B lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(7): 2745-9.
- Carter, R. H., et al. (1991).** "The CD19 complex of B lymphocytes. Activation of phospholipase C by a protein tyrosine kinase-dependent pathway that can be enhanced by the membrane IgM complex." J Immunol **147**(11): 3663-71.
- Chalupny, N. J., et al. (1995).** "Specific binding of Fyn and phosphatidylinositol 3-kinase to the B cell surface glycoprotein CD19 through their src homology 2 domains." Eur J Immunol **25**(10): 2978-84.
- Chan, C. H., et al. (1998).** "Internalization of the lymphocytic surface protein CD22 is controlled by a novel membrane proximal cytoplasmic motif." J Biol Chem **273**(43): 27809-15.
- Chan, V. W., et al. (1998).** "Defective negative regulation of antigen receptor signaling in Lyn- deficient B lymphocytes." Curr Biol **8**(10): 545-53.
- Chan, V. W., et al. (1997).** "Characterization of the B lymphocyte populations in Lyn-deficient mice and the role of Lyn in signal initiation and down-regulation." Immunity **7**(1): 69-81.
- Coggeshall, K. M. (1998).** "Inhibitory signaling by B cell Fc gamma RIIb." Curr Opin Immunol **10**(3): 306-12.
- Coggeshall, K. M. (2000).** "Positive and negative signaling in B lymphocytes." Curr Top Microbiol Immunol **245**(1): 213-60.
- Cornall, R. J., et al. (1998).** "Polygenic autoimmune traits: Lyn, CD22, and SHP-1 are limiting elements of a biochemical pathway regulating BCR signaling and selection." Immunity **8**(4): 497-508.
- Crocker, P. R. and Varki, A. (2001).** "Siglecs in the immune system." Immunology **103**(2): 137-45.
- Cyster, J. G. and Goodnow, C. C. (1995).** "Protein tyrosine phosphatase 1C negatively regulates antigen receptor signaling in B lymphocytes and determines thresholds for negative selection." Immunity **2**(1): 13-24.
- Cyster, J. G. and Goodnow, C. C. (1997).** "Tuning antigen receptor signaling by CD22: integrating cues from antigens and the microenvironment." Immunity **6**(5): 509-17.

D'Ambrosio, D., et al. (1996). "Distinct mechanisms mediate SHC association with the activated and resting B cell antigen receptor." Eur J Immunol **26**(8): 1960-5.

Damen, J. E., et al. (1996). "The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetrakisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5- triphosphate 5-phosphatase." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(4): 1689-93.

de Wind, N., et al. (1995). "Inactivation of the mouse Msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer." Cell **82**(2): 321-30.

Deckert, M., et al. (1996). "Functional and physical interactions of Syk family kinases with the Vav proto-oncogene product." Immunity **5**(6): 591-604.

Dempsey, P. W., et al. (1996). "C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity." Science **271**(5247): 348-50.

Desiderio, S. (1997). "Role of Btk in B cell development and signaling." Curr Opin Immunol **9**(4): 534-40.

Doody, G. M., et al. (1995). "A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP." Science **269**(5221): 242-4.

Dorken, B., et al. (1986). "HD39 (B3), a B lineage-restricted antigen whose cell surface expression is limited to resting and activated human B lymphocytes." J Immunol **136**(12): 4470-9.

Dustin, L. B., et al. (1999). "Expression of dominant-negative src-homology domain 2-containing protein tyrosine phosphatase-1 results in increased Syk tyrosine kinase activity and B cell activation." J Immunol **162**(5): 2717-24.

Engel, P., et al. (1995). "Identification of the ligand-binding domains of CD22, a member of the immunoglobulin superfamily that uniquely binds a sialic acid-dependent ligand." J Exp Med **181**(4): 1581-6.

Engel, P., et al. (1995). "Abnormal B lymphocyte development, activation, and differentiation in mice that lack or overexpress the CD19 signal transduction molecule." Immunity **3**(1): 39-50.

Engels, N., et al. (2001). "Association of SLP-65/BLNK with the B cell antigen receptor through a non-ITAM tyrosine of Ig-alpha." Eur J Immunol **31**(7): 2126-34.

Erickson, L. D., et al. (1996). "Differential expression of CD22 (Lyb8) on murine B cells." Int Immunol **8**(7): 1121-9. abs.html.

Fedorov, L. M., et al. (1997). "A comparison of the germline potential of differently aged ES cell lines and their transfected descendants." Transgenic Res **6**(3): 223-31.

Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1983). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity." Anal Biochem **132**(1): 6-13.

Floyd, H., et al. (2000). "A novel subset of murine B cells that expresses unmasked forms of CD22 is enriched in the bone marrow: implications for B-cell homing to the bone marrow." Immunology **101**(3): 342-7.

Fukui, Y., et al. (2001). "Haematopoietic cell-specific CDM family protein DOCK2 is essential for lymphocyte migration." Nature **412**(6849): 826-31.

Ganju, R. K., et al. (2000). "Beta-chemokine receptor CCR5 signals through SHP1, SHP2, and Syk." J Biol Chem **275**(23): 17263-8.

Girkontaite, I., et al. (2001). "Lsc is required for marginal zone B cells, regulation of lymphocyte motility and immune responses." Nat Immunol **2**(9): 855-62.

Gold, M. R., et al. (1991). "Tyrosine phosphorylation of components of the B-cell antigen receptors following receptor crosslinking." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(8): 3436-40.

Guinamard, R., et al. (2000). "Absence of marginal zone B cells in Pyk-2-deficient mice defines their role in the humoral response." Nat Immunol **1**(1): 31-6.

Hanasaki, K., et al. (1995). "Binding of human plasma sialoglycoproteins by the B cell-specific lectin CD22. Selective recognition of immunoglobulin M and haptoglobin." J Biol Chem **270**(13): 7543-50.

Hanasaki, K., et al. (1995). "CD22-mediated cell adhesion to cytokine-activated human endothelial cells. Positive and negative regulation by alpha 2-6-sialylation of cellular glycoproteins." J Biol Chem **270**(13): 7533-42.

Hanasaki, K., et al. (1994). "Cytokine-induced beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase in human endothelial cells mediates alpha 2,6-sialylation of adhesion molecules and CD22 ligands." J Biol Chem **269**(14): 10637-43.

Hasty, P., et al. (1991). "The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells." Mol Cell Biol **11**(11): 5586-91.

Hayakawa, K., et al. (1999). "Positive selection of natural autoreactive B cells." Science **285**(5424): 113-6.

Hof, P., et al. (1998). "Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2." Cell **92**(4): 441-50.

Hombach, J., et al. (1988). "A novel 34-kd protein co-isolated with the IgM molecule in surface IgM-expressing cells." Embo J **7**(11): 3451-6.

Ioffe, E., et al. (1995). "WW6: an embryonic stem cell line with an inert genetic marker that can be traced in chimeras." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(16): 7357-61.

Janeway (1999). Immunobiology.

Jin, L., et al. (2002). "Sialic Acid Binding Domains of CD22 Are Required For Negative Regulation of B Cell Receptor Signaling." J Exp Med **195**(9): 1199-1205.

Justement, L. B. (2000). "Signal transduction via the B-cell antigen receptor: the role of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases." Curr Top Microbiol Immunol **245**(1): 1-51.

Kabak, S., et al. (2002). "The direct recruitment of BLNK to immunoglobulin alpha couples the B-cell antigen receptor to distal signaling pathways." Mol Cell Biol **22**(8): 2524-35.

Kelm, S., et al. (2002). "The Ligand-binding Domain of CD22 Is Needed for Inhibition of the B Cell Receptor Signal, as Demonstrated by a Novel Human CD22-specific Inhibitor Compound." J Exp Med **195**(9): 1207-1213.

Kelm, S. and Schauer, R. (1997). "Sialic acids in molecular and cellular interactions." Int Rev Cytol **175**: 137-240.

Kelm, S., et al. (1994). "Modifications of cell surface sialic acids modulate cell adhesion mediated by sialoadhesin and CD22." Glycoconj J **11**(6): 576-85.

Kim, K. M., et al. (1993). "Signalling function of the B-cell antigen receptors." Immunol Rev **132**: 125-46.

Kontgen, F., et al. (1993). "Targeted disruption of the MHC class II Aa gene in C57BL/6 mice." Int Immunol **5**(8): 957-64.

Kraus, M., et al. (2001). "Interference with immunoglobulin (Ig)alpha immunoreceptor tyrosine- based activation motif (ITAM) phosphorylation modulates or blocks B cell development, depending on the availability of an Igbeta cytoplasmic tail." J Exp Med **194**(4): 455-69.

Kraus, M., et al. (1999). "Ig-alpha cytoplasmic truncation renders immature B cells more sensitive to antigen contact." Immunity **11**(5): 537-45.

Kuehn, M. R., et al. (1987). "A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice." Nature **326**(6110): 295-8.

Kumanogoh, A., et al. (2000). "Identification of CD72 as a lymphocyte receptor for the class IV semaphorin CD100: a novel mechanism for regulating B cell signaling." Immunity **13**(5): 621-31.

Kumar, S. and Simons, J. P. (1993). "The effects of terminal heterologies on gene targeting by insertion vectors in embryonic stem cells." Nucleic Acids Res **21**(7): 1541-8.

Kurosaki, T., et al. (1995). "Role of the Syk autophosphorylation site and SH2 domains in B cell antigen receptor signaling." J Exp Med **182**(6): 1815-23.

Lajaunias (2002). "Differentially Regulated Expression and Function of CD22 in Activated B-1 and B-2 Lymphocytes." manuscript in preparation.

Lam, K. P., et al. (1997). "In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death." Cell **90**(6): 1073-83.

Lane, P. J., et al. (1986). "Differences in the recruitment of virgin B cells into antibody responses to thymus-dependent and thymus-independent type-2 antigens." Eur J Immunol **16**(12): 1569-75.

Law, C. L., et al. (1995). "Ig domains 1 and 2 of murine CD22 constitute the ligand-binding domain and bind multiple sialylated ligands expressed on B and T cells." J Immunol **155**(7): 3368-76.

Ledermann, B. and Burki, K. (1991). "Establishment of a germ-line competent C57BL/6 embryonic stem cell line." Exp Cell Res **197**(2): 254-8.

Leprince, C., et al. (1993). "CD22 associates with the human surface IgM-B-cell antigen receptor complex." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(8): 3236-40.

Li, X., et al. (1997). "Role of CD19 tyrosine 391 in synergistic activation of B lymphocytes by coligation of CD19 and membrane Ig." J Immunol **158**(12): 5649-57.

Liu, X., et al. (1997). "Trisomy eight in ES cells is a common potential problem in gene targeting and interferes with germ line transmission." Dev Dyn **209**(1): 85-91.

Loder, F., et al. (1999). "B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals." J Exp Med **190**(1): 75-89.

Longo, L., et al. (1997). "The chromosome make-up of mouse embryonic stem cells is predictive of somatic and germ cell chimaerism." Transgenic Res **6**(5): 321-8.

Martin, F. and Kearney, J. F. (2000). "B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a "natural immune memory"." Immunol Rev **175**: 70-9.

Martin, F. and Kearney, J. F. (2000). "Positive selection from newly formed to marginal zone B cells depends on the rate of clonal production, CD19, and btk." Immunity **12**(1): 39-49.

Martin, F., et al. (2001). "Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens." Immunity **14**(5): 617-29.

Martinez, E. (1996). Konstruktion von zwei "gene targeting"-Vektoren zur in vivo Mutagenese von D22. Max-Planck-Institut für Immunbiologie. Freiburg im Breisgau, Albert-Ludwigs-Universität.

Mary, C., et al. (2000). "Dysregulated expression of the Cd22 gene as a result of a short interspersed nucleotide element insertion in Cd22a lupus-prone mice." J Immunol **165**(6): 2987-96.

Michnoff, C. H., et al. (1994). "Mutations within the NH₂-terminal transmembrane domain of membrane immunoglobulin (Ig) M alters Ig alpha and Ig beta association and signal transduction." J Biol Chem **269**(39): 24237-44.

Mizuno, K., et al. (2000). "Src homology region 2 (SH₂) domain-containing phosphatase-1 dephosphorylates B cell linker protein/SH₂ domain leukocyte protein of 65 kDa and selectively regulates c-Jun NH₂-terminal kinase activation in B cells." J Immunol **165**(3): 1344-51.

Molina, H., et al. (1996). "Markedly impaired humoral immune response in mice deficient in complement receptors 1 and 2." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(8): 3357-61.

Nagai, K., et al. (1995). "Tyrosine phosphorylation of Shc is mediated through Lyn and Syk in B cell receptor signaling." J Biol Chem **270**(12): 6824-9.

Nagy, A., et al. (1993). "Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(18): 8424-8.

Nishizumi, H., et al. (1998). "A double-edged kinase Lyn: a positive and negative regulator for antigen receptor-mediated signals." J Exp Med **187**(8): 1343-8.

Nitschke, L., et al. (1997). "CD22 is a negative regulator of B-cell receptor signalling." Curr Biol **7**(2): 133-43.

Nitschke, L., et al. (1999). "Identification of CD22 ligands on bone marrow sinusoidal endothelium implicated in CD22-dependent homing of recirculating B cells." J Exp Med **189**(9): 1513-8.

Noben-Trauth, N., et al. (1996). "Efficient targeting of the IL-4 gene in a BALB/c embryonic stem cell line." Transgenic Res **5**(6): 487-91.

O'Keefe, T. L., et al. (1999). "Deficiency in CD22, a B cell-specific inhibitory receptor, is sufficient to predispose to development of high affinity autoantibodies." J Exp Med **189**(8): 1307-13.

O'Keefe, T. L., et al. (1996). "Hyperresponsive B cells in CD22-deficient mice." Science **274**(5288): 798-801.

Oliver, A. M., et al. (1999). "IgM^{high}CD21^{high} lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells." J Immunol **162**(12): 7198-207.

Ono, M., et al. (1997). "Deletion of SHIP or SHP-1 reveals two distinct pathways for inhibitory signaling." Cell **90**(2): 293-301.

Otipoby, K. L., et al. (1996). "CD22 regulates thymus-independent responses and the lifespan of B cells." Nature **384**(6610): 634-7.

Otipoby, K. L., et al. (2001). "CD22 regulates B cell receptor-mediated signals via two domains that independently recruit Grb2 and SHP-1." J Biol Chem **276**(47): 44315-22.

Park, H., et al. (1996). "Regulation of Btk function by a major autophosphorylation site within the SH3 domain." Immunity **4**(5): 515-25.

Peaker, C. J. and Neuberger, M. S. (1993). "Association of CD22 with the B cell antigen receptor." Eur J Immunol **23**(6): 1358-63.

Pezzutto, A., et al. (1987). "Amplification of human B cell activation by a monoclonal antibody to the B cell-specific antigen CD22, Bp 130/140." J Immunol **138**(1): 98-103.

Pezzutto, A., et al. (1988). "Role of the CD22 human B cell antigen in B cell triggering by anti-immunoglobulin." J Immunol **140**(6): 1791-5.

Poe, J. C., et al. (2000). "CD22 forms a quaternary complex with SHIP, Grb2, and Shc. A pathway for regulation of B lymphocyte antigen receptor-induced calcium flux." J Biol Chem **275**(23): 17420-7.

Powell, L. D., et al. (1995). "Characterization of sialyloligosaccharide binding by recombinant soluble and native cell-associated CD22. Evidence for a minimal structural recognition motif and the potential importance of multisite binding." J Biol Chem **270**(13): 7523-32.

Powell, L. D., et al. (1993). "Natural ligands of the B cell adhesion molecule CD22 beta carry N-linked oligosaccharides with alpha-2,6-linked sialic acids that are required for recognition." J Biol Chem **268**(10): 7019-27.

Rao, A., et al. (1997). "Transcription factors of the NFAT family: regulation and function." Annu Rev Immunol **15**: 707-47.

Razi, N. and Varki, A. (1998). "Masking and unmasking of the sialic acid-binding lectin activity of CD22 (Siglec-2) on B lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(13): 7469-74.

Reif, K., et al. (2002). "Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position." Nature **416**(6876): 94-9.

Reth, M. and Wienands, J. (1997). "Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor." Annu Rev Immunol **15**: 453-79.

Rickert, R. C., et al. (1995). "Impairment of T-cell-dependent B-cell responses and B-1 cell development in CD19-deficient mice." Nature **376**(6538): 352-5.

Robertson (1987). "Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells, a Practical Approach." .

Rudge, E. U., et al. (2002). "Interleukin 4 Reduces Expression of Inhibitory Receptors on B Cells and Abolishes CD22 and FcγRII-mediated B Cell Suppression." J Exp Med **195**(8): 1079-85.

Samardzic, T., et al. (2002). "Reduction of marginal zone B cells in CD22-deficient mice." Eur J Immunol **32**(2): 561-7.

Sato, S., et al. (1996). "CD22 is both a positive and negative regulator of B lymphocyte antigen receptor signal transduction: altered signaling in CD22-deficient mice." Immunity **5**(6): 551-62.

Saxton, T. M., et al. (1994). "B cell antigen receptor cross-linking induces phosphorylation of the p21ras oncoprotein activators SHC and mSOS1 as well as assembly of complexes containing SHC, GRB-2, mSOS1, and a 145-kDa tyrosine- phosphorylated protein." J Immunol **153**(2): 623-36.

Schulte, R. J., et al. (1992). "Tyrosine phosphorylation of CD22 during B cell activation." Science **258**(5084): 1001-4.

Schuster-Gossler, K., et al. (2001). "Use of coisogenic host blastocysts for efficient establishment of germline chimeras with C57BL/6J ES cell lines." Biotechniques **31**(5): 1022-4, 1026.

Seo, S., et al. (2001). "Novel roles for Lyn in B cell migration and lipopolysaccharide responsiveness revealed using anti-double-stranded DNA Ig transgenic mice." J Immunol **166**(6): 3710-6.

Sgroi, D., et al. (1995). "Regulation of CD45 engagement by the B-cell receptor CD22." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(9): 4026-30.

Siminovitch, K. A. and Neel, B. G. (1998). "Regulation of B cell signal transduction by SH2-containing protein- tyrosine phosphatases." Semin Immunol **10**(4): 329-47.

Smit, L., et al. (1994). "B cell antigen receptor stimulation induces formation of a Shc-Grb2 complex containing multiple tyrosine-phosphorylated proteins." J Biol Chem **269**(32): 20209-12.

Smith, K. G., et al. (1998). "Inhibition of the B cell by CD22: a requirement for Lyn." J Exp Med **187**(5): 807-11.

Somani, A. K., et al. (2001). "The SH2 domain containing tyrosine phosphatase-1 down-regulates activation of Lyn and Lyn-induced tyrosine phosphorylation of the CD19 receptor in B cells." *J Biol Chem* **276**(3): 1938-44.

Stamenkovic, I. and Seed, B. (1990). "The B-cell antigen CD22 mediates monocyte and erythrocyte adhesion." *Nature* **345**(6270): 74-7.

Stoddart, A., et al. (1997). "Analysis of murine CD22 during B cell development: CD22 is expressed on B cell progenitors prior to IgM." *Int Immunol* **9**(10): 1571-9.

Su, B. and Karin, M. (1996). "Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression." *Curr Opin Immunol* **8**(3): 402-11.

Takata, M. and Kurosaki, T. (1996). "A role for Bruton's tyrosine kinase in B cell antigen receptor-mediated activation of phospholipase C-gamma 2." *J Exp Med* **184**(1): 31-40.

Tamir, I., et al. (2000). "Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: regulators of B cell signal transduction." *Curr Opin Immunol* **12**(3): 307-15.

te Riele, H., et al. (1992). "Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(11): 5128-32.

Thomas, K. R. and Capecchi, M. R. (1987). "Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells." *Cell* **51**(3): 503-12.

Thomas, K. R., et al. (1992). "High-fidelity gene targeting in embryonic stem cells by using sequence replacement vectors." *Mol Cell Biol* **12**(7): 2919-23.

Tooze, R. M., et al. (1997). "Counterregulation by the coreceptors CD19 and CD22 of MAP kinase activation by membrane immunoglobulin." *Immunity* **7**(1): 59-67.

Torres, R. M. and Hafen, K. (1999). "A negative regulatory role for Ig-alpha during B cell development." *Immunity* **11**(5): 527-36.

Torres, R. M., et al. (1992). "Identification and characterization of the murine homologue of CD22, a B lymphocyte-restricted adhesion molecule." *J Immunol* **149**(8): 2641-9.

Tsubata, T. (1999). "Co-receptors on B lymphocytes." *Curr Opin Immunol* **11**(3): 249-55.

Tuscano, J. M., et al. (1996). "Involvement of p72syk kinase, p53/56lyn kinase and phosphatidylinositol-3 kinase in signal transduction via the human B lymphocyte antigen CD22." *Eur J Immunol* **26**(6): 1246-52.

Tuscano, J. M., et al. (1999). "CD22 cross-linking generates B-cell antigen receptor-independent signals that activate the JNK/SAPK signaling cascade." *Blood* **94**(4): 1382-92.

Tuveson, D. A., et al. (1993). "CD19 of B cells as a surrogate kinase insert region to bind phosphatidylinositol 3-kinase." *Science* **260**(5110): 986-9.

van der Merwe, P. A., et al. (1996). "Localization of the putative sialic acid-binding site on the immunoglobulin superfamily cell-surface molecule CD22." *J Biol Chem* **271**(16): 9273-80.

van Noesel, C. J., et al. (1993). "The CR2/CD19 complex on human B cells contains the src-family kinase Lyn." *Int Immunol* **5**(7): 699-705.

Wang, J. H., et al. (1998). "Aiolos regulates B cell activation and maturation to effector state." Immunity **9**(4): 543-53.

Weng, W. K., et al. (1994). "Signaling through CD19 activates Vav/mitogen-activated protein kinase pathway and induces formation of a CD19/Vav/phosphatidylinositol 3- kinase complex in human B cell precursors." J Biol Chem **269**(51): 32514-21.

Wienands, J. (2000). "The B-cell antigen receptor: formation of signaling complexes and the function of adaptor proteins." Curr Top Microbiol Immunol **245**(1): 53-76.

Wienands, J., et al. (1996). "Evidence for a preformed transducer complex organized by the B cell antigen receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(15): 7865-70.

Wienands, J., et al. (1998). "SLP-65: a new signaling component in B lymphocytes which requires expression of the antigen receptor for phosphorylation." J Exp Med **188**(4): 791-5.

Williams, R. L., et al. (1988). "Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells." Nature **336**(6200): 684-7.

Yohannan, J., et al. (1999). "Analysis of tyrosine phosphorylation-dependent interactions between stimulatory effector proteins and the B cell co-receptor CD22." J Biol Chem **274**(26): 18769-76.

Zhou, L., et al. (2001). "Murine inter-strain polymorphisms alter gene targeting frequencies at the mu opioid receptor locus in embryonic stem cells." Mamm Genome **12**(10): 772-8.

7.2 Publikationsliste

7.2.1 Originalarbeiten aus dieser Doktorarbeit

Samardzic, T., Marinkovic, D., **Danzer, C.-P.**, Gerlach, J., Nitschke, L., Wirth, T. (2002) „Reduction of marginal zone B cells in CD22-deficient mice“, Eur. J. Imm., **32** (2): 561-570

Kelm, S., Gerlach, J., Brossmer, R., **Danzer, C.-P.**, Nitschke, L. (2002) „The ligand-binding domain of CD22 is needed for inhibition of the BCR signal, as demonstrated by a novel human CD22-specific inhibitor compound“, J. Exp. Med., **195**(9): 1207-1213

Collins, B., Blixt, O., Bovin, N., **Danzer, C.-P.**, Chui, D., Marth, J., Nitschke, L., Paulson, J.C. „Constitutively unmasked CD22 on B cells of ST6Gal I knock-out mice: novel sialoside probes for murine CD22“, Glycobiology, akzeptiert

Danzer, C.-P., Collins, B., Paulson, J., Nitschke, L. „Characterisation of B cell Subpopulations with unmasked CD22“, Manuskript in Vorbereitung

7.2.2 Publikationen auf Kongressen/Tagungen

Danzer, C.-P., Ledermann, B., Martinez, E., Nitschke, L. (2000) „Generation of CD22 knockin mice to dissect the role of the signalling domains of the molecule“ Immunobiology **203** (1-3), 66-67, Herbsttagung der Deutschen und der Niederländischen Gesellschaft für Immunologie, Düsseldorf, 29.11.2000 – 2.12.2000, Posterpräsentation

Danzer, C.-P., Samardzic, T., Collins, B., Paulson, J., Wirth, T., Nitschke, L. (2002) „Unmasking of CD22 and the development of marginal zone B cells in CD22^{-/-} mice“, Keystone Symposia Conference „Molecular and Cellular Biology of Leukocyte Regulatory

Receptors“, Tahoe City, Kalifornien, USA, 17.03.2002 – 22.03.2002, Posterpräsentation und Vortrag

Empfänger eines Stipendiums von Keystone Symposia

Gerlach, J., Kelm, S., Brossmer, R., **Danzer, C.-P.**, Nitschke, L. (2002) „The ligand-binding domain of CD22 is needed for inhibition of the BCR-signal, as demonstrated by a novel human CD22-specific inhibitor compound.“, Keystone Symposia Conference „Molecular and Cellular Biology of Leukocyte Regulatory Receptors“, Tahoe City, Kalifornien, USA, 17.03.2002 – 22.03.2002

8. Anhang

8.1 Abkürzungen

APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCR	B-Zell Rezeptor
bio	Biotin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CD	cluster of differentiation: Oberflächenantigene von Leukozyten und Thrombozyten
CHO	Chinesischer-Hamster Ovar
Ci	Curie
CIP	Kälberdarm-Phosphatase
Cy	Cychrome
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EK	Endkonzentration
ELISA	enzyme linked immunosorbent essay
EMFI	embryonaler Fibroblast
ES-Zelle	embryonale Stammzelle
EtOH	Ethanol
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fötale Kälberserum
FITS	Fluoresceinisothiocyanat
GEF	Guanylnukleotid-Austauschfaktor
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
ITAM	Immunrezeptor Tyrosin-haltiges aktivierendes Motiv
ITIM	Immunrezeptor Tyrosin-haltiges inhibierendes Motiv
KF	Klenow-Fragment
LIF	leukaemia inhibitory factor
LPS	Lipopolysaccharid
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MZ	Marginalzone
NeuAc	NeuAc α 2,6lacNAc
NeuGc	NeuGc α 2,6lacNAc
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PALS	periarteriöläre lymphatische Scheide
PBS	phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PH	Pleckstrin-Homologie (Domäne)
PIP	Phosphatidyl-Inositol-Phosphat
PTK	Protein-Tyrosinkinase
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell-Park Memorial Institute (Medium)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH	Src-Homologie (Domäne)
Siglec	Sialinsäure-bindende Immunglobulinähnliche Lectine
T1-Zellen	Transitionale B-Zellen Typ 1
T2-Zellen	Transitionale B-Zellen Typ 1
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TD	thymusabhängig
TE	Tris-EDTA Puffer
TH	Tec-Homologie (Domäne)
T _H	T-Helfer (Zelle)
TI	thymusabhängig
TNP	Trinitrophenyl
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
TSR	template suppressive reagent
U	units (Einheiten)
(v/v)	Volumen/Volumen
(w/v)	Gewicht/Volumen
WT	Wildtyp

8.2 Primersequenzen

CD22ex8seq	5'-CTT TGC TTG CCT CTC CAT CT-3'
CD22ex9seq	5'-GGG TCA CCT CAT CAT CTT CT-3'
CD22ex10seq	5'-CAG GAC AGG ACA GGG ACC AA-3'
tk-3'-1	5'-GAT GGT CCA GAC CCA CGT CA-3'
tk3'-3	5'- GGG AGG CTA ACT GAA ACA CG-3'
CD22in10-1	5'-CCT TGC TGT CTT CCC TTG GT-3'
CD22in10-2	5'-GTC CTG TCC TGG GAG CTG CA-3'
CD22in10-3	5'-CTG TCC CAG AAC TTG CTC TA-3'
CD22in10-4	5'-GGG CTG GGA CAT GAA ATC AC-3'
CD22in10-5	5'-CCC TGT GAC CTG AGT GGA AA-3'
CD22ex10-5 BsuSeq	5'-TCC GCC CAT CTC ACA GTA CA-3'
pcDNA3.1Zeo(+) NotSeq	5'-AAG GCA CAG TCG AGG CTG AT-3'
CD22-15 Mut1	5'-TTT CTC AGA GCT GGT TCA GTT TGG GGC TGG TAA GCG GCC CCA GGC AAA GGA AGA CGT CGA CTT TGT GAC CCT CAA GCA CTG A-3'
CD22-15 Mut2	5'-CAA AGT CGA CGT CTT CCT TTG CCT GGG GCC GCT TAC CAG CCC CAA ACT GAA CCA GCT CTG AGA AAT GGA TGC TCT-3'
CD22-13 Mut1	5'-GTT TTG CAA TAT TAC GCT TTC CAG AGA CTG-3'
CD22-13 Mut2	5'-CGT AAT ATT GCA AAA CTA ACG GTG TCA TC-3'
Amp1	5'-TCT TCA GCA TCT TTT ACT TTC-3'
Amp2	5'-GAA AGT AAA AGA TGC TGA AGA-3'
CD22in10-3'-1	5'-GCA GAG AGA GAG CAT TCT GT-3'
CD22in10-3'-2	5'-CAC GAA GCC TGG TCC TTC TT-3'
YFnes1	5'-CAG GAG GAT GGC AGC ATC CA-3'
YFnes2	5'-GTG CAG GAG GAG CTG AGA GT-3'
YFnes3	5'-CAA ACA AGG CCT CGC CTC CT-3'
YFnes4	5'-CCA CTC CCT AGG CCA GAC AT-3'

YFnes5	5'-GGT GCC TCT AGG GAC TGA TT-3'
OLneo2a	5'-CGG AGA ACC TGC GTG CAA TC-3'
OLneo5	5'-GCC GAT TGT CTG TTG TGC CC-3'
OLneo4	5'-GCC GAA TAG CCT CTC CAC CC-3'
OLneo7	5'-GTC TCG TCC TGC AGT TCA TT-3'
OLneo8	5'-CGG ACA GGT CGG TCT TGA CA-3'
tk-3'-7	5'-CCA CCC CCG GCT CCA TAC-3'
tk-3'-6	5'-AGG GCT GGC ACT CTG TCG-3'
tk-3'-5	5'-GGG CGT TGC GTG GGG TCT GGT-3'
NTLINK	5'-AGC TTG CGC TCG AGC GCA-3'
CD22in11/12-5	5'-GAA AAA GTG AGC CCT GTC TG-3'
CD22in12/13-5	5'-TGG AGA AGC ACT GAG AAA AG-3'
CD22 in13/14-3	5'-AAG CCT TGT ACA GGT CCG GC-3'
CD22in13/14-5	5'-CAT TAG CTG CTG CTC TGG TG-3'
CD22ex12-5 Stop	5'-AAA ATT GAA GGA TCC AGA GCT TTT TTG TG-3'
CD22ex12-3 Stop	5'-GCT CTG GAT CCT TCA ATT TTC CTG AAG CCC-3'
CD22ex12-AS	5'-CTC GTC TTA CCT TTT TGTT CCT CA-3'
CD22ex13-3	5'- GAG CGT GTC ACT CTC TGG AA-3'
CD22ex14-5	5'-AGC AAC ACA GGC TCC TCC TC-3'
CD22-3D	5'-ATG TGA ATC CGA GCT GCC CG-3'
CD22-3Bam	5'-GGA GGA TCA CCA GCC AGA GAA GGC C-3'
CD22-3Sal	5'- GCA GAA GCC TAG TCC CAA-3'

8.3 Vektorkarten

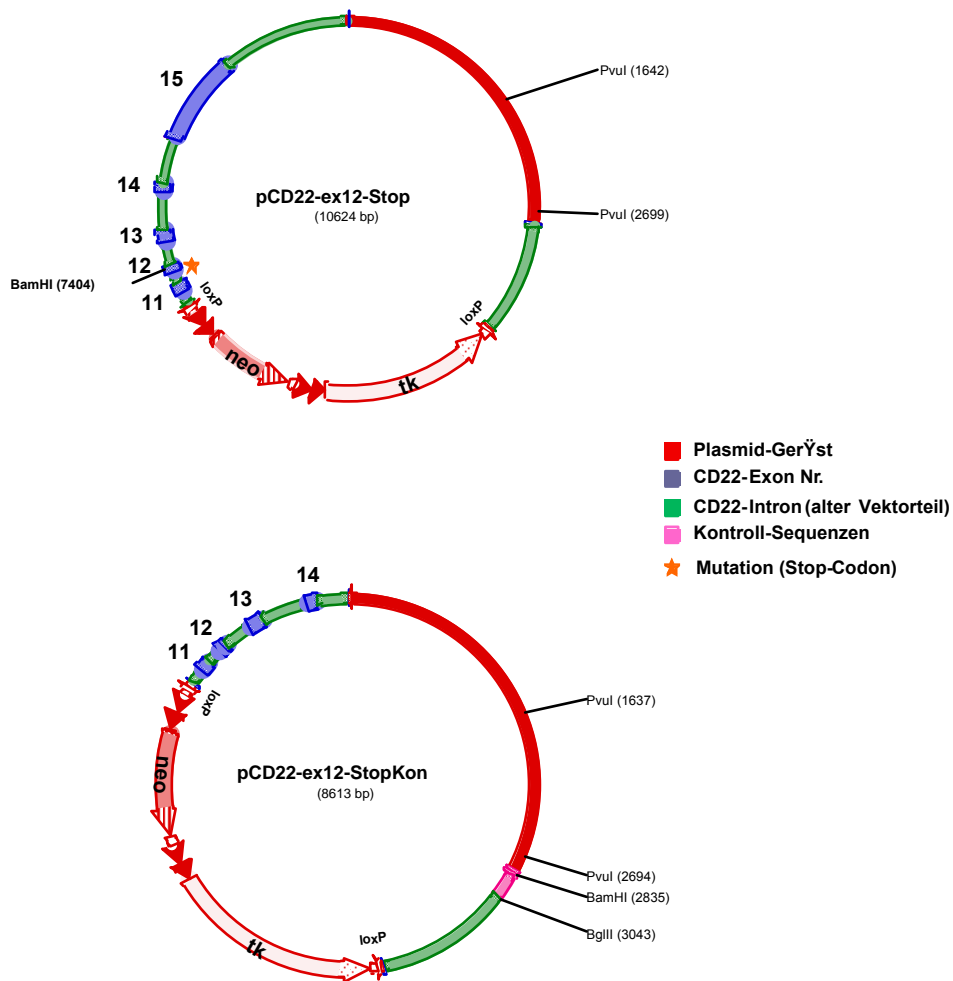


Abb. 31: Vektoren pCD22-ex12-Stop und der zugehörige Vektor zur Etablierung der Screening-PCR pCD22-ex12-StopKon. Vor Transfektion in ES-Zellen wurden die Vektoren jeweils PvuI-linearisiert. Sequenzen, die im Kontrollvektor pCD22-ex12-StopKon, aber nicht in pCD22-ex12-Stop vorhanden sind (Kontroll-Sequenzen) sind in Magenta dargestellt.

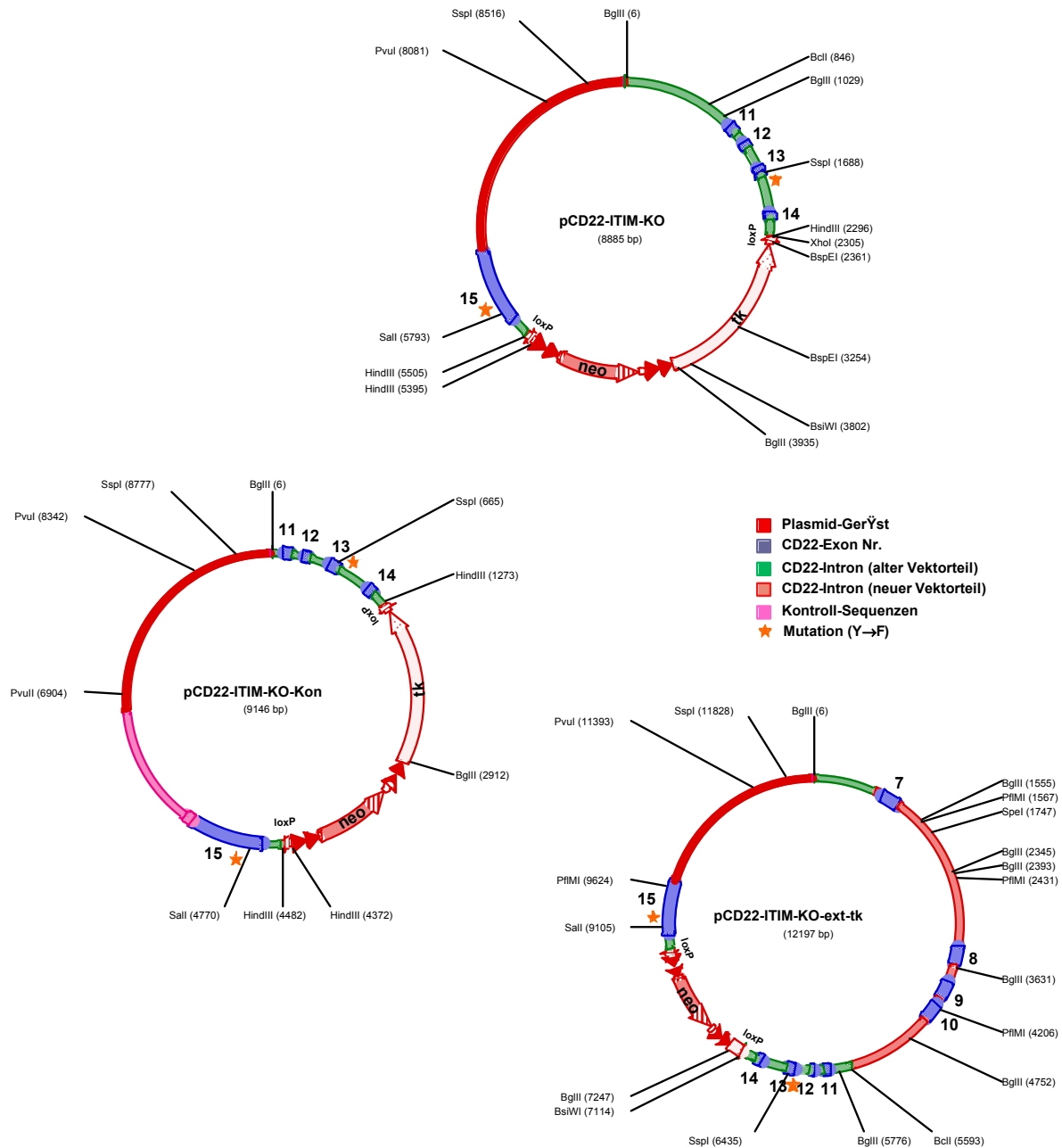


Abb. 32: Vektoren pCD22-ITIM-KO und der zugehörige Vektor zur Etablierung der Screening-PCR pCD22-ITIM-KO-Kon. Vor Transfektion in ES-Zellen wurden die Vektoren jeweils PvuI-linearisiert. Sequenzen, die im Kontrollvektor PCR pCD22-ITIM-KO-Kon, aber nicht in pCD22-ITIM-KO vorhanden sind (Kontroll-Sequenzen) sind in Magenta dargestellt. Mit dem Ziel, homologe Rekombination auch in nicht-isogenen ES-Zelllinien zu erreichen, wurde pCD22-ITIM-KO mit 129/ola-Sequenzen am 5'-Ende von CD22 erweitert. Um außerdem eine kürzere Zeit in Kultur bis zur Injektion zu ermöglichen, wurde das HSV-tk-Gen größtenteils deletiert. Der aus diesen Veränderungen entstandene Vektor pCD22-ITIM-KO-ext-tk ist ebenfalls dargestellt.

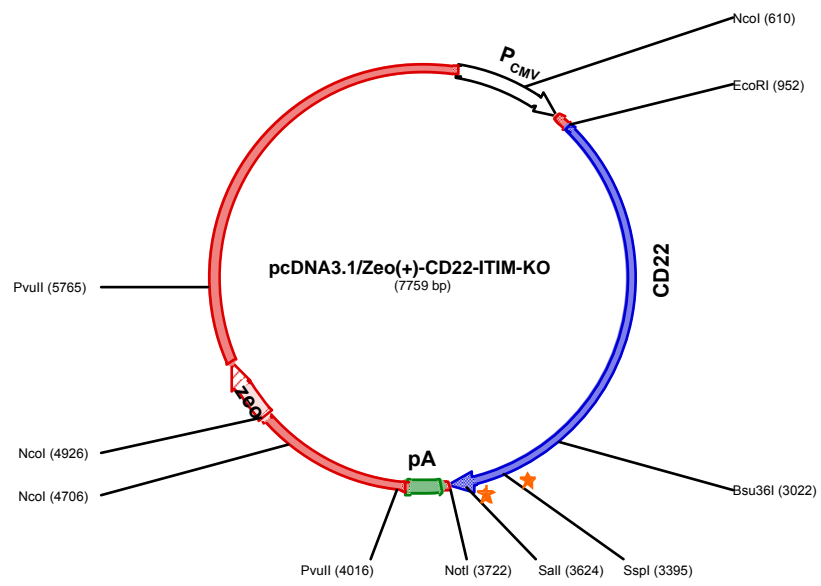


Abb. 33: Vektor pcDNA3.1/Zeo(+)-CD22-ITIM-KO zur Expression von CD22-ITIM-KO in Zelllinien

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Claus-Peter Danzer
geb. am 14.02.1970 in Mannheim-Neckarau

Schule

09.76 - 06.89

Adalbert-Stifter Grundschule Kaufbeuren-Neugablonz, Staatliches Gymnasium Kaufbeuren, Abitur

Zivildienst

09.89 - 11.90

Wertachtal-Werkstätten für Behinderte in Kaufbeuren

Studium

11.91 - 09.93

Humanmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität München, Ärztliche Vorprüfung (Physikum) Note gut (2,0)

11.93 - 04.97

Studium der Biochemie, Universität Bayreuth, 21.04.97 Diplom sehr gut (1,14) mit Auszeichnung

Diplomarbeit: Konstruktion eines Expressionssystems für das Vpu-Protein aus dem menschlichen Immunschwächevirus Typ-1 (HIV-1)

Doktorarbeit

01.98 - heute:

Promotion am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg, Arbeitsgruppe Dr. Lars Nitschke, Lehrstuhl Prof. Dr. Thomas Hünig