



Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Fakultät für Biologie
Lehrstuhl für Virologie und Immunbiologie

Der inhibitorische Einfluss von CD22 auf das B-Zellrezeptor Signal nach Stimulation der B-Zelle

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

vorgelegt von
Judith Gerlach
aus Obertshausen

Würzburg 2003

eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Rainer Hedrich

Gutachter: PD Dr. Lars Nitschke

Gutachter: Prof. Dr. Erich Buchner

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Meinen Eltern

Meinem Brüderchen

Meinem Michael

Inhaltsverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	DIE IMMUNANTWORT DER B-ZELLEN	1
1.1.1	DIE B-ZELLEN SIND TEIL DER ADAPTIVEN IMMUNITÄT	1
1.1.2	DIE T-ZELLABHÄNGIGE UND -ZELLUNABHÄNGIGE IMMUNANTWORT DER B-ZELLEN	2
1.1.3	DIE DEFINITION DER B-ZELLPOPULATIONEN	3
1.2	DIE ENTWICKLUNG UND REIFUNG DER B-ZELLEN	4
1.2.1	DIE ENTWICKLUNG DER B-LYMPHOZYTEN IM KNOCHENMARK	4
1.2.2	DIE REIFUNG DER B-ZELLEN IN DER PERIPHERIE	6
1.3	DIE TRANSKRIPTIONELLE KONTROLLE DER IMMUNGLOBULINGENE	7
1.3.1	BOB.1/OBF.1 VERMITTELT DIE B-ZELLSPEZIFISCHE TRANSKRIPTION	7
1.3.2	PHÄNOTYP DER BOB.1/OBF.1-DEFIZIENTEN MÄUSE	8
1.4	DAS BZR-SIGNAL	9
1.4.1	ÜBERSICHT ÜBER DIE INITIATION DES BZR-SIGNALS	9
1.4.2	DIE BZR-SIGNALKASKADE	10
1.4.3	MÖGLICHKEITEN DER REGULATION DES BZR-SIGNALS	12
1.4.4	DAS ADAPTERMOLEKÜL SLP-65/BLNK	14
1.5	DIE WIRKUNG VON CD22 AUF DAS BZR-SIGNAL	16
1.5.1	DAS „ACCESSORY MOLECULE“ CD22	16
1.5.2	DER PHÄNOTYP CD22-DEFIZIENTER MÄUSE	17
1.5.3	DIE INHIBITORISCHE WIRKUNG VON CD22 AUF DAS BZR-SIGNAL	18
1.6	CD22 ALS ADHÄSIONSMOLEKÜL	19
1.6.1	DIE FAMILIE DER SIGLECS	19
1.6.2	DER LIGAND VON CD22	20
1.6.3	DIE FUNKTION DER ADHÄSIONSDOMÄNE VON CD22	22
1.7	MOTIVATION UND ZIELE DER ARBEIT	23
2	<u>MATERIAL</u>	25
2.1	ANTIBIOTIKA	25
2.2	ANTIKÖRPER	25
2.2.1	ANTIKÖRPER FÜR DIE B-ZELL-STIMULATION	25
2.2.2	ANTIKÖRPER FÜR DIE B-ZELL-AUFREINIGUNG	25
2.2.3	ANTIKÖRPER FÜR DIE DURCHFLUßZYTOMETRIE	26
2.2.4	ANTIKÖRPER FÜR IMMUNOBLOT-ANALYSE	27
2.3	BAKTERIENSTÄMME	28
2.4	CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIAL	28
2.5	INHIBITOREN	29
2.5.1	PROTEASE- UND PHOSPHATASE-INHIBITOREN	29
2.5.2	SYNTHETISCHE SIALOSIDE	29
2.6	PUFFER, MEDIEN UND LÖSUNGEN	29
2.6.1	PUFFER UND MEDIEN FÜR DAS ARBEITEN MIT ZELLEN	29
2.6.2	PUFFER FÜR ELISA	31
2.6.3	PUFFER FÜR DEN SCHWANZ-VERDAU	31
2.6.4	LÖSUNGEN FÜR SDS-PAGE	31
2.6.5	ZELLYSE-PUFFER	32
2.7	PCR-PRIMER	32
2.8	PLASMIDE UND VEKTOREN	33
2.9	VERSUCHSTIERE	33

3.1	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	34
3.1.1	ALLGEMEINE ZELLKULTURTECHNIKEN	34
3.1.1.1	Bestimmung der Zellzahl	34
3.1.1.2	Zentrifugieren von Zellen	34
3.1.1.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	34
3.1.1.4	Gewinnung von Hybridomüberstand	34
3.1.2	STABILE TRANSFEKTION VON ZELLLINIEN	35
3.1.2.1	Bestimmung der Antibiotikumtoxizität	35
3.1.2.2	Durchführung der Elektroporation	35
3.1.2.3	Selektion der transfizierten Zellen	35
3.1.3	ISOLIERUNG VON MURINEN B-LYMPHOZYTEN	36
3.1.3.1	Herstellung von Milzzellsuspensionen	36
3.1.3.2	Lyse der Erythrozyten	36
3.1.3.3	Komplement-vermittelte T-Zell-Lyse	36
3.1.4	STIMULATION VON B-ZELLEN	37
3.1.4.1	Hungerphase der B-Zellen	37
3.1.4.2	Stimulation der B-Zellen	37
3.1.5	ANALYSE DER ZELLPROLIFERATION	38
3.1.5.1	Durchführung eines Proliferationstests	38
3.1.5.2	Ernten der Zellen	38
3.1.6	DURCHFLUßZYTOMETRIE	38
3.1.6.1	Färbung von Zelloberflächenmolekülen	39
3.1.7	MESSUNG DER CA ²⁺ - MOBILISATION	39
3.1.7.1	Beladung und Anfärbung der B-Zellen	40
3.1.7.2	Stimulation der Zellen	40
3.2	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	41
3.2.1	AUFREINIGUNG VON MONOKLONALEM ANTIKÖRPER	41
3.2.2	GEWINNUNG VON POLYKLONALEM ANTIKÖRPER	42
3.2.2.1	Aufarbeitung von Antigen zur Immunisierung	42
3.2.2.2	Aufreinigung von polyklonalem Antikörper	42
3.2.3	HERSTELLUNG VON ZELLLYSATEN	43
3.2.4	IMMUNPRÄZIPITATION	44
3.2.4.1	Durchführung der Immunpräzipitation	44
3.2.5	IMMUNOBLOTTING	45
3.2.5.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
3.2.5.2	Western-Blotting	45
3.2.5.3	Immunologische Detektion	46
3.2.5.4	Enhanced-Chemiluminescence-System (ECL-System)	46
3.2.6	GLUTATHION-S-TRANSFERASE (GST) MARKIERTE PROTEINE	47
3.2.6.1	Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsprotein (Bsp.: GST- Grb2)	47
3.2.7	DURCHFÜHRUNG EINES ELISA	48
3.2.7.1	Gewinnung der Seren	48
3.2.7.2	Vorbehandlung der ELISA-Platten	49
3.2.7.3	Verdünnungsreihen der Seren und Standards	49
3.2.7.4	Auswertung der Enzymantwort	49
3.2.8	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON PROTEINEN	50
3.2.8.1	UV-Detektion	50
3.2.8.2	Mit Hilfe des BIO-RAD Protein-Tests	50
3.2.8.3	Mit Hilfe des MICRO-BCA Protein-Tests	51
3.3	DNS-SPEZIFISCHE METHODEN	52
3.3.1	TYPISIERUNG VON MÄUSEN	52
3.3.1.1	DNS Isolierung aus Mausschwänzen	52
3.3.1.2	Durchführung der PCR	52

4.1	DIE CYTOPLASMATISCHE DOMÄNE VON CD22	55
4.1.1	SLP-65/BLNK EIN SUBSTRAT DER PHOSPHATASE SHP-1	55
4.1.1.1	Erhöhte Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK in CD22-defizienten B-Zellen nach BZR-Stimulation	56
4.1.2	TRANSFEKTIONSEXPERIMENTE MIT DER PLASMAZYTOM-ZELLINIE J558L μ M3	59
4.1.2.1	Die Stimulation der transfizierten J558L μ M3 Zellen initiiert eine mit primären B-Zellen vergleichbare Tyrosin-Phosphorylierung	60
4.1.2.2	Transfiziertes CD22 wird in J558L μ M3 Zellen phosphoryliert und rekrutiert die Phosphatase SHP-1	65
4.1.2.3	In J558L μ M3 Zellen transfiziertes CD22 zeigt keinen inhibitorischen Einfluss auf das Adaptermolekül SLP-65/BLNK	66
4.1.2.4	Die Tyrosin-Phosphatase SHP-1 reguliert den Phosphorylierungsgrad von SLP-65/BLNK	70
4.1.2.5	Transfektion der Plasmazytomzellen J558L μ M3 mit dem Sialinsäuretransferase ST6Gal1 codierenden Expressionsvektor	72
4.1.2.6	Nach Doppeltransfektion von J558L μ M3 Zellen mit Sialinsäuretransferase ST6Gal1 und CD22 liegt CD22 auf der Zelloberfläche maskiert vor	74
4.1.2.7	Keine eindeutige Wirkung von CD22 auf die SLP-65/BLNK Tyrosin-Phosphorylierung in Sialinsäuretransferase – CD22 Doppeltransfektanten	77
4.1.3	CHARAKTERISIERUNG CD22 X SLP-65- DOPPEL-DEFIZIENTER MÄUSE	80
4.1.3.1	Deutliches Ca ²⁺ -Signal in SLP-65xCD22-doppel-defizienten B-Zellen nach BZR-Stimulation	80
4.1.3.2	Im Knochenmark von SLP-65xCD22-doppel-defizienten Mäusen bleibt der Entwicklungsblock im prä-BII-Zellstadium erhalten	81
4.1.3.3	Verdopplung der Anzahl reifer B-Zellen in der Milz von SLP-65xCD22-doppel-defizienten im Vergleich zu SLP-65-defizienten Mäusen	83
4.1.3.4	Keine Verbesserung der Immunkompetenz von SLP-65xCD22-doppel-defizienten Mäusen	86
4.1.3.5	Minimale proliferative Antwort von SLP-65xCD22-doppel-defizienten B-Zellen nach BZR-Stimulation	88
4.1.3.6	Die zusätzliche Deletion von CD22 in SLP-65 ^{-/-} B-Zellen führt nach LPS-Stimulation zu einer Teilungsrate vergleichbar mit Kontroll-B-Zellen	90
4.2	DIE ADHÄSIONSDOMÄNE VON CD22	92
4.2.1	DIE NOTWENDIGKEIT DER LIGANDEN-BINDUNGSDOMÄNE VON CD22 FÜR DIE INHIBITORISCHE WIRKUNG AUF DAS BZR-SIGNAL	92
4.2.1.1	Die Bindungseigenschaften der Sialoside	92
4.2.1.2	Spezifitätstest der Sialoside für zelluläres CD22	95
4.2.1.3	In Gegenwart von BPC-Neu5Ac erhöhtes Ca ²⁺ -Signal in humanen Daudi Zellen nach BZR-Stimulation	97
4.2.1.4	In Gegenwart von BPC-Neu5Ac reduzierte CD22-Tyrosin-Phosphorylierung und verringerte SHP-1 Assoziation nach BZR-Stimulation	99
4.2.2	BPC-NEU5AC STÖRT DIE INTERAKTION ZWISCHEN CD22 UND DEM BZR	101
4.2.3	CD45 ALS POTENTIELLER LIGAND FÜR CD22	103
4.2.3.1	In CD45-defizienten B-Zellen stark verringerte CD22 Tyrosin-Phosphorylierung nach BZR-Stimulation	104
4.3	DIE ROLLE VON CD22 IN BOB.1/OBF.1-DEFIZIENTEN MÄUSEN	107
4.3.1	ERHÖHTE CD22 EXPRESSION AUF BOB.1/OBF.1-DEFIZIENTEN VORLÄUFER B-ZELLEN	107
4.3.2	SIGNIFIKANTE STEIGERUNG DER TRANSITIONELLEN B-ZELLEN IN BOB.1/OBF.1X CD22-DOPPEL-DEFIZIENTEN MÄUSEN	109
4.3.3	GESTIEGENE ANZAHL REIFER B-ZELLEN IN BOB.1/OBF.1XCD22-DOPPEL-DEFIZIENTEN MÄUSEN	111

4.3.4	DAS CA ²⁺ - SIGNAL IN BOB.1/OBF.1 X CD22-DOPPEL-DEFIZIENTEN B-ZELLEN IST WIEDER HERGESTELLT	112
4.3.5	UNVERÄNDERTE IMMUNINKOMPETENZ IN BOB.1/OBF.1XCD22-DOPPEL-DEFIZIENTEN MÄUSEN	114
4.3.6	NACH LPS-STIMULATION EXPRIMIERTEN CD22-DEFIZIENTE B-ZELLEN DEN CO-AKTIVATOR BOB.1/OBF.1 FRÜHER UND VERSTÄRKT	116
4.3.7	BOB.1/OBF.1XCD22-DOPPEL-DEFIZIENTE B-ZELLEN PROLIFERIERTEN NACH LPS-STIMULATION VERGLEICHBAR STARK WIE CD22-DEFIZIENTE B-ZELLEN	117
5	<u>DISKUSSION</u>	119
5.1	DIE CYTOPLASMATISCHE DOMÄNE VON CD22	119
5.1.1	SLP-65/BLNK: EIN SUBSTRAT DER PHOSPHATASE SHP-1	119
5.1.2	TRANSFEKTIONSSTUDIEN DER PLASMAZYTOM-ZELLINIE J558L μ M3	124
5.1.3	CHARAKTERISIERUNG CD22 X SLP-65- DOPPEL-DEFIZIENTER MÄUSE	128
5.2	DIE NOTWENDIGKEIT DER LIGANDEN-BINDUNGSDOMÄNE VON CD22 FÜR DIE INHIBITORISCHE WIRKUNG AUF DAS BZR-SIGNAL	132
5.3	DIE ROLLE VON CD22 IN BOB.1/OBF.1-DEFIZIENTEN MÄUSEN	136
6	<u>LITERATUR</u>	141
7	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	153
8	<u>SUMMARY</u>	155
9	<u>ERKLÄRUNG</u>	157
10	<u>PUBLIKATIONSLISTE</u>	158
10.1	ORIGINALARBEITEN AUS DIESER DOKTORARBEIT	158
10.2	PUBLIKATIONEN AUF KONGRESSEN/TAGUNGEN	159
11	<u>CURRICULUM VITAE</u>	160
12	<u>DANKSAGUNG</u>	161
13	<u>ANHANG</u>	162
13.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	162

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Antikörper für die B-Zell-Stimulation	25
Tab. 2: Antikörper für die B-Zell-Aufreinigung	25
Tab. 3: Antikörper für die Durchflußzytometrie	26
Tab. 4: Antikörper für Immunoblot-Analyse	27
Tab. 5: Antikörper zur Stimulation von B-Zellen	37
Tab. 6: Affinität von Immunglobulinen zu ProteinA/ProteinG	41
Tab. 7: SDS-PAGE: Angaben in Tabelle ausreichend für 2 x 0,75mm Minigele	45
Tab. 8: SLP-65/BLNK ist in Sia - CD22-wt J558Lµm3 Doppeltransfektanten geringer Tyrosin-phosphoryliert	79
Tab. 9: Vergleich des relativen inhibitorischen Potentials (rIP) der synthetischen Sialoside	94

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die B-Zellentwicklung im Knochenmark der Maus	5
Abb. 2: Die vom B-Zellrezeptor initiierten Signalkaskaden	12
Abb. 3: Möglichkeiten der Ligandbindung von CD22	21
Abb. 4: Aus CD22-defizienten B-Zellen präzipitiertes SLP-65/BLNK zeigt eine frühere und höhere Tyrosin-Phosphorylierung nach BZR-Stimulation	57
Abb. 5: Grb2-GST pull-down Experimente bestätigen die frühere und höhere Tyrosin- Phosphorylierung von SLP-65/BLNK nach BZR-Stimulation in CD22-defizienten B-Zellen	58
Abb. 6: Stimulationsvergleich von untransfizierten, CD22-wt und SHP-1c/s transfizierten J558Lµm3 Zellen mit primären B-Zellen	64
Abb. 7: Transfiziertes CD22 wird in J558Lµm3 Zellen nach Stimulation mit Per-Vanadat Tyrosin-phosphoryliert und die Phosphatase SHP-1 an CD22 rekrutiert	66
Abb. 8: Keine Verringerung der SLP-65/BLNK Tyrosin-Phosphorylierung nach Stimulation mit Per-Vanadat in CD22 transfizierten J558Lµm3	67
Abb. 9: Die SLP-65/BLNK Tyrosin-Phosphorylierung korreliert nicht mit der Expression von CD22 in transfizierten J558Lµm3 Zellen	69
Abb. 10: In J558Lµm3 Zellen transfiziert mit der dominant-negative Mutante SHP-1c/s ist SLP-65/BLNK höher Tyrosin-phosphoryliert als in untransfizierten J558Lµm3	71
Abb. 11: J558Lµm3 Plasmazytomzellen tragen nach Transfektion mit der Sialinsäuretransferase ST6Gal1 alpha2,6 Sialinsäure auf der Oberfläche	73
Abb. 12: Auf der Zelloberfläche von Sia - CD22 J558Lµm3 Doppeltransfektanten ist CD22 cis-maskiert	76
Abb. 13: In SLP-65xCD22-doppel-defizienten B-Zellen deutliches Ca²⁺-Signal nach	81

BZR-Stimulation

Abb. 14:	Im Knochenmark von SLP-65xCD22-doppel-defizienten Mäusen bleibt der Entwicklungsblock im prä-BII-Zellstadium erhalten	82
Abb. 15:	Der zusätzliche Verlust von CD22 bewirkt eine verbesserte Reifung von SLP-65-defizienten B-Zellen in der Milz	84
Abb. 16:	Keine Immunantworten in SLP-65^{-/-} und SLP-65xCD22-doppel-defizienten Mäusen	87
Abb. 17:	Keine Verbesserung der Proliferation von SLP-65xCD22-doppel-defizienten B-Zellen nach BZR-Stimulation	89
Abb. 18:	Proliferation von SLP-65xCD22-doppel-defizienten B-Zellen nach LPS-Stimulation	91
Abb. 19:	Die Bindung von CD22-Fc Molekülen an alpha2,6 Sialinsäure-tragende Zielzellen wird durch synthetische Sialoside inhibiert	93
Abb. 20:	Die Spezifität der Sialoside für zelluläres CD22	96
Abb. 21:	Die Gegenwart des Sialosids BPC-Neu5Ac bewirkt nach BZR-Stimulation ein verstärktes Ca²⁺-Signal in humanen Daudi Zellen	98
Abb. 22:	Reduzierte Tyrosin-Phosphorylierung von CD22 nach BZR-Stimulation in Gegenwart des Sialosids BPC-Neu5Ac und verringerte SHP-1 Co-Präzipitation	100
Abb. 23:	CD22 co-präzipitiert mit dem BZR in Abhängigkeit von alpha2,6 Sialinsäure	102
Abb. 24:	In CD45-defizienten B-Zellen 30-50% reduzierte Tyrosin-Phosphorylierung von CD22 nach BZR-Stimulation und verringerte SHP-1 Co-Präzipitation	105
Abb. 25:	Erhöhte Expression von CD22 auf Knochenmarkszellen von BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen	108
Abb. 26:	Der Verlust von CD22 bewirkt eine verbesserte Entwicklung von BOB.1/OBF.1-defizienten B-Zellen im Knochenmark	110
Abb. 27:	In BOB.1/OBF.1xCD22-doppel-defizienten Milzen ist das B : T-Zellverhältnis wieder hergestellt und die Anzahl reifer B-Zellen gestiegen	112
Abb. 28:	Das Ca²⁺ -Signal in BOB.1/OBF.1 x CD22 doppel-defizienten B-Zellen erreicht mindestens die Höhe von Kontroll-B-Zellen	113
Abb. 29:	Kaum messbare Immunantworten in BOB.1/OBF.1- und BOB.1/OBF.1xCD22-doppel-defizienten Mäusen	115
Abb. 30:	LPS-Stimulation induziert eine frühere und höhere BOB.1/OBF.1 Expression in CD22-defizienten B-Zellen	116
Abb. 31:	Proliferation von BOB.1/OBF.1xCD22-doppel-defizienten B-Zellen nach LPS-Stimulation	118
Modell 1:	Erwarteter Tyrosin-Phosphorylierungsgrad von SLP-65/BLNK in J558Lµm3 Transfektanten	62

1 Einleitung

1.1 Die Immunantwort der B-Zellen

1.1.1 Die B-Zellen sind Teil der adaptiven Immunität

B-Zellen wurden nach ihrem Reifungsort in Vögeln, der *bursa fabricii*, benannt. In Säugetieren reifen die B-Zellen im Knochenmark (engl. bone-marrow). Sie sind verantwortlich für die **humorale Immunantwort** (lat.: humor - Körperflüssigkeit), d.h. nach Antigen-Bindung sezernieren sie hochspezifische Antikörper. Diese Antikörper neutralisieren oder opsonieren eingedrungenes Antigen.

Wie die T-Zellen (Reifungsort im Thymus) gehören auch die B-Zellen zur **adaptiven Immunität**. Der **B-Zellrezeptor** (BZR) wird, entsprechend dem **T-Zellrezeptor** (TZR), durch das Rearrangement genomischer DNS etabliert und ist einzigartig für die jeweilige Zelle (Diversität). Die Spezifität einer jeden B-Zelle kommt durch das Rearrangement der Immunglobulin-Gensegmente der schweren und leichten Immunglobulin-Kette während der B-Zellentwicklung zustande. Willkürlich werden die $V_H D_H J_H$ Gensegmente der schweren Kette (engl. heavy) und die $V_L J_L$ Gensegmente der leichten Kette (engl. light) zusammengefügt und jeweils der konstante Teil der schweren bzw. der leichten Immunglobulin-Kette angehängt. Der variable Teil der schweren und der leichten Kette bildet zusammen die einzigartige Antigen-Bindungsstelle der B-Zelle. Durch das Rearrangement der Immunglobulingene kann jede denkbare Kombination und entsprechend auch jede mögliche Spezifität der B-Zelle entstehen. Um Autoimmunreaktionen der B-Zellen zu vermeiden, durchlaufen diese während ihrer Entwicklung eine negative Selektion. Bindet die B-Zellen in einem bestimmten Entwicklungsstadium Antigen, so wird Apoptose oder Anergie eingeleitet. B-Zellen können folglich zwischen nicht-fremden (selbst) und fremden Antigen unterscheiden. Ein weiteres Merkmal der adaptiven Immunität ist das sogenannte „immunologische Gedächtnis“, das B-Zellen nach einer Immunantwort in Form von Gedächtnis B-Zellen ausbilden. Wie in den folgenden Kapiteln beschrieben, legt die Spezifität des BZR die Lokalisation der B-Zelle und den Ablauf der Immunantwort fest. Je nach Antigen benötigt die B-Zelle co-stimulatorische Signale von T-Zellen zur Einleitung einer Immunantwort oder nicht.

1.1.2 Die T-zellabhängige und -zellunabhängige Immunantwort der B-Zellen

Die humorale Immunantwort des B-Lymphozyten wird durch die Bindung von löslichem Antigen an das membranständige Immunglobulin (mIgM oder B-Zellrezeptor BZR) eingeleitet. Die BZR auf der Zelloberfläche werden durch bi- oder multivalentes Antigen ligiert oder kreuzvernetzt, wodurch die B-Zelle aktiviert wird. Je nach Antigen wird eine T-zellabhängige (**T-cell Dependent: TD**), oder eine T-zellunabhängige (**T-cell Independent: TI**) Immunantwort induziert. Die TD-Immunantwort wird durch die Bindung eines proteinhaltigen Antigens, die TI-Immunantworten durch kohlenhydrathaltige Antigene eingeleitet. Je nachdem, ob es sich um einfache oder repetitive Zuckerstrukturen handelt, wird die thymus-unabhängige Immunantwort in eine TI-Typ1 oder -Typ2 Immunantwort unterteilt.

Die im nächsten Kapitel vorgestellten B1 Zellen und die B-Zellen in der Marginalzone der Milz (MZ B-Zellen) erkennen T-zellunabhängiges Antigen Typ 2 (TI-Typ2). Dabei handelt es sich um polyvalente Zuckerstrukturen beispielsweise von Bakterienwänden, die ohne T-Zell-Hilfe eine schnelle Immunantwort induzieren (Oliver et al., 1999). B1 und MZ B-Zellen werden als Ursprung für die sogenannte „natural antibodies“ vermutet (Martin und Kearney, 2001). Ohne die Bildung von Keimzentren werden nach 1-3 Tagen hauptsächlich niedrig affine, teilweise auch selbstreaktive, IgM und IgG₃ Antikörper sezerniert. Weder kommt es bei der TI-Typ2 Immunantwort zur somatischen Hypermutation, noch werden Gedächtnis-Zellen ausgebildet. Die B1 und MZ B-Zellen überbrücken den Zeitraum zwischen den Abwehrmechanismen der angeborenen und der später einsetzenden adaptiven Immunität.

Bei der TD-Immunantwort kreuzvernetzt das protein-haltige Antigen die spezifischen BZR, wodurch die B-Zelle auf den Eintritt in den Zellzyklus vorbereitet und die Internalisierung des gebundenen Antigens eingeleitet wird. Neben der Antikörpersekretion übernehmen B-Zellen auch die Aufgabe von **Antigen-präsentierenden Zellen (APZ)**. Das internalisierte, prozessierte und MHC-Klasse-II gebundene Antigen wird auf der B-Zelle den T-Zellen dargeboten (Lanzavecchia et al., 1985 und Batista et al, 2001). In den sekundären lymphatischen Organen kommt es zur Interaktion zwischen den Antigen-präsentierenden B-Zellen und CD4-positiven T-Zellen (T-Helfer Zellen-Typ2; TH2). Die voraktivierten Antigen-spezifischen TH2 Zellen sezernieren Interleukine und exprimieren zellgebundene Effektoren wie CD40L, die die B-Zelle zusätzlich aktivieren. B- und T-Zellen wandern in die primären Follikel ein. Durch klonale Expansion der stimulierten B-Zellen entwickelt sich das Keimzentrum. In diesem Mikromilieu proliferieren die B-Zellen besonders stark, wobei es zur somatischen Hypermutation kommt. Diese bedingt die sogenannte Affinitätsreifung der Antikörper. Außerdem wird in Abhängigkeit des Antigens bzw. der Umgebung der Isotyp-

oder Klassenwechsel vollzogen (class switch), bei dem der konstante Teil der schweren Kette des Antikörpers durch einen anderen konstanten Teil ersetzt wird. Während die Spezifität des Antikörpers erhalten bleibt, wird durch den Isotyp die Effektorfunktion vorgegeben. In den Keimzentren entwickeln sich neben den Antikörper-sezernierenden Plasmazellen auch die sekretorisch inaktiven, langlebigen Gedächtniszellen.

1.1.3 Die Definition der B-Zellpopulationen

B-Zellen werden anhand ihrer Expression von bestimmten Oberflächenmolekülen in verschiedene Gruppen unterteilt. Jene B-Zellen, die durch die peripheren lymphatischen Organe wie Milz und Lymphknoten zirkulieren, gehören zu den konventionellen B2 Zellen. Sie sind Träger der adaptiven Immunität. Im Allgemeinen, auch in dieser Arbeit, wird von B-Zellen gesprochen, wenn B2 Zellen gemeint sind. Per Definition kann auf unstimulierten B2 Zellen kein CD5 nachgewiesen werden, wohingegen die meisten B1 Zellen CD5 auf ihrer Oberfläche haben. Die B1 Zellen befinden sich in erwachsenen Mäusen hauptsächlich im Peritoneum. Sie werden in zwei Subpopulationen unterteilt: B1a Zellen exprimieren $CD5^+$ $B220^+$ IgM^{hi} IgD^{lo} $CD21^{+/-}$ $CD23^{+/-}$ $CD43^{+/-}$ $Mac-1^+$ und sind größer als die B2 Zellen (Hardy und Hayakawa, 2001). In Lymphknoten befinden sich keine B1a Zellen, wohingegen in der Milz rund 5% B1a Zellen zu finden sind. Die B1b Zellen entsprechen im Expressionsmuster den B1a Zellen, allerdings ohne CD5 auf der Oberfläche ($CD5^-$ $B220^+$ IgM^{hi} IgD^{lo} $CD21^{+/-}$ $CD23^{+/-}$ $CD43^{+/-}$ $Mac-1^+$).

Ursprünglich wurde anhand von Transferexperimenten fötaler Leberzellen in bestrahlte Mäuse gezeigt, dass sowohl B1 als auch B2 Zellen in den Mäusen rekonstituiert werden. Dagegen wurden nach Transfer von Knochenmarkszellen ausschließlich B2 Zellen gefunden (Kantor und Herzenberger, 1993). B1 Zellen entwickeln sich aus den fötalen/neonatalen Leberzellen und erneuern sich durch Teilung selber. Im Gegensatz dazu sind die B2 Zellen erst in adulten Mäusen zu finden. Neuere Experimente von Cong et al. (1991) und Houghton et al. (1993) waren die Voraussetzung für das „Modell der induzierten Differenzierung“. In diesem wird postuliert, dass der B1 Phänotyp das Resultat der TI-Typ2 Antigen Bindung ist. Hayakawa et al. (1999) konnten zeigen, dass selbst-reaktive B-Zellen nicht selektioniert werden, sondern sich auf noch ungeklärte Weise zu B1 Zellen entwickeln. Martin und Kearney (2001) schlagen vor, dass das Immunsystem die B-Zellen in Abhängigkeit der BZR-Spezifität in die jeweiligen Kompartimente verteilt, in denen die Funktion der B-Zellen entsprechend ihrer Antigen-Spezifität auf die Umgebung abgestimmt ist.

Zusammengefasst entwickeln sich die B1 Zellen im Peritoneum aus den fötalen Leberzellen, während die CD5⁻ B2 Zellen aus den lymphoiden Vorläuferzellen im Knochenmark hervorgehen. Während der Reifung der B2 Zellen zweigen die MZ B-Zellen ab. In wie weit die BZR-Spezifität die Differenzierung der B-Zellen in die verschiedenen Kompartimente ermöglicht, ist Gegenstand intensiver Forschung. Auf die Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark wird im Folgenden eingegangen.

1.2 Die Entwicklung und Reifung der B-Zellen

1.2.1 Die Entwicklung der B-Lymphozyten im Knochenmark

Hämatopoiese wird die Blutbildung aus pluripotenten Stammzellen im Knochenmark genannt, einschließlich der Zellen des Immunsystems. Von den sich teilenden Stammzellen zweigen die Entwicklungswege der lymphoiden und myeloiden Vorläuferzellen ab. Aus myeloiden Vorläuferzellen reifen Monozyten und Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile, Basophile und Mastzellen, Megakaryozyten und Blutplättchen und die Erythrozyten heran. Aus den lymphoiden Vorläuferzellen (**Common Lymphoid Progenitor**; CLP) entwickeln sich die B-, T- oder NK-Zellen (Kondo et al., 1997). Welche Zytokine, Liganden und Umgebungseinflüsse die determinierenden Transkriptionsfaktoren in dem CLP aktivieren oder inhibieren, wird intensiv erforscht. In Kapitel 1.3. wird auf die Expression des B-zellspezifischen, transkriptionellen Co-Aktivators BOB.1/OBF.1 eingegangen.

Die Entwicklungsstadien der B-Zelle wurden, beginnend mit der CLP bis zur reifen B-Zelle, anhand von bestimmten Oberflächenmolekülen (Marker), der Zellgröße, des Rekombinationsstatus der Immunglobulingene und der Wachstums- und Teilungseigenschaften in charakteristische Stadien unterteilt (Osmond et al., 1998; Hardy et al., 1996; Karasuyama et al., 1997). Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde in der Regel die Nomenklatur von Hardy benutzt. Wurde in dem CLP die B-zellspezifischen Gene angeschaltet, ist das erste definierte Stadium in der B-Zellentwicklung die **Prä-Pro-B-Zelle (Fraktion A)**; siehe Abb.1). Dieses wird anhand der Expression der Marker B220^{niedrig} (eine B-zellspezifische Spleißvariante des CD45) CD43^{hoch} HSA^{niedrig} charakterisiert. Das nächste Stadium, die **Pro-B-Zelle (Fraktion B/C)**, wird durch die Oberflächenmoleküle B220⁺ CD43⁺ HSA^{medium} CD19⁺ unterschieden. Intrazellulär sind die Pseudo-leichte Kette (surrogate light chain), die Rekombinasen RAG1 und RAG2 und die terminale Desoxytransferase (TdT) nachweisbar. Die Enzyme weisen auf das Rearrangement (somatische Rekombination) der Keimbahn-DNS für den variablen Teil der schweren Kette hin. Der Prä-B-Zellrezeptor

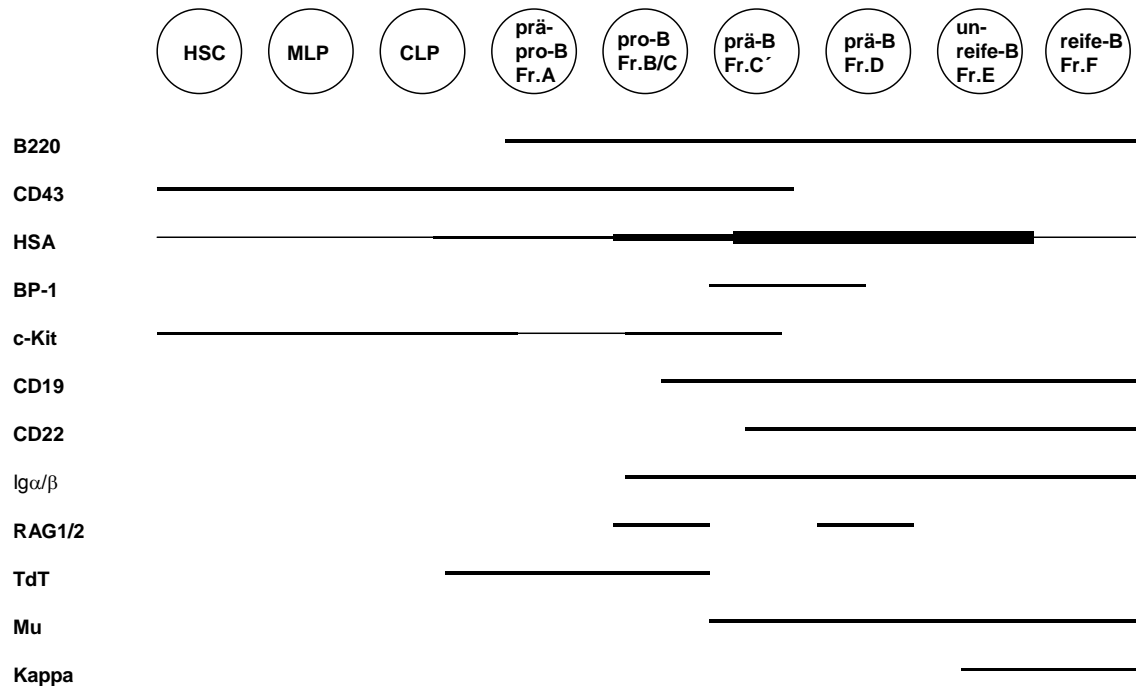


Abbildung 1: Die B-Zellentwicklung im Knochenmark der Maus

B-Zellen entwickeln sich im Knochenmark ausgehend von der hämatopoietischen Stammzelle (HSC), über die „multilineage“ lymphoide Vorläuferzelle (MLP), lymphoide Vorläuferzelle (CLP: common lymphoid progenitor) bis zur reifen B-Zelle in der Peripherie. Abgebildet sind die anhand von Oberflächenmolekülen (Markern), Expression von B-zellspezifischen Genen und der mu schweren und kappa leichten Kette unterscheidbaren Entwicklungsstadien nach Hardy et al. (1996). Die relative Expressionshöhe ist durch die Stärke der Linien angedeutet. © Hardy und Hayakawa 2001.

erscheint im **Prä-B-Zellstadium (Fraktion C'**: B220⁺ CD43⁺ HSA^{hoch} BP-1⁺ CD19⁺ CD22⁺ CD25⁺) auf der Oberfläche. Voraussetzung für die Expression des Prä-B-Zellrezeptors ist die Interaktion der rearrangierten schweren Kette mit der Pseudo-leichten Kette, bestehend aus $\lambda 5$ und VpreB (Kudo et al., 1987; Pillai und Baltimore 1987), und der Assoziation mit Ig α /Ig β . Die erfolgreiche Expression und die Signalinitiation des Prä-B-Zellrezeptors sind die Voraussetzung für die weiteren Schritte der B-Zellreifung: Zunächst wird der Genlocus, der für die schwere Kette codiert, wieder geschlossen (allelische Exclusion). Weiterhin wird durch das Prä-B-Zellrezeptorsignal eine starke Proliferation der „großen“ Prä-B-Zelle induziert. In den kleinen **Prä-B-Zellen (Fraktion D)** beginnt das Rearrangement der leichten Kette (Kitamura et al., 1992). Mit dem Erscheinen des membranständigen IgM (mIgM, BZR) wird die Zelle zur **unreifen B-Zelle (Fraktion E)**, die sich unabhängig von den Stromazellen des Knochenmarks weiterentwickelt. Diese unreifen B-Zellen reagieren höchst empfindlich auf Kreuzvernetzung der BZR im Knochenmark. Wie Tiegs et al. (1993) zeigen konnten, werden in autoreaktiven, unreifen B-Zellen die Genloci für die leichte Kette wieder geöffnet

und diese neu rearrangiert (receptor editing). Trotz dieser Maßnahme erreichen nur etwa 10% der unreifen B-Zellen die Milz (Carsetti et al., 1995). Während dieser negativen Selektion werden autoreaktive B-Zellen oder B-Zellen, deren BZR-Signal nicht ausreichend oder zu hoch ist, deletiert (klonale Deletion).

1.2.2 Die Reifung der B-Zellen in der Peripherie

Ausschließlich reife, langlebige B-Lymphozyten wandern nach Aktivierung durch Antigen-Bindung in die Follikel der Milz und der Lymphknoten ein, formieren Keimzentren und sezernieren hochspezifische Antikörper. Von den 2×10^7 IgM⁺ B-Zellen, die täglich im Knochenmark der Maus heranreifen, erreichen 10% der naiven B-Zellen die Milz und nur 1-3% der transitionellen B-Zellen enden in der reifen, immunkompetenten B-Zellpopulation (Allman et al., 1993; Melchers et al., 1995).

Die naiven B-Zellen wandern als transitionale IgM^{hoch} IgD⁻ exprimierende B-Zellen aus dem Knochenmark in die Peripherie aus. Die transitionellen B-Zellen können sowohl im Blut, als auch in der Milz, nicht aber in den Lymphknoten, nachgewiesen werden (Loder et al., 1999). In der Milz wird die bereits im Knochenmark begonnene negative Selektion der transitionellen, selbstreaktiven B-Zellen fortgesetzt (Carsetti et al., 1995). Werden die BZRs transitioneller B-Zellen durch Auto-Antigen kreuzvernetzt, wird Apoptose oder Anergie eingeleitet. Die Selektion wird durch den Reifungsgrad der Zellen und die Stärke des initiierten BZR-Signals bestimmt (Pierce, 2002). Transitionelle B-Zellen (Typ1: T1: IgM^{hoch} IgD⁻ CD21⁻ CD23⁻) brauchen ein Signal über den BZR, um sich in das Stadium der transitionellen Typ2 (T2: IgM^{hoch} IgD^{hoch} CD21⁺ CD23⁺) B-Zellen weiterzuentwickeln. T1 B-Zellen befinden sich in der äußeren periarteriolen lymphoiden Schicht (PALS) der Milz, während die T2 Zellen bereits in den Follikeln nachweisbar sind (Loder et al., 1999). Die reifen, follikulären B-Zellen (FO B-Zellen) exprimieren IgM^{niedrig} IgD^{hoch} CD21^{niedrig} CD23⁺ und zirkulieren auf der Suche nach Antigen durch die sekundären lymphatischen Organe.

Neben den 5-10% T1 und den 15-20% T2 B-Zellen wird in der Milz noch die Population der B-Zellen in der Marginalen Zone (MZ) der Follikel unterschieden. Diese 3-5% MZ B-Zellen kommen ausschließlich in der Marginalzone der Milz vor und exprimieren IgM^{hoch} IgD⁻ CD21⁺ CD23⁻ (Oliver et al., 1999). Wie bereits beschrieben, übernehmen MZ B-Zellen die Aufgabe, Antigen bakteriellen Ursprungs im Blut zu binden und eine schnelle Immunreaktion herbeizuführen.

1.3 Die transkriptionelle Kontrolle der Immunglobulingene

1.3.1 BOB.1/OBF.1 vermittelt die B-zellspezifische Transkription

Die Reifung der B-Zellen im Knochenmark folgt einem zeitlich genau definierte Expressionsmuster von bestimmten Genen. Kontrolliert wird die Genexpression über Rekombination, Transkription, Regulation der RNA-Stabilität, Translation, posttranslationale Modifikation und ganz besonders den B-zellspezifischen Transkriptionsfaktoren. Um Informationen über die transkriptionelle Regulation in B-Zellen zu erhalten, wurden die Promotoren und Enhancerelemente der Immunglobuline untersucht.

In nahezu allen Promotoren und einem Teil der Enhancer der Immunglobulingene, die für die schweren und leichten Ketten codieren, wurde das konservierte Oktamer-Motiv gefunden (Falkner et al., 1984, Parslow et al., 1984, Staudt et al., 1991). Allerdings wurde das Oktamer-Motiv auch in T-zellspezifischen und in allgemein benötigten Genen, wie beispielsweise das Histon-Gen H2B, nachgewiesen. Das Oktamer-Motiv ist nicht nur an B-zellspezifischer, sondern auch an ubiquitärer Genexpression beteiligt. Die lymphoid-spezifische Expression der Oktamer-Motive setzt die Existenz verschiedener Transkriptionsfaktoren voraus, die in Abhängigkeit des Promotors oder Enhancers unterschiedliche Gene aktivieren (Schaffner, 1989). Zwei an das Oktamer-Motiv bindende Transkriptionsfaktoren wurden charakterisiert: der ubiquitär exprimierte Transkriptionsfaktor Oct-1 (Staudt et al., 1986) und der lymphoid-spezifische Transkriptionsfaktor Oct-2 (Staudt et al., 1986; Scheidereit et al., 1988; Müller et al., 1988).

Die Oct-Proteine gehören zusammen mit den Proteinen Pit-1 und Unc-86 zu den Transkriptionsfaktoren der POU-Familie (POU: **P**it-1, **O**ct-1/2 und **U**nc-86; Herr et al., 1988; Sturm et al., 1988; Rosenfeld et al., 1991). Die gemeinsame POU-Domäne ist eine zweigeteilte DNS-Bindungsdomäne, die aus einer amino-terminalen POU-spezifischen Domäne und einer carboxy-terminalen POU-Homeodomäne besteht. Neben der spezifischen DNS-Erkennung vermittelt die POU-Domäne auch Protein-Protein Interaktionen (Zwilling et al., 1994 und 1995).

Die Transkription der verschiedenen Oktamer-Motiv enthaltenden Gene wird durch die spezifische Bindung der Oktamer-abhängigen Transkriptionsfaktoren kontrolliert. Für die Expression von Haushaltsgenen ist die Bindung von Oct-1 notwendig, für lymphoide Gene Oct-1 und Oct-2. B-zellspezifische Gene werden durch die zusätzliche Bindung des transkriptionellen Co-Aktivat BOB.1/OBF.1/OCA-B (**B**-cell Specific **O**ctamer-Motife **B**inding Protein / **O**ct-**B**inding **F**actor-1 / **O**ct **C**o-**A**ctivator of **B**-cells, Gstaiger et al., 1995; Strubin et

al., 1995; Luo et al., 1995; Pfisterer et al., 1995) aktiviert. Der N-Terminus von BOB.1/OBF.1 bindet an Oct-1 oder Oct-2 über die POU-Domäne. Obwohl der transkriptionelle Co-Aktivator selbst nur mit geringer Affinität an das Oktamer-Motiv bindet, interagiert das mit dem Oct-Protein assoziierte BOB.1/OBF.1 mit der „major groove“ der DNS. Dadurch erhöht BOB.1/OBF.1 die Selektivität des Komplexes für bestimmte Oktamer-Motive und wirkt wie eine molekulare Klammer zwischen DNS und dem gebundenen Transkriptionsfaktor.

1.3.2 Phänotyp der BOB.1/OBF.1-defizienten Mäuse

Drei Arbeitsgruppen haben BOB.1/OBF.1-defiziente Mäuse durch homologe Rekombination generiert: Kim et al. (1996), Nielsen et al. (1996) und Schubart et al. (1996). Mit Hilfe dieser Mäuse konnte die Rolle des transkriptionellen Co-Aktivators BOB.1/OBF.1 während der B-Zellentwicklung, der B-Zelldifferenzierung und bei Immunantworten genauer untersucht werden. Während der frühen B-Zellentwicklung im Knochenmark von BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen wurden keine Auffälligkeiten gefunden. Jedoch konnten Hess et al. (2001) zeigen, dass die B-Zellzahl im transitionalen Stadium im Knochenmark signifikant reduziert ist, was mit einer gestiegenen Apoptoserate einhergeht. Entsprechend verlassen weniger transitionale B-Zellen das Knochenmark. Die Anzahl an reifen B-Zellen in der Peripherie ist um das zwei- bis dreifache reduziert (Nielsen et al., 1996 und Schubart et al., 1996). Entsprechend können kaum rezirkulierende B-Zellen im Knochenmark nachgewiesen werden. Die B1 Zellzahl ist in den BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen unverändert.

Entgegen den Erwartungen konnte in den BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen kein Unterschied in der mRNA Menge der μ - und λ -Kette gemessen werden (Kim et al., 1996; Schubart et al., 1996). Entsprechend lag die Konzentration an IgM im Serum der BOB.1/OBF.1-defizienten Mäuse unverändert (Nielsen et al., 1996; Schubart et al., 1996), bzw. leicht erhöht vor (Kim et al., 1996). Auffällig in den BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen ist das Fehlen sekundärer Antikörperklassen. Nach Immunisierung der Tiere bilden sich keine Keimzentren (Wolf et al., 1998). Zwar findet der Klassenwechsel statt, aber die Transkription der umgelagerten Loci der schwere Kette bleibt aus.

Zusammengefasst haben die BOB.1/OBF.1-defizienten Mäuse einen relativ milden Phänotyp, bedenkt man, wie häufig und konserviert das Oktamer-Motiv in den B-zellspezifischen Promotoren und Enhancern vorliegt.

1.4 Das BZR-Signal

1.4.1 Übersicht über die Initiation des BZR-Signals

Um nach Antigen-Bindung eine humorale Immunantwort zu bewirken, müssen vom BZR ausgehend sowohl die Expression bestimmter Gene, als auch die Prozessierung des Antigens eingeleitet werden. Im Folgenden wird ausschließlich auf die erfolgreiche Signalentstehung am BZR und die Weiterleitung des Signals bis in den Zellkern eingegangen.

Der BZR ist ein Multiproteinkomplex bestehend aus dem membranständigen Immunglobulin und dem nicht-kovalent gebundenen Heterodimer Ig α und Ig β (CD79a und CD79b; Hombach et al., 1990). Wie von Schamel et al. (2000) gezeigt, assoziiert ein Heterodimer mit einem mIgM. Da die zytoplasmatische Domäne des mIgM und mIgD nur 3 Aminosäuren umfasst, ist der BZR ausschließlich für die Bindung des löslichen Antigens verantwortlich. Die über eine extrazelluläre Disulfidbrücke miteinander verbundenen Transmembranmoleküle Ig α und Ig β übertragen die Antigen-Bindung als Signal ins Zellinnere und initiieren die Signalentstehung. Sowohl Ig α , als auch Ig β , haben in ihrem zytoplasmatischen Teil das konservierte ITAM-Sequenzmotif (**I**mmunoreceptor **T**yrosine-based **A**ctivation **M**otif; Reth et al., 1989). Die Untersuchungen von Mäusen, deren zytoplasmatische Domäne von Ig α und/oder Ig β deletiert worden waren, verdeutlichte die essentielle Rolle von Ig α und Ig β in der BZR-Signalentstehung (Torres et al., 1996; Reichlin et al., 2001).

Die Bindung von multivalentem Antigen kreuzvernetzt die BZR auf der Oberfläche der B-Zellen. Dadurch werden die zytoplasmatischen Domänen der Heterodimere Ig α /Ig β in direkten Kontakt zueinander gebracht. Dies führt zur Aktivierung von drei Protein Tyrosin Kinase (PTK) -Familien, nämlich den Src-Kinasen (Lyn, Fyn, Blk), der Syk-Kinase und der Familie der Tec-Kinasen (besonders die Bruton's Tyrosine Kinase, Btk). Die PTKs phosphorylieren Adapterproteine wie SLP-65/BLNK, Nck, NTAL, PAG, usw. (siehe Abb.: 2). Im Laufe der letzten Jahre wurde deutlich, dass Adaptermoleküle für die Rekrutierung und Organisation der jeweiligen Effektor-Kinasen verantwortlich sind (Kurosaki, 2002). Die entstehenden Multiproteinkomplexe koordinieren die Synthese oder Aktivierung von sekundären Botenstoffen. Neben der im Folgenden beschriebenen Ca²⁺-Mobilisierung, werden der Ras/Raf-, der Rho- oder der PKC-Signalweg initiiert. Diese enden in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie ELK1/Sap-1a, Jun/Atf2, NF-AT oder NF- κ B oder der Umstrukturierung des Zytoskeletts.

1.4.2 Die BZR-Signalkaskade

Durch die Bindung von Antigen werden die BZR kreuzvernetzt, was die Src-Kinasen Lyn, Fyn, Blk aktiviert. Diese phosphorylieren die Tyrosine im zytoplasmatischen Teil von $Ig\alpha/Ig\beta$. Pleiman et al. (1994) zeigten, dass Lyn und Fyn über die SH2-Domäne an das phosphorylierte ITAM von $Ig\alpha/Ig\beta$ binden und weitere Kinasen und benachbarte „accessory molecules“, wie CD19, CD22, CD45, usw., phosphorylieren. Auch die Interaktion von Syk mit dem zweifach phosphorylierte ITAM von $Ig\alpha$ und/oder $Ig\beta$ über die beiden SH2-Domänen wurden nachgewiesen (Kimura et al., 1996). Durch die Bindung von Syk über die SH2-Domänen vervielfacht sich die Aktivität der Kinase (Kurosaki et al., 1995). Neuere Daten deuten darauf hin, dass Syk konstitutiv mit dem ITAM von $Ig\alpha$ assoziiert ist. Nach BZR-Stimulation autophosphoryliert sich Syk und initiiert die Signalkaskade weitgehend unabhängig von Src-Kinasen (Rolli et al., 2002). Substrate der aktivierten Syk-Kinase sind das Adaptermolekül SLP-65/BLNK (**S**H2-**D**omain **C**ontaining **L**eukocyte **P**rotein of **65** kD, Wienands et al., 1998; auch **B** Cell **L**inker **P**rotein, Fu et al., 1998; oder BASH: **B** Cell **A**daptor **C**ontaining **S**rc **H**omology 2 **D**omain, Goitsuka et al., 1998), die **P**hospholipase **C** γ 2 (PLC γ 2) und die **B**ruton's **T**yrosin **K**inase (Btk). Von Rodriguez et al. (2001) wurde folgender Aktivierungsmechanismus vorgeschlagen: Die aktivierte Syk Kinase phosphoryliert das Adaptermolekül SLP-65/BLNK. An dieses bindet PLC γ 2 und Btk. Die Phosphorylierung von PLC γ 2 durch Btk ist Voraussetzung für die vollständige Aktivierung der Lipase.

Nach Aktivierung hydrolysiert PLC γ 2 das in die Zellmembran eingelagerte Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in zytoplasmatisches Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG). Beide Hydrolyseprodukte sind sekundäre Botenstoffe. IP₃ bindet an die IP₃-Rezeptoren der intrazellulären Ca²⁺-Speicher, wie dem Endoplasmatischen Reticulum (ER). Dies bewirkt den initialen Ca²⁺-Ausstrom aus dem ER ins Zytoplasma (Berridge et al., 1993). Die Entleerung der intrazellulären Ca²⁺-Speicher bedingt den extrazellulären Ca²⁺-Einstrom durch Öffnen der Ca²⁺-Kanäle in die Zelle (kapazitiver Effekt oder SOC: **S**ore **O**perated **C**a²⁺-**E**ntry). Erreicht die Konzentration an freien Ca²⁺-Ionen im Zytoplasma den maximalen Punkt, werden Ionenaustauschkanäle aktiviert, die für den aktiven Rücktransport des Ca²⁺ sorgen. Das zytoplasmatische Ca²⁺ bindet an die Ca²⁺-abhängige Kinase Calmodulin oder Phosphatase Calcineurin. Beide sind verantwortlich für die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren.

Während die essentielle Rolle von Syk, PLC γ 2 und Btk für die Induktion der Ca²⁺-Mobilisation seit Jahren nachgewiesen ist, bleibt die Frage nach dem molekularen Mechanismus der Rekrutierung von PLC γ 2 an dessen Substrat PIP₂ in der Zellmembran offen. In T-Zellen

wurde von Zhang et al. (1998) das Adaptermolekül **L**inker for **A**ctivation of **T**-cells (LAT) gefunden. Dieses konstitutiv in den Membran-Mikrodomänen (lipid rafts) verankerte Adapterprotein wird nach TZR-Stimulation phosphoryliert und dient daraufhin als Gerüst für die Rekrutierung eines Multiproteinkomplexes, bestehend u.a. aus den T-Zelläquivalenten PLC γ 1, SLP-76, Itk und Grb2/SOS. „Lipid rafts“ sind Mikrodomänen in der Zellmembran mit einem sehr hohen Anteil an Phospholipiden, Cholesterin und Sphingolipiden, in denen die Signaltransduktion stattfindet (auch DIGs: **D**etergens **I**nsoluble **G**lycolipids oder GEMs: **G**lycolipid-**E**nriched **M**icrodomains genannt). Das Homolog für LAT wurde von zwei Gruppen auch in B-Zellen als raft-assoziiertes Adaptermolekül identifiziert. Allerdings binden das von Brdicka et al. (2002) charakterisierte Molekül NTAL (**N**on **T**-cell **A**ctivation **L**inker) und das von Janssen et al. (2003) beschriebene LAB (**L**inker for **A**ctivation of **B**-cells) weder PLC γ , noch SLP-65/BLNK. Offensichtlich unterscheidet sich an diesem Punkt der molekulare Mechanismus der Rekrutierung von Signalmolekülen in die Mikrodomänen zwischen T- und B-Zellen. Auf eine Alternative verwiesen Engels et al. (2001) und Kabak et al. (2002). Beide Gruppen zeigten die direkte Interaktion von SLP-65/BLNK mit Ig α an Tyrosin204 außerhalb des ITAMs. So würden nach BZR-Stimulation Syk und SLP-65/BLNK direkt an Ig α und/oder Ig β binden und PLC γ 2 und Btk rekrutieren. Da sich nach BZR-Kreuzvernetzung die Rezeptoren in die Mikrodomänen bewegen, wären die Signalmoleküle entsprechend lokalisiert und die Nähe von PLC γ 2 zu dessen Substrat wäre gewährleistet.

Bisher wurde nicht auf regulatorische Mechanismen innerhalb des aktivierenden Signalwegs eingegangen. Zelluläre Prozesse laufen in einem genau definierten Gleichgewicht zwischen aktivierenden und inhibierenden Prozessen ab. So werden beispielsweise Src-Kinasen durch die Phosphatase CD45 aktiviert und durch die Tyrosin-Kinase CSK inhibiert, die an das Adaptermolekül PAG (**P**hosphoprotein **A**ssociated with **G**lycosphingolipid-enriched Microdomains) bindet (siehe Abb.: 2). Ein weiteres Beispiel ist die Assoziation von Grb2, SOS und Nck an das Adaptermolekül SLP-65/BLNK. Auch Vav (Rho-GTPase Guanin Nukleotid Austauschfaktor) wird an SLP-65/BLNK rekrutiert und hat wahrscheinlich so Einfluss auf die Umstrukturierung des Zytoskeletts (Wienands et al., 1998). Die Aktivität von PLC γ 2 wird durch die Menge an Phosphatidylinositol in der Zellmembran limitiert. Wird beispielsweise der Fc γ RIIB mit dem BZR kreuzvernetzt, dephosphoryliert die **SH2**-Domäne enthaltende Inositol-Phosphatase SHIP das PIP $_2$ in den rafts und verhindert dadurch die Ca $^{2+}$ -Mobilisation. In **Abbildung 2** sind die beschriebenen und erwähnten Signalwege im Modell veranschaulicht.

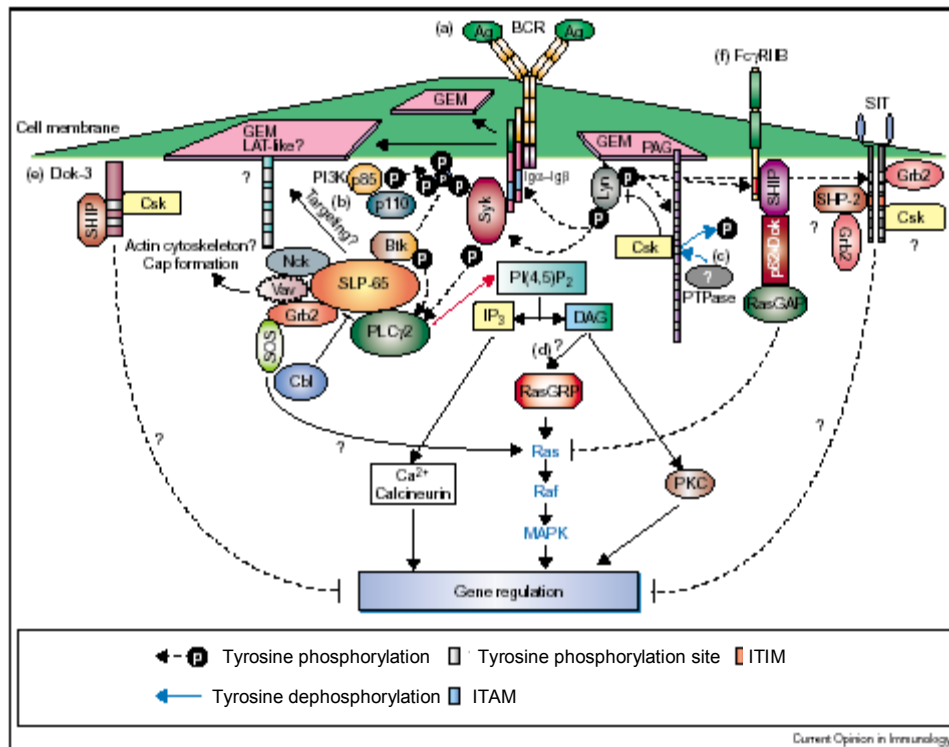


Abbildung 2: Die vom B-Zellrezeptor initiierten Signalkaskaden

Werden die BZR durch Antigen-Bindung (a, Ag) kreuzvernetzt, wird das BZR-Signal an Ig α /Ig β durch die Aktivität der Src-Kinasen wie Lyn und der Kinase Syk eingeleitet. Als zentrales Adaptermolekül wird SLP-65/BLNK von Syk phosphoryliert (b). Im Gegensatz zu T-Zellen ist der Mechanismus, wie der SLP-65/BLNK-Multiproteinkomplex an die Zellmembran lokalisiert wird, noch nicht geklärt. Die Aktivierung der Lipase PLC γ 2 führt zur Hydrolyse von PIP $_2$ in IP $_3$ und DAG. Während IP $_3$ die Ca $^{2+}$ -Mobilisation und die Aktivierung der Phosphatase Calcineurin bewirkt, aktiviert DAG den Ras-Raf-MAP-Kinase Signalweg. Letzterer ist hauptsächlich für die Einleitung der Proliferation verantwortlich. Noch nicht geklärt ist, ob das Transmembran-Adaptermolekül PAG konstitutiv Tyrosin-phosphoryliert und mit CSK assoziiert vorliegt (c). In der Abbildung sind weitere Rezeptoren und Signalmoleküle gezeigt, die einen Einfluss auf das BZR-Signal haben, auf die aber nicht näher eingegangen wird (e, f, und SIT). © Leo und Schraven 2001

1.4.3 Möglichkeiten der Regulation des BZR-Signals

Wie bereits mehrfach erwähnt, ist das BZR-Signal sowohl für das Überleben und die negative Selektion während der B-Zellentwicklung im Knochenmark, als auch für die Proliferation und Differenzierung der reifen B-Zellen in Plasmazellen, Gedächtniszellen oder die Umwandlung in andere B-Zellpopulationen verantwortlich. Auch Apoptose wird über den BZR induziert. Ein Rezeptor, der als Signal nur über „an“ oder „aus“ Modi verfügt, wäre nicht in der Lage, diese Vielfalt an Signalen zu bewirken. Verschiedene Modelle werden diskutiert,

in denen das BZR-Signal in seiner Qualität und Quantität entsprechend der Situation modifiziert werden könnte.

Während der B-Zellentwicklung im Knochenmark wurden Unterschiede in der Lokalisation des prä-BZR und des BZR beschrieben. Von Guo et al. (2000) wurde gezeigt, dass im prä-B-Zellstadium ein Teil des funktional rearrangierte prä-BZR konstitutiv in den Membran-Mikrodomänen lokalisiert ist. Dort entsteht das Überlebenssignal des prä-BZRs. Durch Kreuzvernetzung der prä-BZRs werden mehr Rezeptoren in die Mikrodomänen gezogen und das prä-BZR-Signal steigt an (Guo et al., 2000). Ob ein Ligand für die weitere Entwicklung der prä-B-Zelle notwendig ist, ist noch nicht geklärt. Im Gegensatz dazu werden im unreifen B-Zellstadium die BZR von den „lipid rafts“ ausgeschlossen (Sproul et al., 2000; Chung et al., 2001). Möglicherweise kommt es in unreifen B-Zellen nach Bindung von (Auto)-Antigen außerhalb der Mikrodomänen zur Signalinitiation, was Apoptose induziert. Die BZRs reifer B-Zellen befinden sich im ruhenden Zustand außerhalb der Membran-Mikrodomänen. Nach Binden von Antigen bewegen sie sich in die „lipid rafts“. Dort entstehen Signalkomplexe, die die Signalinitiation ermöglichen. Auf Grund dieser Unterschiede in der Lokalisation des prä- bzw. BZRs während der Entwicklung ergab sich das Modell des entwicklungspezifischen Lokalisation des BZRs und der daraus resultierenden Signalvariabilität (Pierce, 2002).

Michael Reth (2001) zufolge erreicht obiges Modell eine noch nicht ausreichende Variabilität der benötigten BZR-Signale. Aus diesem Grund schlägt er vor, dass der BZR-Komplex nicht als monomeres Heterodimer, bestehend aus einem mIgM und Ig α /Ig β , in der Zellmembran vorliegt, sondern als Oligomer. Durch die hydrophile Transmembranregion des mIgM könnten sich vier BZR-Komplexe in der Membran zusammenlagern. Organisiert sich der prä-BZR nach diesem Modell zu der oligomeren Struktur, wird das Überlebenssignal initiiert. Die positiv selektierte B-Zelle reift weiter zur unreifen B-Zelle. Bindet sie in diesem Stadium Autoantigen, wird die von Reth vorgeschlagene oligomere BZR-Struktur zerstört, was die negative Selektion der autoreaktiven B-Zelle einleitet. Reife B-Zellen benötigen zum Überleben ein sogenanntes Überlebenssignal (Lam et al., 1997). Bisher ist noch nicht geklärt, wie die auf der Oberfläche verteilten monomeren BZRs permanent ein minimales Signal erzeugen. Entsprechend dem Modell von M. Reth würde das Überlebenssignal von dem oligomeren BZR-Komplex ausgehen. Kreuzvernetzung der BZR-Komplexe durch Antigen würde das Aktivierungssignal vervielfachen. Durch das vorgestellte Modell kann zwischen dem positiven Signal des prä-BZR, das durch die Formierung des oligomeren BZR-Komplexes möglich ist, dem negativen Selektionssignal, das durch die Aufhebung des oligomeren BZR-Komplexes entsteht, einem Überlebenssignal der wahrscheinlich quartären BZR-Komplexe und dem stimulierenden Signal nach Antigen-Bindung unterschieden

werden. Zukünftige Experimente müssen zeigen, in wie weit dieses Gedankenmodell der Realität entspricht.

B-Zellen bedienen sich neben der Lokalisation des BZR und dessen möglichen oligomeren Struktur noch einer Reihe von Oberflächenrezeptoren, um das BZR-Signal zu modulieren: Co-stimulatorische Rezeptoren und „accessory molecules“ wie CD19, CD21, CD22, CD72, usw. haben einen direkten Einfluss auf das BZR-Signal. CD22 ist eines der „accessory molecules“, das einen inhibitorischen Einfluss auf das BZR-Signal hat. Die Wirkungsweise von CD22 auf das BZR-Signal wird in Kapitel 1.5. erläutert.

Die Qualität und Quantität des induzierten BZR-Signals ist abhängig von dem Entwicklungsstatus der B-Zelle, von der Art des Antigens und von den involvierten Co-Rezeptoren und „accessory molecules“. Je nach Stimulation werden intrazellulär die unterschiedlichen Signalwege eingeleitet, moduliert oder inhibiert. Im Laufe der letzten Jahre wurde deutlich, dass Adaptermoleküle eine essentielle Aufgabe in der Organisation von Signalwegen übernehmen. Ein Beispiel ist das in T-Zellen beschriebene Adaptermolekül LAT. Nach TZR-Stimulation formiert das transmembrane Adaptermolekül einen Multiproteinkomplex, der Voraussetzung für die Aktivierung der T-Zelle ist. In B-Zellen wurde bisher das cytoplasmatische Adaptermolekül SLP-65/BLNK beschrieben, das vergleichbar dem LAT Molekül die Signalmoleküle rekrutiert. In SLP-65/BLNK-defizienten B-Zellen kann kein Ca^{2+} -Signal gemessen werden und die Aktivität der MAP-Kinasen ist reduziert (Fu et al., 1998; Wienands et al., 1998; Ishiai et al., 1999). Adaptermoleküle übernehmen eine essentielle Aufgabe in der Initiation und Regulation des BZR-Signals. Im nächsten Kapitel wird das Adaptermolekül SLP-65/BLNK beschrieben.

1.4.4 Das Adaptermolekül SLP-65/BLNK

Von Fu et al. (1997) wurde das Homolog des Adapterproteins SLP-76 aus T-Zellen als pp68 und pp70 in humanen B-Zellen erstmals beschrieben. Auch die Interaktion mit Grb-2, Vav und PLC γ 2 nach BZR-Stimulation wurde gezeigt. Im Folgenden wurde das Adaptermolekül SLP-65 (**S**H2-Domain Containing **L**eukocyte **P**rotein of **65** kD, Wienands et al., 1998) oder BLNK (**B** Cell **L**inker **P**rotein, Fu et al., 1998) oder BASH (**B** Cell **A**daptor Containing **S**rc **H**omology 2 Domain, Goitsuka et al. 1998) von verschiedenen Gruppen intensiv untersucht. In dieser Arbeit wird das Adaptermolekül SLP-65/BLNK genannt.

Als eines der am frühesten Tyrosin-phosphorylierten Proteinen nach BZR-Stimulation hatten Wienands et al. (1998) das Adaptermolekül SLP-65 in der murinen B-Lymphoma Zelllinie

J558l μ m3 identifiziert. Fu et al. (1998) zeigten, dass nach Kreuzvernetzung der BZR die an Ig α -assoziierte Kinase Syk das Adaptermolekül BLNK phosphoryliert. Über die N-terminalen 5 SH2-Bindungsmotive (5 von insgesamt 17 Tyrosinen), einige zentrale Prolin-reiche Regionen (PRR) und die C-terminale SH2-Domäne interagiert BLNK mit einer Vielzahl von Signalmolekülen wie Btk, PLC γ 2 und Vav und anderen Adapterproteinen wie Grb2 und Nck (Fu et al., 1997 und 1998; Wienands et al., 1998; Hashimoto et al., 1999) Erst kürzlich konnten Chiu et al. (2002) durch Mutationen der fünf Tyrosine in Phenylalanin zeigen, dass das Adaptermolekül drei potentielle PLC γ 2 Anlagerungsstellen aufweist. Nicht nur die Anlagerung von PLC γ 2 ist notwendig, um ein wildtypisches Ca²⁺-Signal zu initiieren, sondern auch die Bindung von Btk. Durch die Bindung von möglicherweise drei PLC γ 2 Proteinen hat SLP-65/BLNK sowohl die Aufgabe der Organisation der Signalmoleküle, als auch der Amplifikation des Signals.

Die von Pappu et al. (1999) und Jumaa et al. (1999) generierten SLP-65/BLNK knock-out Mäuse bestätigten die essentielle Rolle des Adaptermoleküls in der BZR-Signalentstehung. Da während der Dissertation mit der SLP-65-defizienten Maus von H. Jumaa gearbeitet wurde, wird deren Phänotyp näher beschrieben. Ein Merkmal der SLP-65-defizienten Mäuse ist der Entwicklungsblock der B-Zellen im Knochenmark. Im Stadium der prä-B-Zellen (Fraction C: B220⁺CD43⁺) entwickeln sich die meisten B-Vorläuferzellen nicht weiter. Entsprechend erreichen 5- bis 10-fach weniger reife B-Zellen die Milz von SLP-65-defizienten Mäusen. Des Weiteren fehlen die B1 Zellen im Peritoneum. Die essentielle Funktion des Adaptermoleküls in der Entstehung des BZR-Signals wird deutlich, wenn nach BZR-Stimulation die Ca²⁺-Mobilisierung gemessen wird. In B-Zellen aus der Milz von SLP-65-defizienten Mäusen ist kein Ca²⁺-Signal messbar.

Durch das Fehlen der B1 Zellen im Peritoneum der SLP-65-defizienten Mäuse sind die IgM und IgG₃ Serum-Titer stark reduziert. Auch nach Immunisierung mit TNP-Ficoll konnten keine spezifischen IgM Antikörper der T-Zellen unabhängigen (TI-type2) Immunantwort gemessen werden. Im Gegensatz dazu wurde nach Immunisierung mit TNP-BSA eine sehr schwache IgM und eine normale IgG₃ T-Zellen abhängige (TD) Immunantwort induziert.

Generell übernimmt das Adaptermolekül SLP-65/BLNK eine zentrale Rolle bei der Entstehung des BZR-Signals, das sowohl während der B-Zellentwicklung im Knochenmark, als auch bei der Aktivierung der B-Zellen in der Peripherie.

1.5 Die Wirkung von CD22 auf das BZR-Signal

1.5.1 Das „accessory molecule“ CD22

CD22 wurde bereits als inhibitorisch wirkender Modulator des BZR-Signals vorgestellt. Das Typ-I Transmembranprotein wird ausschließlich auf B-Zellen vom Prä-B-Zellstadium (Fraktion C'-D) an exprimiert (Doerken et al., 1996; Stoddart et al., 1997). Während der B-Zellentwicklung im Knochenmark und der Reifung in der Peripherie steigt die Menge an CD22 auf der Oberfläche der B-Zellen kontinuierlich an (Nitschke, et al., 1997; Stoddart et al., 1997). Auf Plasmazellen ist kein CD22 nachweisbar (Doerken et al., 1986; Wilson et al., 1991). Stamenkovic und Seed (1990) ordneten CD22 durch die Charakterisierung der humanen cDNS in die Immunglobulin-Superfamilie (slg) ein. In der Maus besteht CD22 aus sieben extrazellulären immunglobulin-ähnlichen Domänen, einer transmembranen Region und einer intrazellulären Domäne. Im zytoplasmatischen Teil von CD22 befinden sich sechs Tyrosine. Auf die extrazelluläre Adhäsionsdomäne von CD22 wird in Kapitel 1.6. näher eingegangen.

Anfängliche funktionelle Untersuchungen an CD22 ließen vermuten, dass CD22 einen verstärkenden Einfluss auf das BZR-Signal habe. Wurde CD22 mit einem monoklonalen Antikörper kreuzvernetzt, sank die benötigte Konzentration an anti- μ Antikörper, um Proliferation zu induzieren (Pezzutto et al., 1987). Auch die Assoziation von CD22 mit positiv wirkenden Signalmolekülen wie Lyn, Syk und PI3K unterstützte diese Vermutung (Tuscano et al., 1996a). Werden CD22 Moleküle mit einem Antikörper ligiert, initiiert dies die Tyrosin-Phosphorylierung von CD22 und die Rekrutierung von Kinasen (Tuscano et al., 1996b). Leprince et al. und Peaker et al. (beide 1993) konnten durch die Co-Präzipitation von CD22 mit dem BZR eine physiologische Interaktion zwischen CD22 und dem BZR-Komplex nachweisen. Bereits eine halbe Minute nach BZR-Kreuzvernetzung sind die Tyrosine in der zytoplasmatischen Domäne von CD22 phosphoryliert (Leprince et al., 1993; Schulte et al., 1992; Peaker et al., 1993).

Die inhibitorische Wirkung von CD22 auf das BZR-Signal wurde erwogen, nachdem nach BZR-Stimulation die Interaktion von CD22 mit der Tyrosin-Phosphatase SHP-1 gezeigt worden war (Campbell et al., 1995; Doody et al., 1995). Doody et al. (1995) benutzten Glasperlen, an die anti-CD22 Antikörper gebunden worden war, um CD22 kreuzzuvernetzen und damit vom BZR-Komplex wegzuziehen. Dadurch reduzierte sich die benötigte Konzentration an Antikörper zur Induktion der Proliferation um das 10-fache. Die Vermutung kam auf, dass je nach räumlicher Beziehung von CD22 zum BZR, CD22 unterstützend oder inhibierend auf das BZR-Signal wirke.

1.5.2 Der Phänotyp CD22-defizienter Mäuse

Durch die Generierung der CD22-defizienten Mäuse wurde die inhibitorische Wirkung von CD22 auf das BZR-Signal bestätigt (O'Keefe et al., 1996; Otipoby et al., 1996; Sato et al., 1996; Nitschke et al., 1997). Werden B-Zellen aus der Milz von CD22-defizienten Mäusen mit anti-IgM Antikörper stimuliert, wird ein erhöhtes und verlängertes Ca^{2+} -Signal induziert. Der inhibitorische Einfluss von CD22 auf das BZR-Signal fehlt in CD22-defizienten B-Zellen. Während die B-Zellentwicklung im Knochenmark der CD22-defizienten Mäuse normal verläuft, scheint CD22 die B-Zellreifung zu beeinflussen. B-Zellen in CD22-defizienten Mäusen entwickeln sich schneller ins reife B-Zellstadium. In CD22-defizienten Mäusen ist die Anzahl an T2 B-Zellen ($IgM^{hi} IgD^{hi}$) reduziert und die Anzahl an reifen ($IgM^{lo} IgD^{hi}$) B-Zellen erhöht. Reife B-Zellen zirkulieren in der Peripherie voraktiviert, was durch eine zweifach gestiegene MHC-Klasse-II Expression nachweisbar ist. Auch die deutliche Reduktion an mIgM auf der Oberfläche der CD22-defizienten B-Zellen deutet auf eine Hyperaktivität der B-Zellen hin (Otipoby et al., 1996). Werden CD22-defizienten B-Zellen über den BZR stimuliert, steigt die Apoptoserate im Vergleich zu wildtypischen B-Zellen an. Dies könnte durch das erhöhte Ca^{2+} -Signal verursacht werden.

Nitschke et al. (1997) und Otipoby et al. (1996) konnten im Gegensatz zu O'Keefe et al. und Sato et al. (beide 1996) keinen Unterschied in den B1 Zellzahl feststellen. Allerdings fehlen im Knochenmark der CD22-defizienten Mäuse die rezirkulierenden $IgM^{lo} IgD^{hi}$ B-Zellen. Wie später von Nitschke et al. (1999) gezeigt wurde, übernimmt CD22 auch die Funktion eines Homing-Rezeptors ins Knochenmark. Ohne die Expression von CD22 auf der Oberfläche ist den rezirkulierenden B-Zellen der Eintritt ins Knochenmark nicht möglich.

In CD22-defizienten Mäusen sind die Serum Antikörper-Titer vergleichbar mit denen in Kontrollmäusen (Nitschke et al., 1997). Auch die T-zellabhängige (TD) Immunantwort verläuft normal. Allerdings reagieren die CD22-defizienten B-Lymphozyten mit einer dreifach niedrigeren IgM Antwort auf T-zellunabhängiges Antigen (TI-Typ2). Verantwortlich für die Immunantwort auf lösliches Antigen im Blut sind die B-Zellen in der Marginalzone der Milz, die in CD22-defizienten Mäusen fehlen (Samardzic et al., 2002). Eine weitere Auffälligkeit der CD22-defizienten B-Zellen ist deren etwa dreifach erhöhte Proliferation nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS).

1.5.3 Die inhibitorische Wirkung von CD22 auf das BZR-Signal

In der zytoplasmatischen Domäne von CD22 befinden sich sechs Tyrosine, von denen drei Bestandteil sogenannter ITIM-Sequenzen (**I**mmunoreceptor **T**yrosine-based **I**nhibitory **M**otifs: Ile/Val/Leu/Ser-x-Tyr-x-x-Leu/Val (Burshtyn et al., 1996; Vivier et al., 1997)) sind. Durch die Kreuzvernetzung der BZR werden die Src-Kinasen aktiviert. Wie bereits erwähnt, phosphoryliert die Src-Kinase Lyn die Tyrosine in der intrazellulären Domäne von CD22 (Chan et al., 1997; Nishizumi et al., 1998; Smith et al., 1998). An die beiden distalen ITIMs bindet die **SH2**-Domäne enthaltende Tyrosine **P**hosphatase SHP-1 (Blasioli et al., 1999; Yohannan et al., 1999; Otipoby et al., 2001). Durch die Interaktion beider SH2-Domänen von SHP-1 an CD22 wird die katalytische Aktivität der Phosphatase verstärkt (Doody et al., 1995). CD22 und der BZR-Komplex können co-präzipitiert werden (Leprince et al., 1993; Peaker et al., 1993), was auf eine direkte Nachbarschaft der beiden Moleküle schließen lässt. So bringt CD22 die aktivierte Phosphatase in die unmittelbare Nähe des BZR-Signalkomplexes, in dem die Substrate der Tyrosin-Phosphatase vermutet werden (siehe Abb.3). Unabhängig von CD22 wurden als Substrate der aktivierten SHP-1 Phosphatase innerhalb der BZR-Signalkaskade die Signalmoleküle $Ig\alpha/Ig\beta$, Lyn, Syk und SLP-65/BLNK nachgewiesen (Dustin et al., 1999; Mizuno et al., 2000; Adachi et al., 2001; Somani et al., 2001). Von Sato et al. (1997) wurde in CD22-defizienten B-Zellen nach BZR-Stimulation eine erhöhte Tyrosin-Phosphorylierung des Guanosin-Austauschfaktors Vav und von Fujimoto et al. (1999) eine gestiegenen Tyrosin-Phosphorylierung des aktivierenden Co-Rezeptors CD19 aufgezeigt.

Neben der Phosphatase wurde nach BZR-Stimulation auch die Assoziation von Lyn, Syk, PLC γ 2, Grb2-SOS und PI3K an die zytoplasmatische Region von CD22 nachgewiesen (Tuscano et al., 1996; Law et al., 1996; Yohannan et al., 1999). Die von Sato et al. und Otipoby et al. (beide 1996) durchgeführten Proliferationsstudien zeigten eine stark verminderte Proliferation der CD22-defizienten B-Zellen nach anti-IgM Stimulation. Aus diesem Grund wird vermutet, dass die positiv wirkenden Signalmoleküle an CD22 eine essentielle Aufgabe in der Induktion der Proliferation übernehmen. Allerdings überlagern sich die Bindungsmotive der verschiedenen positiv wirkenden Signalmolekülen, teilweise sogar mit der Bindungsstelle für SHP-1. In wie weit es zwischen den Signalmolekülen zur Konkurrenz um die Bindungsstellen in der zytoplasmatischen Domäne von CD22 kommt, konnte noch nicht geklärt werden. Zwar wird die Frage nach der aktivierenden Rolle von CD22 oft vernachlässigt, darf aber nicht ausgeschlossen werden.

1.6 CD22 als Adhäsionsmolekül

1.6.1 Die Familie der Siglecs

CD22 ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie und gehört zur Unterfamilie der Siglecs (Crocker und Varki, 2001). Diese Abkürzung steht für die Gruppe der Sialinsäure-bindenden Immunglobulin-ähnlichen Lectine (**S**ialic Acid **I**g-like **L**ectins). Siglecs werden hauptsächlich auf hämatopoietischen Zellen exprimiert. Bis vor fünf Jahren waren erst vier humane Siglecs bekannt, nämlich Sialoadhesin (Siglec1: Crocker et al., 1986), CD22 (Siglec2: Stamenkovic et al., 1990), CD33 (Siglec3: Simmons und Seed, 1988) und Myelin-assoziiertes Glycoprotein (MAG bzw. Siglec4: Kelm et al., 1994). Mittlerweile wurde im Menschen Siglec5-11 charakterisiert. Vor kurzem wurde hSiglec11 gefunden (Angata et al., 2002), wahrscheinlich das letzte Siglec im menschlichen Genom. Die Klonierung von Siglec5-11 verdeutlichte, dass diese Sialinsäure-bindenden Lectine eine größere Ähnlichkeit zu CD33, d.h. Siglec3 haben. So zählen Siglec3 und Siglecs5-11 zu den CD33-verwandten Siglecs. In der Maus konnten bisher nicht alle Homologe zu den humanen Siglecs gefunden werden. Bemerkenswerterweise liegt das CD22-Gen umrahmt von weiteren Mitgliedern der Siglec-Familie im Genom vor (Crocker et al., 1998), was auf ein gemeinsames Urgen hinweist.

Siglecs sind I-Typ Lectine, die N-terminal eine V-set Ig-Domäne aufweisen. Diese Domäne ist für die Spezifität der Interaktion mit Sialinsäure verantwortlich. Auf die V-set Domäne folgen eine unterschiedliche Anzahl sogenannter C2-set Ig-Domänen. Zwar findet die Sialinsäure-Erkennung und -Bindung ausschließlich durch die V-set Domäne statt, die Affinität von Sialoadhesin sinkt aber deutlich, werden die zwei nachfolgenden C2-set Domänen mutiert oder deletiert (Nath et al., 1995). Die Aufgabe der beiden N-terminalen C2-Domänen ist die Stabilisierung der V-set Domäne (Nath et al., 1995).

Voraussetzung für die Bindung von Sialinsäure an Siglecs ist ein in der V-set Domäne liegendes, hoch konserviertes Arginin. Der Austausch von diesem Arginin in Alanin in CD22 und Sialoadhesin führt zum fast völligen Verlust der Sialinsäure-Bindung (van der Merwe et al., 1996). In murinem CD22 liegt die Aminosäure an Position R130 und in Sialoadhesin an Position R97. Durch die Kristallstruktur von Sialoadhesin mit gebundener Sialyllaktose wurden die Besonderheiten der V-set Domäne deutlich (May et al., 1998). Abweichend von der allgemeinen Immunglobulin-Domäne befindet sich in der V-set Domäne eine intra- β Faltblatt Disulfidbrücke. Weiterhin ist der G-Strang in zwei kürzere Teile unterteilt. Diese Anpassungen der Ig-Domäne ist Voraussetzung für die Sialinsäureerkennung und -bindung.

1.6.2 Der Ligand von CD22

Die V-set Domäne von CD22 bindet ausschließlich alpha2,6-gekoppelte Sialinsäure. Diese gehört in die Familie der aus neun Kohlenstoffen bestehenden Zucker. In Säugetieren werden verschiedene Sialinsäurederivate und deren glykosidische Bindungen an Zucker unterschieden. Typischerweise werden die Sialinsäuren an das nicht-reduzierende, äußerste Ende der Oligosaccharidketten von Lipiden oder Proteinen angehängt. Die negative Ladung der Sialinsäuren auf der Zelloberfläche bedingt den Zell-Abstoßungs-Effekt (Cell Repulsion Effect). Neben dieser allgemeinen Funktion haben die Sialinsäuren noch die spezifische Funktion als Liganden von Adhäsionsmolekülen. Sie vermitteln dadurch spezifischen Zell-Zell-Interaktionen.

Die Frage nach dem spezifischen Glykoprotein-Liganden von CD22 konnte noch nicht geklärt werden. Pull-down Experimente mit einem rekombinanten CD22-Rg Molekül wiesen auf eine bevorzugte Interaktion mit verschiedenen CD45-Isoformen hin (Stamenkovic et al., 1992). Allerdings verdeutlichten Bindungsstudien mit einem CD22-Ig Fusionsprotein, dass alpha2,6 Sialinsäure sehr stark auf B- und T-Zellen, und schwächer auf nicht-hämatopoietischen Zellen exprimiert wird (Law et al., 1995). In Mäusen wurde nach Injektion eines löslichen CD22-Ig Fusionsproteins das alpha2,6 Sialinsäure tragende sinusoidale Endothel im Knochenmark angefärbt (Nitschke et al., 1999). Für das Homing der reifen B-Zellen zurück ins Knochenmark übernimmt die Liganden-Bindung von CD22 eine essentielle Rolle. Nach vielen Versuchen, den spezifischen Liganden von CD22 zu finden, wurde von Bakker et al. (2002) in Bindungsstudien gezeigt, dass CD22 alpha2,6-gekoppelte Sialinsäure unabhängig vom Protein-Gerüst erkennt. Eine spezifische Interaktion von CD22 mit einem alpha2,6 Sialinsäure tragenden Liganden scheint daher ausgeschlossen zu sein.

Die meisten Oberflächenmoleküle auf B-Zellen sind durch alpha2,6-gekoppelter Sialinsäure modifiziert. So könnte CD22 sowohl mit der Sialinsäure auf derselben Zelloberfläche (cis-Bindung), als auch mit Sialinsäure-tragenden Oberflächenmolekülen auf benachbarten Zellen (trans-Bindung) interagieren (siehe Abb.3). Mit einer synthetischen alpha2,6-Sialyllaktose tragenden PAA-bio (Poly-Acrylamid) Probe zeigten Razi und Varki (1998), dass auf unstimulierten humanen B-Zellen CD22 an alpha2,6 Sialinsäure derselben Zelle gebunden vorliegt, was „CD22-Maskierung“ genannt wird. Sowohl die hohe Konzentration an endogener alpha2,6-gekoppelter Sialinsäure, als auch die für Kohlenhydratinteraktionen typische geringe Bindungsaffinität von CD22 zu alpha2,6 Sialinsäure unterstützen die cis-Maskierung von CD22 auf ruhenden B-Zellen. Nach Stimulation der B-Zellen mit IL-4 und

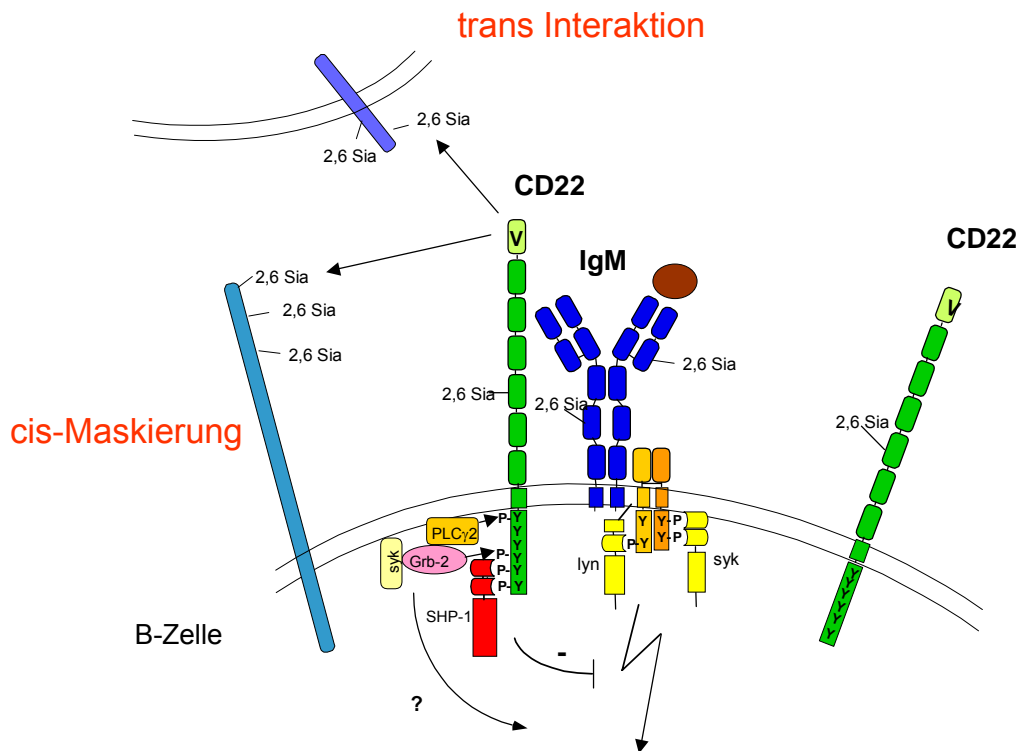


Abbildung 3: **Möglichkeiten der Ligandbindung von CD22**

Die Lektin-Domäne von CD22 bindet spezifisch alpha2,6-gekoppelte Sialinsäure. Interaktionen von CD22 mit alpha2,6 Sialinsäure-tragenden Liganden sind sowohl in trans, als auch in cis möglich. Auf ruhenden B-Zellen ist CD22 gewöhnlich cis-maskiert. Eine spezifische Interaktion von CD22 mit einem alpha2,6 Sialinsäure tragenden Liganden scheint ausgeschlossen, da das Proteingerüst des Liganden nicht zur Erkennung beiträgt. Nach Ag-Bindung werden die cytoplasmatischen Tyrosine von CD22 phosphoryliert, was Voraussetzung für die Bindung der Phosphatase SHP-1 und auch der positiv wirkenden Signalmoleküle ist. Die aktivierte Phosphatase SHP-1 hat einen inhibierenden Einfluss auf das BZR-Signal. In wie weit die positiv wirkenden Signalmoleküle das BZR-Signal beeinflussen, ist noch nicht klar.

CD40 sinkt der Anteil an Sialinsäure auf der Zelloberfläche und die Adhäsionsdomäne von CD22 kann mit der synthetischen Probe angefärbt werden (Razi und Varki, 1998).

Aus den Beobachtungen ergab sich die Vorstellung, dass auf naiven, reifen B-Zellen in der Peripherie CD22 maskiert vorliegt. Eine trans Interaktion mit anderen Zellen ist daher nicht möglich. Wird die B-Zelle aber über den BZR stimuliert, so wird die V-set Domäne von CD22 frei und für Sialinsäure-tragender Moleküle in trans zugänglich. Auf rezirkulierenden, reifen B-Zellen im Knochenmark (Floyd et al., 2000) und auf aktivierten Subpopulationen von B-Zellen in der Milz (unpublizierte Daten von C. Danzer) konnte unmaskiertes CD22 nachgewiesen werden.

1.6.3 Die Funktion der Adhäsionsdomäne von CD22

Die cis-Maskierung von CD22 könnte folgende Aufgaben von CD22 regulieren: a.) Durch die cis-Maskierung werden Zell-Zell-Interaktionen verhindert. In bestimmten Entwicklungs- und Reifestadien der B-Zelle wird die Sialinsäure herunterreguliert, CD22 wird frei und interagiert beispielsweise mit dem sinusoiden Epithel am Knochenmark (Nitschke et al., 1999) b.) Die cis-Bindung von spezifischen Liganden auf derselben Zelloberfläche, beispielsweise dem BZR, könnte die Lokalisation von CD22 festlegen. c.) Lanoue et al. (2002) verwiesen auf eine mögliche Funktion der CD22 - alpha2,6 Sialinsäure Interaktion. Prokaryoten haben im Gegensatz zu Eukaryoten keine alpha2,6 Sialinsäure auf der Oberfläche. Erkennt in vitro eine B-Zelle eine Antigen-präsentierende Zelle, die keine alpha2,6 Sialinsäure auf der Oberfläche trägt, fehlt der Ligand für CD22, wodurch die B-Zelle aktiviert wird. Interagiert CD22 dagegen mit einer alpha2,6 Sialinsäure tragenden Zelle, so bindet CD22 an Sialinsäure, wodurch das BZR-Signal inhibiert wird. Durch die Modifikation der jeweiligen Zelle mit alpha2,6 Sialinsäure oder dem Fehlen der alpha2,6 Sialinsäure wird es möglich, dass die B-Zelle zwischen selbst und fremd unterscheiden kann.

Unabhängig davon, welche der vorgestellten Aufgaben CD22 übernimmt, wird die Demaskierung von CD22 reguliert. Bisher kommen dafür zwei Möglichkeiten in Betracht: zum einen könnte die Aktivität der alpha2,6 Sialinsäuretransferase (ST6Gal1) an den Aktivierungs- oder Entwicklungsstatus der B-Zelle gekoppelt sein. So würde in Abhängigkeit der Situation der B-Zelle das Enzym, das im Golgi-Apparat die Sialinsäure an die Zuckerketten anhängt, vorliegen oder nicht. Zum anderen wäre es auch denkbar, dass eine Sialidase die Sialinsäure auf der Zelloberfläche reduziert. Sialidase wurde auf der Oberfläche von B- und T-Zellen (Guthridge et al., 1994; Chen et al., 1997), und von Bakterien gefunden (Crocker und Varki, 2001). Die Regulation der Sialidaseexpression auf der Oberfläche der Zellen konnte bisher noch nicht geklärt.

1.7 Motivation und Ziele der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die inhibitorische Wirkung von CD22 auf das BZR-Signal molekular zu definieren. In vergleichenden Analysen von CD22-defizienten und Kontroll-B-Zellen sollte nach BZR-Stimulation das Tyrosin-Phosphorylierungsmuster von proximalen Signalmolekülen verglichen werden. Die Arbeitshypothese war, dass in CD22 defizienten B-Zellen das Substrat der an CD22 aktivierten Tyrosin-Phosphatase SHP-1 stärker Tyrosin-phosphoryliert sein sollte.

In CD22-defizienten B-Zellen wurde nach BZR-Stimulation eine frühere und stärkere Tyrosin-Phosphorylierung des Adaptermoleküls SLP-65/BLNK gefunden. Den molekularen Zusammenhang zwischen CD22, der Phosphatase SHP-1 und dem Adaptermolekül SLP-65/BLNK sollten *in vitro* Transfektionsexperimente bestätigen. Dafür wurde die Plasmazytom-Zelllinie J558L μ m3 ausgewählt, da sie kein CD22 exprimiert und in ihr das Adaptermolekül SLP-65/BLNK charakterisiert worden war. Für die Transfektion standen Expressionsvektoren, codierend für wildtypisches CD22 und CD22 mit substituierten ITIM-Motiven, zur Verfügung. Des Weiteren sollte durch die Doppeltransfektion von CD22 mit der dominant-negativen Variante von SHP-1 die direkte Wirkung der Phosphatase auf das Adaptermolekül bewiesen werden.

Schließlich sollte mit Hilfe von SLP-65xCD22-doppel-defizienten B-Zellen die Wirkung von CD22 auf das Adaptermolekül geklärt werden. Dazu wurden SLP-65 und CD22 knock-out Mäuse gekreuzt. Die Charakterisierung der doppel-defizienten Mäuse sollte die biologischen Auswirkungen der Deletion des Inhibitors CD22 und des Aktivators SLP-65 aufzeigen.

Auf ruhenden B-Zellen bindet CD22 an alpha2,6 Sialinsäure tragende Liganden auf derselben Zelle. Bisher war der Zusammenhang zwischen der Adhäsionsdomäne von CD22 und dessen intrazellulärer, inhibitorischer Wirkung noch nicht untersucht worden. Synthetische Sialoside standen zur Verfügung, mit denen die Notwendigkeit der extrazellulären Domäne von CD22 für die inhibitorische Funktion geklärt werden sollte. Dafür musste zunächst die ausschließliche Spezifität der Sialoside für CD22 bestätigt werden. Anschließend sollte gezeigt werden, welche Auswirkung die Störung der CD22-Liganden Interaktion auf das intrazelluläre BZR-Signal hat.

Als Nebenprojekt sollte eine Erklärung für die dreifach stärkere Proliferation von CD22-defizienten B-Zellen im Vergleich zu Kontroll-B-Zellen nach LPS-Stimulation gefunden werden. Da erste Analysen eine deutlich frühere und höhere Expression des

transkriptionellen Co-Aktivators BOB.1/OBF.1 in CD22-defizienten B-Zellen nach LPS-Stimulation ergaben, wurden BOB.1/OBF.1xCD22-doppel-defizienten Mäuse charakterisiert.

2 Material

2.1 Antibiotika

Neomycin (G418)	Gibco
Penicillin	Grünthal, Stolberg
Streptomycin	Fatol GmbH, Schiffweiler
Zeocin	Invitrogen, Niederlande

2.2 Antikörper

2.2.1 Antikörper für die B-Zell-Stimulation

Name	Referenz	Konzentration
Anti human		
Maus anti human IgM (BU.1)	The Binding Site, UK	10 μ g/ml
Ziege F(ab') ₂ anti human IgM Fc _{5μ}	Jackson, Dianova, Hamburg	1-5 μ g/ml
Anti murin		
Ziege F(ab') ₂ anti Maus κ Kette	Southern Biotechnology	5-10 μ g/ml
Ziege F(ab') ₂ anti Maus μ Kette	Southern Biotechnology	10-20 μ g/ml
Kaninchen anti Maus IgM und IgG	Jackson, Dianova, Hamburg	10-20 μ g/ml
Ratte anti Maus μ Kette (B7-6)	Arbeitskreis	10-30 μ g/ml
2.4G2 Ratte anti Maus Fc γ R _{2b}	Arbeitskreis	1:100

Tab. 1: Antikörper für die B-Zell-Stimulation

2.2.2 Antikörper für die B-Zell-Aufreinigung

Name	Referenz	Konzentration
RL174.2 (anti CD4)	Arbeitskreis	1ml / 2Milzen
3.168.1 (anti CD8)	Arbeitskreis	1ml / 2Milzen

Tab. 2: Antikörper für die B-Zell-Aufreinigung

2.2.3 Antikörper für die Durchflußzytometrie

Name	Referenz	Konzentration
2.4G2	Arbeitskreis	1:100
Ratte anti Maus Fc γ R _{2b}		
Anti-B220 bio (Klon RA3 6B2)	Arbeitskreis	1:300
Anti-B220 FITC, Cy (Klon RA3 6B2)	PharMingen, Hamburg	1:200
Anti-CD4 PE (Klon L3T3)	PharMingen, Hamburg	1:300
Anti-CD5 bio (Klon 53-7.3.)	PharMingen, Hamburg	1:200-300
Anti-CD5 PE (Klon 53-7.3.)	PharMingen, Hamburg	1:80
Anti-CD8 FITC (Klon B2)	PharMingen, Hamburg	1:300
Anti-CD11b (Mac.1)	PharMingen, Hamburg	1:100
Anti-CD19 FITC	Arbeitskreis	1:50
Anti-CD21 bio (Klon 7E9)	Arbeitskreis	1:300
Anti-CD21 FITC (Klon 7E9)	Arbeitskreis	1:300
Anti-CD22 PE (Klon Cy34.1)	PharMingen, Hamburg	1:100
Anti-CD23 FITC (Klon B3B4)	Arbeitskreis	1:50
Anti-CD23 PE (Klon B3-B4)	PharMingen, Hamburg	1:100
Anti CD43 PE	PharMingen, Hamburg	1:100
Anti-IgM bio / FITC (Klon B7-6)	Arbeitskreis	1:50
(Klon 29-11)		1:50
Anti-IgM PE F(ab')₂	Caltac Laboratories, Burlingame CA	1:50
Anti IgD bio (Klon 11-26C)	Arbeitskreis	1:400
Anti IgD FITC (Klon 11-26C)	PharMingen, Hamburg	1:100
Anti-Thy1.2 (CD90.2)	PharMingen, Hamburg	1:500-1000
CD22-Fc	Von P. Crocker	1:50
Esel anti human IgG F(ab')₂	Jackson, Dianova, Hamburg	1:100
N-Gc-Sia-PAA bio	Von B. Collins	1:50
Streptavidin PE	PharMingen, Hamburg	1:100
Streptavidin Cy Chrom	PharMingen, Hamburg	1:300

Tab. 3: Antikörper für die Durchflußzytometrie

2.2.4 Antikörper für Immunoblot-Analyse

Name	Referenz	IP	WB
Kaninchen anti-mBLNK/SLP65	Geschenk von A. Chan	4µg	1:2000-5000
Kaninchen anti-mBLNK/SLP65	Arbeitskreis (7475) (7476)		1:2000 1:1000
Kaninchen anti-hCD22	DAKO	2-3µg	
Ziege anti-hCD22	Santa Cruz, Heidelberg		1:1000-2000
Kaninchen anti-mCD22	Geschenk von P.Crocker	2-4µg	1:3000
Maus anti-hCD45	Santa Cruz, Heidelberg	4µg	
Ziege anti-hCD45 (N-19)	Santa Cruz, Heidelberg		1:150
Ziege anti-hIgM + IgG	Jackson, Dianova, Hamburg	2-3µg	
Kaninchen anti-hIgM	DAKO		1:2500
Kaninchen anti-mLyn (44-R)	Santa Cruz, Heidelberg		1:2000
Maus anti-mLyn (H-6)	Santa Cruz, Heidelberg		1:1000
Ziege anti-mLyn (44-G)	Santa Cruz, Heidelberg		
Maus anti Phospho.-Tyrosin (4G10)	UBI, Hamburg	1-3µg	1:7500-10.000
Kaninchen anti-mPLCγ2 (Q-20)	Santa Cruz, Heidelberg	1-3µg	1:1000
Maus anti-mPLCγ2	UBI, Hamburg	2-4µg	
Kaninchen anti-mSHP-1	UBI, Hamburg	1-3µg	1:500
Kaninchen anti-mSyk Serum	Geschenk von L. Pao	3µl	1:500-1000
Kaninchen anti-mVav1 (C-14)	Santa Cruz, Heidelberg	2-4µg	
Kaninchen anti-mVav1	UBI, Hamburg		1:10.000
Peroxidase-konjugiertes Maus anti-Ziege IgG	Jackson, Dianova, Hamburg		1:5000-10.000
Peroxidase-	Jackson, Dianova,		1:5000-10.000

konjugiertes Maus anti-Kaninchen IgG	Hamburg	
Peroxidase- konjugiertes Ziege anti-Maus IgG	Amersham, Braunschweig	1:5000-10.000

Tab. 4: Antikörper für Immunoblot-Analyse

Die angegebenen Konzentrationen und Verdünnungen der Antikörper und Seren sind als Richtwerte zu sehen, die für die jeweilige Charge neu ausgetestet werden sollten.

2.3 Bakterienstämme

E. coli:

- TOP10 F' (Invitrogen)
- BL21 (Proteasen reduzierter Stamm, besonders geeignet für die Expression von rekombinanten Proteinen; Invitrogen)

2.4 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

In nachfolgender Liste wurden die allgemein in einem Labor vorhandenen Chemikalien **nicht** aufgeführt.

Brij 96 (Polyoxyethylen)	Sigma, Deisenhofen
CNBr-aktivierte Sepharose	Pharmacia Biotech, Freiburg
Diethanolamin	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Roth, Karlsruhe
ECL Western Blotting Detektions Reagenz	Amersham
Glutathion Sepharose 4B	Pharmacia Biotech, Freiburg
Hybond ECL-Membran	Amersham
Kaninchen Komplement	Cedarlane, Biozol
LPS (P. aeruginosa)	Calbiochem
Magermilchpulver	Heirler, GmbH
Micro BCA Proteinbestimmung	Pierce
NP 40 (Nonylphenoxypolyethoxyethanol)	Sigma, Deisenhofen

Protein A-Sepharose CL4B	Pharmacia Biotech, Freiburg
Protein G-Sepharose CL4B	Pharmacia Biotech, Freiburg
Proteinstandard (Rainbowmarker full range)	Amersham
p-Nitrophenyl Phosphat (pNPP)	Sigma, Deisenhofen
Röntgenfilm RX	Fuji
Roti-Load (reduzierender Proteinladepuffer)	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Sialidase (A. ureafacies)	Roche, Mannheim
TritonX-100	Sigma, Deisenhofen
Tween20	Sigma, Deisenhofen

2.5 Inhibitoren

2.5.1 Protease- und Phosphatase-Inhibitoren

Aprotinin	Roche Diagnostics, Mannheim
Leupeptin	Boehringer, Mannheim
Natrium-ortho-vanadat	Sigma, Deisenhofen
PMSF (Phenylsulfonylfluorid)	Sigma, Deisenhofen

2.5.2 Synthetische Sialoside

Methyl-alpha-9-Neu5Ac	Me-Neu5Ac
Methyl-alpha-9-N-(biphenyl-4-carbonyl)- amino-9-deoxy-Neu5Ac	BPC-Neu5Ac
Methyl-alpha-9-N-(biphenyl-4-acetyl)- amino-9-deoxy-Neu5Ac	BPAc-Neu5Ac

Die Inhibitoren wurden von Reinhard Brossmer am Zentrum für Biochemie in Heidelberg synthetisiert.

2.6 Puffer, Medien und Lösungen

2.6.1 Puffer und Medien für das Arbeiten mit Zellen

1x BSS (*balanced salt solution*)

	100 ml 10x BSSI
	100 ml 10x BSSII
	1l H ₂ O
	ad
1x BSS I	5,55mM Glukose

		0,44mM KH_2PO_4 1,34mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,03mM Phenolrot in ddH ₂ O; steril filtrieren
1x BSS II		1,27mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 5,36mM KCl 137mM NaCl 1mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,8mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ in ddH ₂ O; steril filtrieren
Einfrriermedium		10% DMSO 40% FCS in RPMI ⁺ ; steril filtrieren
Gey's Lösung	mix	A : B : C : ddH ₂ O 20: 5 : 5 : 70, steril filtrieren
Lösung A	ad	35g NH_4Cl 1,85g KCl 1,5g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,12g KH_2P_4 5,0g Glukose 1l ddH ₂ O; steril filtrieren
Lösung B	ad	0,42 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,14g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,34g CaCl_2 oder 0,45g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100ml ddH ₂ O; autoklavieren
Lösung C	ad	2,25g NaHCO_3 100ml ddH ₂ O; steril filtrieren
LB-Medium	ad	20g LB Broth Base 1l H ₂ O; autoklavieren
10x PBS pH 7,2 (phosphate buffered saline)		171mM NaCl 3,4mM KCl 10mM Na_2HPO_4 1,8mM KH_2PO_4 in ddH ₂ O
Supplement complete (SC)		1% nicht essentielle Aminosäuren (MEM) 1mM Natrium-Pyruvat 0,07% L-Glutamat 0,05mM β -Mercaptoethanol

100U/ml Penecillin
100U/ml Streptomycin
1-10% FCS, hitzeinaktiviert

2.6.2 Puffer für ELISA

Diethanolamin-Puffer

1M Diethanolamin
0,5mM MgCl₂xH₂O
0,02% Azid
in ddH₂O, pH 9,8

2.6.3 Puffer für den Schwanz-Verdau

Lyse-Puffer

10 mM TrisHCl
5 mM EDTA
0,2% SDS
200 mM NaCl
in ddH₂O

2.6.4 Lösungen für SDS-PAGE

Elektrophorese Laufpuffer (5x)

25mM Tris
192mM Glycin
0,1% SDS
in ddH₂O

Blotting-Puffer

25mM Tris
192mM Glycin
20% v/v Methanol
in ddH₂O

Coomassie Blue-Färbelösung

0,125%w/v CoomassieBlueR250
45% v/v Methanol
9% v/v Essigsäure
in ddH₂O

Coomassie Blue-Entfärbelösung

5% v/v Methanol
7,5% v/v Essigsäure
in ddH₂O

2.6.5 Zellyse-Puffer

Standard Lyse-Puffer

5M NaCl	2,75ml
1M Tris pH7,8	5ml
Glycerin	10ml
10mM Na-o-Vanadat	10ml
0,5mM EDTA pH8	0,1ml
10% NP40	10ml
ddH ₂ O	62,15ml

je nachdem wird NP40 durch ein anderes Detergens ersetzt

TNE Lyse-Puffer

100-150mM Tris
70mM NaCl
0,1-1% Detergens nach Wahl
in ddH₂O

2.7 PCR-Primer

Die verschiedenen knock-out Mäuse wurden mit Hilfe folgender Primer (von GeneScan, BioChip Technologies GmbH, Freiburg) typisiert:

CD22-Primer

CD22 ex12AS	5'>CTC GTC TTA CCT TTT TGT TCC TCA<3'
CD22 ex11-5B	5'>AGT CCA GAG ACC ATC GGC AAG<3'
CD22 2neo for 1	5'>GCG GGA AGG GAC TGG CTG CTA T<3'

SLP-65-Primer

SLP-65 wt I	5'>TCA AAC CTG GGT CTC AGA A<3'
SLP-65 2	5'>CTG CTG TCC TAA AGA CCA CA<3'
Neo 2A	5'>CGG AGA ACC TGC GTG CAA TC<3'

CD45-Primer

CD45 ex6-5	5'>GTC AGC ACC ACA GAT ATC TC<3'
CD45 ex7-3	5'>CCA GAG TGG ATG GTG TAA GA<3'
Neo 2A	5'>CGG AGA ACC TGC GTG CAA TC<3'

2.8 Plasmide und Vektoren

Plasmide

- prokariotisch: pGEX (Invitrogen)
- eukariotisch: pcDNS3.1 / Zeocin (Invitrogen)
pcDNS3.1 / Neomycin (Invitrogen)

2.9 Versuchstiere

C57BL/6J	Jackson, Institutshaltung
Bob -defiziente Mäuse Stamm: C57BL/6J	Zucht und Haltung unter T. Wirth
CD22 -defiziente Mäuse Stamm: C57BL/6J	Eigenzucht
CD45 -defiziente Mäuse Stamm: 129Sv rückgekreuzt nach C57BL/6J	Geschenk von R. Carsetti, Eigenzucht
SLP65 -defiziente Mäuse Stamm: BALB/c	Geschenk von H. Jumaa, Eigenzucht

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

3.1.1.1 Bestimmung der Zellzahl

Die Anzahl lebender Zellen in einer Zellsuspension wurde mittels Trypanblau-Anfärbung bestimmt. Trypanblau dringt durch die poröse Zellwand toter Zellen ein und interkaliert in die DNS. Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wurden die nicht blau gefärbten Zellen bei 40-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop gezählt. Die Zellzahl pro ml wurde nach Auszählen eines Quadranten (16 Felder) mit folgender Formel errechnet:

$$\text{Anzahl der gezählten Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 1 \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

3.1.1.2 Zentrifugieren von Zellen

Wenn nicht anders beschrieben, wurden alle Zentrifugationsschritte in einer Heraeus-Zentrifuge® bei 1.300rpm für 5 min und bei 4°C durchgeführt.

3.1.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Das Zellpellet von 1×10^6 - 1×10^7 Zellen wurde in 1ml eiskaltem Einfriermedium resuspendiert, in ein 1,8ml Kryo-Gefäß (Fa. Greiner) überführt und sofort maximal 10min auf Eis gestellt. Für 2-3 Tagen wurden die Zellen bei -80°C weiter abgekühlt und schließlich in Flüssigstickstoff gelagert.

Beim Auftauen der Zellen wurde beachtet, dass die Zellen so schnell wie möglich RT erreichten, damit das DMSO des Einfriermediums herausverdünnt werden konnte. Die Zellsuspension wurde in 10-20ml vorgelegtes RPMI⁺ pipettiert, zentrifugiert und das Pellet in frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden in verschiedenen Verdünnungen ausplattiert.

3.1.1.4 Gewinnung von Hybridomüberstand

Die Hybridomzellen wurden herangezogen, bis etwa 400ml dicht gewachsene Zellsuspension vorhanden waren. Dann wurde die gesamte Hybridomsuspension in eine Rollflasche (Roller Bottle) überführt und maximal 1:2 mit frischem Medium verdünnt. Über Nacht wurden die Zellen in einem 5% CO₂ Brutschrank begast. Am folgenden Morgen wurde die Flasche geschlossen und in einen Rollschrank bei 37°C für die folgenden ein bis eineinhalb Wochen rotiert. Erfahrungsgemäß wurde die beste Antikörperausbeute erzielt, wenn die Zellen rotierten, bis etwa 2/3 der Hybridomzellen tot waren. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand mit 0,1% Azid versetzt und die Antikörper im Kulturüberstand entsprechend dem Protokoll in Kapitel 3.2.1 aufgereinigt.

3.1.2 Stabile Transfektion von Zelllinien

3.1.2.1 Bestimmung der Antibiotikumtoxizität

Vor der Transfektion einer Zelllinie sollte die natürliche Resistenz der Zellen bzw. der toxische Schwellenwert des gewählten Antibiotikums ermittelt werden. Je nach Antibiotikum wurden untransfizierte Zellen unter Antibiotikumkonzentrationen von 0,1-3,0mg/ml gehalten. Dafür wurden die Zellen je nach Teilungsrate auf $1-5 \times 10^5$ Zellen pro ml Medium eingestellt und sechs Näpfe (eine Reihe) zu je 1ml auf 24-well Platten bestückt. Anschließend wurde jedem Napf 1ml des Selektionsmediums mit doppelter Konzentration zupipettiert. Die Wirkung des Antibiotikums dauerte zwischen 4-10 Tagen, während der die toten bzw. die lebenden Zellen gezählt wurden. Je nach Teilungsrate der Zellen wurde das Selektionsmedium erneuert. Wichtig zum Vergleich war hierbei die Kontrollreihe mit Normalmedium. Anhand der ermittelten Lebendzellzahl (Überlebensrate) in Abhängigkeit von der jeweiligen Antibiotikumkonzentration wurde der zelltypabhängige Toxizitätsschwellenwert mit Hilfe einer Kurve errechnet.

3.1.2.2 Durchführung der Elektroporation

Vor der Transfektion wurde die DNS mit einem Restriktionsenzym linearisiert. Anschließend wurde diese aufgereinigt, indem die lineare DNS durch ein Agarosegel aufgetrennt, herausgeschnitten und mit einem Gelelutionskit (Quiagen) wiedergewonnen wurde. Nach Ethanolpräzipitation wurde die DNS steril in 20-50 μ l ddH₂O gelöst. Pro Elektroporation wurden 5-20 μ g DNS eingesetzt.

Die Elektroporationsbedingungen wurden für jede zu transfizierende Zelllinie neu bestimmt. In Elektroporationen ohne DNS wurden das Elektroporationsmedium (d.h. dessen Salzkonzentration), die Höhe des Widerstandes und des Stromflusses ausgetestet. Es wurden die Elektroporationsbedingungen ausgewählt, bei denen nach der Elektroporation weder alle Zellen starben, noch die meisten Zellen überlebten. Mehr als die Hälfte der eingesetzten Zellen sollten die Elektroporation nicht überleben, um Einzelzellklone etablieren zu können. Bei den verwendeten Zellen wurde darauf geachtet, dass sie sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden.

Für den Elektroporationsansatz der Zelllinie J558L μ m3 wurden die Zellen mit RPMI⁻ gewaschen und auf 8×10^6 in 700 μ l RPMI⁻ eingestellt. In die Elektroporationsküvette wurden 5-20 μ g sterile DNS vorgelegt, die Zellsuspension daraufgegeben und 10min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 1000 μ F und 240V (Gene Pulser, Fa. Bio-Rad). Anschließend wurden die Zellen für 10min auf Eis abgekühlt.

3.1.2.3 Selektion der transfizierten Zellen

Um stabile Zellklone selektieren zu können, codierte der transfizierte Vektor sowohl für das Protein von Interesse, als auch für eine Antibiotikumresistenz. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in Abhängigkeit ihrer Teilungsrate ausplattiert, sodass während der Selektion Einzelzellkolonien unterscheidbar blieben. Für die J558L μ m3 Zellen hatte sich folgendes Schema bewährt: Die 700 μ l RPMI⁻ mit den elektroporierten Zellen wurden mit einer Glaspipette in der Küvette gut gemischt und in ein 15ml Röhrchen überführt. Anschließend wurde die Küvette mit weiteren 700 μ l RPMI⁻ gespült und diese ebenfalls überführt. Die elektroporierten Zellen wurden in Medium auf 5×10^4 , 5×10^3 und 5×10^2 pro ml

verdünnt. Pro Verdünnung wurde mindestens eine 24-well Platte bzw. mehrere Platten mit 5×10^2 Zellen pro ml ausplattiert. Für die ersten 24-48h nach der Elektroporation wurde Normalmedium benutzt. Danach wurde die Selektion begonnen, bei der das Antibiotikum in dem zuvor bestimmten Toxizitätsschwellenwert eingesetzt wurde. Einige Zellen wurden nicht unter Selektionsmedium gehalten, um einen Wachstums- bzw. Selektionsvergleich zu haben. Die gut wachsenden, resistenten Klone wurden schließlich im FACScan oder im Western-Blot auf die Expression des gewünschten Proteins getestet.

3.1.3 Isolierung von murinen B-Lymphozyten

3.1.3.1 Herstellung von Milzzellsuspensionen

Je nach Versuch wurden 6-12 Wochen alte Mäuse durch CO₂-Begasung und anschließendem Genickbruch getötet. Daraufhin wurde ihnen die Milz entnommen. Von der Milz wurden Gewebe und Fett entfernt und in 5ml eisgekühltes RPMI⁺ (enthält 5% FCS und Supplement Complete) gegeben. An der Sterilbank wurde die Milz mit dem Stempel einer 1ml Einmalspritze durch ein Sieb in eine 5cm Petrischale gerieben, die Suspension mit der Spritze aufgezogen und in ein 15ml-Röhrchen gegeben. Petrischale und Spritze wurden mit eisgekühltem RPMI⁺ gespült, das Medium zu der Zellsuspension zupipettiert und die Zellen herunterzentrifugiert.

In der Regel wurden zwei Milzen gleichzeitig homogenisiert. Entsprechend sind folgende Angaben für die Aufreinigung der B-Zellen aus **zwei Milzen**.

3.1.3.2 Lyse der Erythrozyten

Die Erythrozyten wurden mit Hilfe von Gey's-Lösung aus dem Milzhomogenisat entfernt. Hierbei wurde das Zellpellet in 10ml dieser hypotonischen Lösung resuspendiert, für 5min auf Eis inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Vor der weiteren Behandlung der Zellen wurde das nun weiße Zellsediment mit 10ml eiskaltem RPMI⁺ oder BSS/BSA (je nach weiterem Verwendungszweck) gewaschen. Um mögliche Zellklumpen zu entfernen, die durch die toten Erythrozyten entstanden, wurden die resuspendierten Zellen für 1min auf Eis gestellt, der Zelldebris absetzen lassen und der Überstand vorsichtig in ein frisches 15ml Röhrchen überführt.

3.1.3.3 Komplement-vermittelte T-Zell-Lyse

Um reine B-Zellen zu erhalten, wurden die rund 40% T-Zellen aus der Milzzellsuspension mit Hilfe der Komplement-vermittelten T-Zell-Lyse (C'-Lyse) entfernt. Laut den Protokollen in der Literatur wurden dazu mindestens drei Antikörper gegen T-Zell-Epitope verwendet. Neben einem anti-CD4 (Klon: RL174.2) und einem anti-CD8 (Klon: 3.168.1) Antikörper wurden noch anti-Thy1 (Klone 13-4, Klon-C oder AT83) Antikörper eingesetzt. In vergleichenden Versuchen konnte aber gezeigt werden, dass mit anti-CD4 und anti-CD8 Behandlung die gleiche B-Zell-Reinheit erreicht werden konnte, wie bei der Verwendung von drei anti-T-Zell Antikörpern. Daher wurden die mit BSS gewaschenen und abzentrifugierten Zellen (von zwei Milzen) in 1ml BSS resuspendiert, je 1ml Hybridomüberstand mit monoklonalem IgM anti-CD4 und anti-CD8 zupipettiert, und 30min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, mit BSS gewaschen, in 4,5ml BSS resuspendiert und 0,5ml Baby Kaninchen-

Komplement (Cedarlane, Biozol) dazugegeben. Die Zellen wurden bei 37°C für 45min im Wasserbad langsam geschüttelt. Nach der Lyse wurden die Zellen zentrifugiert, gewaschen und in RPMI⁺ oder 1% FCS RPMI⁺ aufgenommen.

Die Anzahl lebender Lymphozyten vor und nach der T-Zell-Lyse wurde mit Hilfe der Trypanblau-Anfärbung bestimmt (Kapitel 3.1.1.1). Als Kontrolle für die erfolgreiche B-Zell-Aufreinigung wurden etwa $1-5 \times 10^5$ Zellen vor und nach der T-Zell-Lyse für eine FACS-Anfärbung entnommen. Die Zellen wurden anti-CD4, anti-CD8 und anti-B220 oder anti-Thy1.2 und anti-B220 angefärbt. In der Regel wurde eine B-Zell-Reinheit von etwa 90% erreicht.

3.1.4 Stimulation von B-Zellen

3.1.4.1 Hungerphase der B-Zellen

Um den Aktivierungsgrad der B-Zellen zu minimieren, wurden sowohl primäre B-Lymphozyten nach der Aufreinigung, als auch B-Zellen von Zelllinien aus der Kultur, einer Hungerphase in Medium mit niedrigem FCS-Gehalt unterzogen. Hierfür wurden die Zellen in 1% FCS RPMI⁺ resuspendiert und bei 37°C für mindestens 1h im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Phase wurden die Zellen in der Neubauer-Zählkammer gezählt, und je nach Versuchsbedingungen verdünnt.

3.1.4.2 Stimulation der B-Zellen

Prinzipiell wurde die Stimulation der B-Zellen in 1ml 1% FCS RPMI⁺ im Eppendorf-Gefäß durchgeführt. Je nach Stimulation wurden die Zellen auf Eis oder bei RT gehalten, das jeweilige Stimulans (vgl. Tab. 5: Stimulation von B-Zellen durch Antikörper) zupipettiert, das Eppendorf-Gefäß invertiert und bei 37°C im Heizblock für die gewünschte Zeit inkubiert. Etwa 10s vor Ablauf der Stimulationszeit wurde der Ansatz bei 14.000rpm, 4°C für 20s abzentrifugiert. Das Medium wurde sofort vorsichtig abgesaugt und die Stimulation durch Resuspendieren der B-Zellen in eiskaltem Lyse-Puffer beendet, was in Kapitel 3.2.3 beschrieben wird.

Zelltyp	Stimulierender/s Antikörper/Antigen	Konzentration
Humane Zelllinie:		
Daudi		
	BU.1 Maus anti human IgM	10µg/ml
	Ziege F(ab') ₂ anti human µ Fc5	1-2,5µg/ml
Murine Zelllinie:		
J558Lµm3		
	NP ₉ -BSA	10-20µg/ml
	Kaninchen anti Maus IgM und IgG	20µg/ml
Murine B-Lymphozyten:		
	Ziege F(ab') ₂ anti Maus κ Kette	5-10µg/ml
	Kaninchen anti Maus IgM und IgG	10-20µg/ml

Ratte anti Maus μ Kette (Klon B7-6)	10-20 μ g/ml
2.4G2 Ratte anti Maus Fc γ R _{2b}	1:100

Tab. 5: Antikörper zur Stimulation von B-Zellen

3.1.5 Analyse der Zellproliferation

3.1.5.1 Durchführung eines Proliferationstests

Im Proliferationstest wird die Menge an Tritium (^3H)-markiertem Thymidin bestimmt, die in Abhängigkeit von der Zeit bei der Zellteilung in die DNS eingebaut wurde. Dabei wird die ^3H -Thymidin Einbaurrate proportional zur DNS-Synthese und somit zum Proliferationsvermögen der Zellen gesehen.

Die wie in Kapitel 3.1.3 aufgereinigten B-Lymphozyten wurden auf eine Zellkonzentration von $1 - 5 \times 10^6$ Zellen pro ml in 5%-10% FCS RPMI⁺ eingestellt. In 96-well-Flachbodenplatten erfolgte die Stimulation in einem Gesamtvolumen von 200 μ l, wobei je 100 μ l Zellsuspension ($1 \times 10^5 - 5 \times 10^5$ Zellen) und 100 μ l Medium mit Stimulans zusammengegeben wurden. Prinzipiell wurden die verschiedenen Stimulationen in Triplets angesetzt. Etwa 8h vor Stimulationsende wurden jedem Napf 50 μ l ^3H -Thymidin RPMI⁻ (1 μ Ci/ml) zupipettiert. Die Platten können nach der Stimulationszeit bei -20°C aufbewahrt werden.

3.1.5.2 Ernten der Zellen

Die Zellen wurden mittels eines beta-Plate-Harvesters (Pharmacia) geerntet. Dabei wurden die Zellen aus den Näpfen mit Wasser herausgespült, wodurch die Zellen platzen. Die freigesetzte genomische DNS wurde an einer Glasfaserfiltermatte aufgefangen. Nicht in DNS eingebautes ^3H -Thymidin wurde weggespült. Nach Trocknen der Filtermatte (in Brutraum bei 37°C) wurde diese mit 10ml Szintillationsflüssigkeit angefeuchtet und in eine Plastiktasche eingeschweißt. Im beta-Counter erfolgte die Messung des eingebauten ^3H -Thymidins durch β -Szintillation.

3.1.6 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie macht sich die Epitopspezifität von Antikörpern zunutze, die an intra- oder extrazelluläre Moleküle binden. An die spezifischen Antikörper wurden fluoreszierende Farbstoffe (Fluorophore) unterschiedlicher Emissionswellenlänge konjugiert. Während der Messung am FACSsan oder FACScalibur (Becton Dickinson) wird ein so feiner Flüssigkeitsstrahl erzeugt, dass jede Zelle einzeln von einem Laserstrahl getroffen wird. Der gebundene Farbstoff nimmt die Lichtenergie auf, wird angeregt, und die aufgenommene Energie als Lichtquant mit charakteristischer Wellenlänge emittiert. Die Lichtemission des an die Zelloberfläche über Antikörper gebundenen fluoreszierenden Farbstoffes wird durch verschiedene Fotozellen detektiert.

Folgende Farbstoffe wurden im FACScan oder FACScalibur verwendet:

Abk.:	Fluorophor	Fluoreszenz,	Farbe (Emissionsspektrum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat	1. Fluoreszenz	grün (530/30nm)
PE	Phycoerythrin	2. Fluoreszenz	gelb-orange (575/25nm)
BIO	Biotin		
APC	Allophycocyanin	4. Fluoreszenz	dunkel rot (660/20nm)
sekundäres Agens			
	Streptavidin-PE	2. Fluoreszenz	gelb-orange (575/25nm)
	Streptavidin-CyChrom	3. Fluoreszenz	lila (682/33nm)

Ausgewertet wurden die Daten mit dem Programm Cell-Quest für Apple-Macintosh.

3.1.6.1 Färbung von Zelloberflächenmolekülen

Prinzipiell wurden die Zellen während der Färbung auf Eis und im Dunkeln gehalten. Nach jedem Färbeschritt wurde ein Waschschritt mit 3ml FACS-Puffer (PBS, 0,1%BSA mit 0,01%-0,05% Azid) angeschlossen. Um unspezifische Bindungen der IgG Färbeantikörper an den Fc γ -Rezeptor zu verhindern, wurde dieser zunächst mit 2.4G2 Antikörper (Ratte anti-Maus Fc γ R_{2b}) für 10min auf Eis blockiert. Dieser Schritt konnte auch in die erste Färbung integriert werden, indem 2.4G2 Antikörper in den ersten Färbeansatz dazugegeben wurden. Kam ein biotinylierter Antikörper zum Einsatz, so wurde dieser immer in den ersten Färbeansatz verdünnt, da im zweiten Färbeansatz das Streptavidin konjugiert mit einem Fluorophor angeschlossen werden musste.

Pro Färbung wurden 1×10^5 - 1×10^6 Zellen in ein FACS-Röhrchen gegeben, mit FACS-Puffer gewaschen, abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Färbungen wurden mit den Verdünnungen der jeweiligen Antikörper in FACS-Puffer durchgeführt, deren optimale Konzentration zuvor austitriert worden war. Die Antikörperverdünnung (pro Ansatz 25-40 μ l) wurde auf die abzentrifugierten Zellen gegeben und das Zellsediment durch leichtes Schütteln gelöst. Ein Färbeschritt umfasste eine Inkubationszeit von 20-30min auf Eis und ohne Licht. Nach Beendigung der Färbung wurden die Zellen gewaschen, in 100-300 μ l FACS-Puffer resuspendiert und am FACScan oder FACScalibur analysiert.

3.1.7 Messung der Ca²⁺- Mobilisation

Durch BZR-Kreuzvernetzung werden verschiedene Signalwege initiiert. Unter anderem kommt es Sekunden nach der BZR-Stimulation zur Ausschüttung von Ca²⁺-Ionen als sekundärem Botenstoff (second messenger). Zunächst strömt Ca²⁺ aus den intrazellulären

Ca²⁺-Speichern, wie dem Endoplasmatischen Reticulum (ER). Sind die intrazellulären Speicher vollständig entleert, öffnen sich die Ca²⁺-Kanäle in der Zellmembran und extrazelluläres Ca²⁺ fließt in die Zelle ein. Um die vom BZR induzierte Signalstärke in B-Zellen aus verschiedenen knock-out Mäusen bestimmen zu können, wurden am FACSVantage (Becton Dickinson) die Ca²⁺-Bewegungen gemessen. Die Konzentration an freien Ca²⁺-Ionen in der Zelle kann mit fluoreszierenden Sonden, sogenannten Chelatoren wie Indo-1, gemessen werden. Die zu untersuchenden B-Zellen wurden dafür mit dem Chelator Indo-1 beladen (Protokoll vgl. Kapitel 3.1.7.1). Indo-1 hat die Eigenschaft, freies Ca²⁺ zu binden, wodurch sich dessen Emissionswellenlänge verändert. Der FACSVantage ist neben den zwei Lasern, die auch im FACScalibur zu finden sind, mit einem UV-Laser ausgestattet. Dieser ist Voraussetzung für die kurzwellige Strahlung, die benötigt wird, die Ionophoren anzuregen. Des Weiteren verfügt der FACSVantage über die Detektionsfilter der Fluoreszenz 4 und 5, die das Emissionsspektrum von z.B. Indo-1 ohne und mit gebundenem Ca²⁺ messen. Werden B-Zellen über den BZR stimuliert, kommt es zum intrazellulären Ca²⁺-Ausstrom. Indo-1 ohne gebundenes Ca²⁺ sendet die Wellenlänge aus, die am Fluoreszenzfilter FL4 gemessen wird. Dagegen emittiert der Indo-1-Ca²⁺-Komplex die Wellenlänge für FL5. Die Software im FACSVantage berechnet das Verhältnis an gebundenem zu ungebundenem Ca²⁺ (FL5/FL4) innerhalb der abgebildeten Zelle in Abhängigkeit von der Zeit.

3.1.7.1 Beladung und Anfärbung der B-Zellen

5x10⁶ Splenozyten aus den zu analysierenden Mäusen (nach Lyse der Erythrozyten) oder B-Zellen von Zelllinien wurden in 1ml 1% FCS RPMI⁺ resuspendiert. Zuvor wurden 50µg Indo-1 mit 25µl pluronischem F-127 (Detergens; beides von Molecular Probes, Eugene, OR) und 113µl FCS gemischt und 10min bei RT das Indo-1 gelöst. In 5x10⁶ Zellen/ml wurden 15µl Indo-1 Mix gegeben (in der Regel 2x10⁷ Splenozyten in 4ml 1% FCS RPMI⁺ und 60µl Indo-1 Mix) und die Zellen bei 37°C für 45min mit Farbstoff beladen.

Um ausschließlich B-Zellen aus den Splenozyten analysieren zu können, wurden T-Zellen und Makrophagen mit Antikörpern angefärbt. Im FACSVantage war es möglich, die nicht angefärbten B-Zellen von den fluoreszierenden T-Zellen und Makrophagen zu trennen. Dafür wurden zunächst die Antikörper in der doppelten Konzentration in dem benötigten Volumen angesetzt und bei RT gegen PBS dialysiert (um das Azid zu entfernen). Die Färbung der Splenozyten erfolgte auf Eis für 30min gegen CD11b-bio (Mac.1, Makrophagen) und Thy1.2-bio (T-Zellen), gefolgt von Streptavidin-PE (alle von PharMingen, San Diego). Nach der Färbung wurden die Zellen in einer Konzentration von 1x10⁷/ml in 1% FCS RPMI⁺ aufgenommen und auf Eis im Dunkeln aufbewahrt.

3.1.7.2 Stimulation der Zellen

Für die Messung wurden 1-2x10⁶ beladene Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt, das Volumen auf 2ml mit 37°C warmen 1% FCS RPMI⁺ aufgefüllt, leicht geschüttelt und die Messung für rund 1min begonnen. Daraufhin wurde das jeweilige Stimulans (z.B. 10 µg/ml B7-6 monoklonaler anti-IgM Antikörper) zupipettiert, wieder leicht geschüttelt und sofort weitergemessen (insgesamt 8min pro Stimulation). Die Messung erfolgte für die ungefärbten B-Zellen, die im FACSVantage von den fluoreszierenden Mac.1⁺ und Thy1.2⁺ Zellen getrennt wurden.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Aufreinigung von monoklonalem Antikörper

Je nach Verwendungszweck des Antikörpers war es notwendig, den monoklonalen Antikörper aus dem Kulturüberstand der Hybridomzelllinie zu isolieren. Dazu wurden High Trap Sepharose Säulen mit rekombinantem ProteinA oder ProteinG (beide von Amersham, Braunschweig) benutzt. Abhängig vom Isotyp und der Spezies des Antikörpers wurde eine der beiden Säulen ausgewählt.

Spezies	Immunglobulin	Bindung ProteinA	Bindung ProteinG
Maus	IgG1	+	++++
	IgG2a	++++	++++
	IgG2b	+++	+++
Hase	IgG	++++	+++
Ziege	IgG	-	++

Tab. 6: Affinität von Immunglobulinen zu ProteinA/ProteinG

Ursprünglich wurde ProteinA aus der Zellwand von *Staphylococcus aureus* und Protein G von Gruppe C Streptococcus aufgereinigt und kovalent an eine feste Phase gebunden. Die von mir verwendeten Säulen waren mit rekombinantem ProteinA bzw. ProteinG, gebunden an Kügelchen, gefüllt worden. ProteinA bzw. ProteinG hat die Eigenschaft, die schwere Kette von Antikörpern mit hoher Affinität zu binden. Die Assoziation des Antikörpers an ProteinA/ProteinG ist abhängig von dem pH-Wert des umgebenden Milieus. Bei alkalischem bis physiologischem pH bindet der Antikörper, wohingegen die Affinität mit sinkendem pH-Wert nachlässt.

Die jeweilige Säule wurde bei RT intensiv mit PBS, oder mit 10ml 0,1M Glycin pH2,5 und anschließend mit PBS so lange gewaschen, bis kein Protein aus vorangegangenen Aufreinigungen mehr nachweisbar war. Daraufhin wurde der mit 0,1% Azid versetzte Kulturüberstand mittels einer Pumpe zwei Mal bei etwa 0,7ml/10min Tropfgeschwindigkeit (Stufe 1-2 der Peristaltic Pump P3 von Pharmacia) und 4°C über die Säule laufen lassen. Anschließend wurde die Säule mit PBS gewaschen, bis kein Protein mehr detektiert werden konnte.

Die Elution des Antikörpers wurde mit 15ml 0,1M Zitronensäure pH5 begonnen. In Eppendorf-Gefäßen wurde das Eluat in 1ml Fraktionen aufgefangen, mit dem MICRO-BCA-Test (Fa. Pierce, Kapitel 3.2.8.2) auf Proteingehalt getestet und jede Fraktion sofort mit 100µl 1M Tris pH7,8 neutralisiert. Wurde kein Protein detektiert oder sank die Proteinkonzentration, wurde mit 15ml 0,1M Zitronensäure pH4 fortgefahren. Je nach Antikörper löste sich dieser bei einem pH von 4 (z.B. anti-Phospho-Tyrosin, Klon 4G10) oder erst bei der Elution mit 15ml 0,1M Zitronensäure pH2,8 z.B. anti- μ , Klon B7-6). Es ist vom Antikörper abhängig, ob dieser bei einer Elution mit pH2,8 denaturiert. Empfehlenswert ist es, den pH Wert schrittweise zu senken. Abschließend wurde die Säule mit 0,1MGlycin pH2,5 so lange gewaschen, bis im Eluat kein Protein mehr detektiert werden konnte. Die Säule wurde dann mit PBS sorgfältig neutralisiert und in PBS mit 0,1% Azid bei 4°C aufbewahrt.

Protein-enhaltende Fraktionen wurden vereinigt, der pH abermals überprüft, ggf. mit 1M Tris pH7,8 neutralisiert und sofort gegen PBS dialysiert. Anschließend wurde der Proteingehalt der Eluate bestimmt (Kapitel 3.2.8). Die Antikörperreinheit der Eluate im SDS-PAGE und Coomassie Blue Anfärbung sichtbar gemacht und die Funktionalität im Western-Blot, FACSan oder bei Stimulationen getestet. Je nach Verwendungszweck wurde abschließend der Antikörper steril filtriert oder mit Azid versetzt und bei -80°C gelagert.

3.2.2 Gewinnung von polyklonalem Antikörper

3.2.2.1 Aufarbeitung von Antigen zur Immunisierung

Für die Gewinnung von polyklonalem anti-SLP-65/BLNK Antikörper wurden Kaninchen mit dem N-terminalen Proteinteil des Signalmoleküls immunisiert. Aminosäure 4-205 von SLP-65/BLNK war in einen pGEX-Vektor kloniert worden (freundliches Geschenk von A. Chan; pGEX-Vektor wird in Kapitel 3.2.6 beschrieben). Dieses Plasmid wurde in BI21 Bakterien (Invitrogen) transformiert. Während des Bakterienwachstums wurde das Fusionsprotein vervielfältigt. Um das GST-SLP-65/BLNK Protein zu isolieren, wurden die Bakterien in Lyse-Puffer mit Protease-Inhibitoren (Boehringer Mannheim) sonifiziert und mit Hilfe von Glutathion-Kügelchen aus dem Bakterienlysate gewonnen (vgl. Kapitel 3.2.6). Im nächsten Schritt wurden die GST-SLP-65/BLNK-Glutathion Komplexe in reduzierendem Ladepuffer (Roti-Load, Roth Karlsruhe) 5min bei 96°C aufgekocht und im SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel bzw. die Proteine im Gel wurden mit Coomassie-Blue angefärbt und anschließend fixiert. Das GST-SLP-65/BLNK Fusionsprotein wurde entsprechend seiner Größe von etwa 50kDa (GST-Protein rund 29kDa plus SLP-65/BLNK-Proteinteil rund 20kDa) aus dem Gel herausgeschnitten. In den SDS-PAGE Gelen wurde eine BSA-Standardreihe zur Bestimmung der Proteinkonzentration der GST-SLP-65/BLNK Bande mit aufgetragen. Etwa 100µg/Injektion GST-SLP-65/BLNK Fusionsprotein wurden von der Firma EuroGentec (Belgien) zur Immunisierung eines Hasen benötigt. Wie die Firma das Fusionsprotein aus dem Gel eluierte und für die Immunisierung aufarbeitete, wurde uns nicht mitgeteilt. Zwei Hasen (Nummer 7475 und 7476) wurden nach folgendem Plan immunisiert: Erste Immunisierung der Hasen d0, 2. Immunisierung: d14, 3. Immunisierung: d28. Da die erhaltenen Testseren nicht die erwünschten Signale in Western-Blot Analysen zeigten, wurden die Hasen ein viertes Mal (d35) mit dem GST-SLP-65/BLNK Fusionsprotein immunisiert.

3.2.2.2 Aufreinigung von polyklonalem Antikörper

Zunächst wurde das Kaninchenserum, das durch die in Kapitel 3.2.2.1 beschriebene Immunisierung gewonnen wurde, 1:10 mit PBS verdünnt. Um größere Proteinaggregate aus dem Serum zu entfernen, wurde dieses durch einen 0,2µm Flaschenfilter laufen lassen. Weiterhin wurde dem Serum 0,1% Azid zugegeben, um eine Säulenkontamination zu verhindern.

Bei denen im folgenden beschriebenen Aufreinigungs- und Elutionsschritten des SLP-65/BLNK-Antikörpers wurde entsprechend dem Protokoll für monoklonale Antikörper (Kapitel 3.2.1) verfahren. Aus diesem Grund werden hier die einzelnen Schritte nicht mehr genau erläutert. Die anti-SLP-65/BLNK Antikörper wurden mit Hilfe von drei verschiedenen Säulen aus dem Serum selektioniert und angereichert.

- Mit der ersten Säule, einer High Trap Sepharose ProteinA Säule (Amersham, Braunschweig) wurden sämtliche IgG Antikörper aus dem Serum angereichert.
- Das Eluat aus dieser ersten Säule wurde dann über eine GST-CNBr Sepharose Säule gegeben, um unspezifische Antikörper gegen das GST-Protein zu entfernen. Die GST-CNBr Sepharose Säule wurde hergestellt, indem an CNBr-aktivierte Sepharose-Kügelchen (Amersham, Braunschweig) aufgereinigtes GST-Protein kovalent gekoppelt wurde. Das genaue Protokoll ist dem Handbuch der CNBr-aktivierten Sepharose Kügelchen von Amersham zu entnehmen. Mit den entsprechend hergestellten Kügelchen wurde eine Säule von Bio-Rad bestückt, das Eluat der ersten Säule über die Säule gegeben und der Durchfluss aufgefangen.
- Abschließend wurde dieser Durchfluss über eine SLP65-GST-CNBr Sepharosesäule laufen lassen, um die spezifisch anti-SLP-65/BLNK bindenden Antikörper anzureichern. Dazu wurde aufgereinigtes GST-SLP-65/BLNK Protein an CNBr-aktivierte Sepharose-Kügelchen (Amersham, Braunschweig) kovalent gekoppelt. Das genaue Protokoll ist dem Handbuch der CNBr-aktivierten Sepharose Kügelchen von Amersham zu entnehmen. Mit den Kügelchen wurde eine Säule von Bio-Rad bestückt. Die Elutionsfraktionen, die ausschließlich anti-SLP-65/BLNK IgG Antikörper enthielten, wurden je nach Proteingehalt zusammengegeben und getrennt gegen PBS dialysiert.

Durch diese Aufreinigung wurden aus dem Serum von Hase Nummer 7475 3ml Antikörperlösung mit einer Konzentration von 0,1mg/ml (ergibt 0,3mg/ml) und von Hase 7476 etwa 0,26mg Antikörper gewonnen. Die Funktionalität der Antikörper wurde in Western-Blot Anfärbungen getestet. Im Ergebnisteil wird der anti-SLP-65/BLNK Antikörper verwendet und als Antikörper der Arbeitsgruppe vermerkt.

3.2.3 Herstellung von Zelllysaten

Die Stimulation der B-Zellen wurde wie in Kapitel 3.1.4.2 beschrieben durch die Lyse der Zellen beendet. Dazu wurden die Zellen nach der Stimulation bei 4°C und 14.000rpm für 20s abzentrifugiert und das Medium sorgfältig abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 1ml eisgekühltem Lyse-Puffer (enthielt Inhibitoren) resuspendiert. Je nach verwendetem Detergens wurden die Zellen 20-30min auf Eis inkubiert.

- | | | |
|-----------|---------------|--------------------------|
| • Brij-96 | relativ sanft | maximal 30min Inkubation |
| • NP-40 | stark | 20-25min Inkubation |
| • TritonX | stark | 20min Inkubation |

Zum Lysieren der Zellen und zum Lösen der Proteine aus der hydrophoben Zellmembran wurde dem Lyse-Puffer Detergens zugegeben. Je nach Versuchsziel wurde das Detergens ausgewählt. Je schärfer das Detergens, um so besser gehen Transmembranproteine in Lösung, aber um so mehr schwache, nicht-kovalente Interaktionen zwischen Proteinen werden zerstört. Sollten Protein-Interaktionen untersucht werden, wurde daher auf ein mildes Detergens zurückgegriffen.

Dem Lyse-Puffer wurden kurz vor der Zellyse Protease- und Phosphataseinhibitoren zugesetzt:

- | | | |
|-------------|---------------|--|
| • Aprotinin | final 1 µg/ml | inhibiert Trypsin, Chymotrypsin, etc. |
| • Leupeptin | final 5 µg/ml | inhibiert Plasmin, Trypsin, Papain, etc. |

- | | | |
|--------------------|-------------|---------------------------------|
| • PMSF | final 1mM | inhibiert Trypsin, Chymotrypsin |
| • Pefabloc | final 1mM | ersatzweise für PMSF |
| • EDTA | final 0,5mM | inhibiert Metallo-Proteasen |
| • Na-ortho-Vanadat | final 1mM | Phosphataseinhibitor |

Nach der Lyse wurden die Zelllysate bei 4°C und 14.000rpm für 10min zentrifugiert. Der Überstand, der die gelösten Proteine enthielt, wurde abgenommen und in ein eisgekühltes neues Eppendorf-Röhrchen überführt. Das Lysat konnte entweder sofort weiterverarbeitet (siehe Kapitel 3.2.4) oder in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt werden.

3.2.4 Immunpräzipitation

Immunpräzipitationen nutzen die Epitopspezifität mono- und polyklonaler Antikörper, um gezielt Proteine aus einem Zelllysate zu isolieren. Der Protein-Antikörper Komplex wird mit Hilfe von ProteinA oder ProteinG Sepharose-Kügelchen (Beads) aus dem Zelllysate gewonnen.

3.2.4.1 Durchführung der Immunpräzipitation

Der Immunpräzipitation sollte ein sogenannter „preclear“ vorausgehen. Bei diesem wird getestet, ob Proteine aus dem Ganzzelllysate (oder stimulierender Antikörper) direkt an das ProteinA oder ProteinG der Kügelchen binden. Während der Etablierung einer Immunpräzipitation wurden „preclears“ durchgeführt. Hierfür wurden 10-25µl der für die Immunpräzipitation ausgewählten Kügelchen dem Lysate zupipettiert, etwa 2h bei 4°C rotiert und die Kügelchen anschließend abzentrifugiert. Die beads wurden weiterhin behandelt wie nach einer Immunpräzipitation und später auch auf das SDS-PAGE Gel aufgetragen. Der Überstand wurde nach dem „preclear“ für die Immunpräzipitation benutzt.

Für die Immunpräzipitation wurden die Sepharose ProteinA oder ProteinG Kügelchen in Abhängigkeit von dem Präzipitationsantikörper ausgewählt (siehe Tab.: 6). Vor der Immunpräzipitation wurden 10-25µl reine Sepharose-Kügelchen pro Immunpräzipitation dreimal mit dem für die Zelllyse verwendeten Lyse-Puffer gewaschen (Equilibrieren der Kügelchen). Die beads wurden immer bei 3.000rpm für 1min zentrifugiert. In das Ganzzelllysate (den Überstand des preclears) wurden die gewaschenen Sepharose-Kügelchen und die optimale Konzentration an immunpräzipitierendem Antikörper (etwa 1-5µg pro Immunpräzipitation) pipettiert. Das Gemisch wurde über Nacht bei 4°C rotiert und am folgenden Morgen die Kügelchen abzentrifugiert, mindestens drei Mal mit Lyse-Puffer (ohne Inhibitoren) gewaschen und nach dem letzten Waschschrift sorgfältig abgesaugt. In 20-40µl reduzierendem Ladepuffer (Roti-Load, Roth, Karlsruhe) wurden die Präzipitate resuspendiert, 6min bei 96°C denaturiert und anschließend entweder direkt auf ein SDS-PAGE Gel geladen oder bei -20°C aufbewahrt.

3.2.5 Immunoblotting

3.2.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Präzipitierte Proteine (von 0,7- 2×10^7 Zellen) oder Ganzzelllysate (von 1×10^5 - 6×10^6 Zellen) wurden 6min bei 96°C in reduzierendem Ladebuffer (1-2x Roti-Load, Roth) aufgekocht. Mit einem entsprechenden Größenstandard wurden die denaturierten Proteine in einem SDS-PAGE bei 100-130V in 1-1½h aufgetrennt. In Abhängigkeit von der Anzahl der zu analysierenden Proben konnte zwischen einem sogenannten „Mini-Gel“ oder einem „Großen Gel“ (Bio-Rad) entschieden werden. In das Mini-Gel konnten je nach Kamm 10-15 Proben mit einem Volumen von 30-15µl geladen werden. In die 25 Taschen des großen Gels wurden bis zu 50µl der Proben pipettiert. Die Komponenten für zwei Mini-Gele sind in Tab.7 zusammengefaßt. Für ein großes Gel wurden die angegebenen Mengen verdreifacht.

KOMPONENTEN		
Trenngel		
	7,5%	10%
• Bisacrylamid 30:0,8 (%w/v)	2,5ml	3,33ml
• 1,5M Tris (pH8,8)	2,5ml	2,5ml
• 10% SDS	0,1ml	0,1ml
• H ₂ O	4,85ml	4ml
direkt vor der Benutzung		
• TEMED	10µl	10µl
• 10% APS	50µl	50µl

3% Sammelgel	
• Bisacrylamid 30:0,8 (%w/v)	650µl
• 1,5M Tris (pH6,8)	625µl
• 10% SDS	50µl
• H ₂ O	3,7ml
direkt vor der Benutzung	
• TEMED	10µl
• 10% APS	25µl

Tab. 7: SDS-PAGE: Angaben in Tabelle ausreichend für 2 x 0,75mm Minigele

3.2.5.2 Western-Blotting

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine aus dem Gel auf Nitrozellulosemembran (ECL-Hybond Membran, Amersham) transferiert. Dazu wurde das Sammelgel mit einem der „T-spacer“ vom Trenngel abgeschnitten und das Sammelgel verworfen. Das Trenngel wurde

anschließend in das sogenannte „Blotting-Sandwich“ eingebettet. Vorbereitend wurden 4 Whatmanfilter und die Nitrozellulosemembran in Größe des Gels zurechtgeschnitten und die Schaumstoffschwämme in Transfer-Puffer eingeweicht.

In folgender Reihenfolge wurde das „Blotting-Sandwich“ zusammengefügt: ein nasser Schaumstoffschwamm, zwei angefeuchtete Whatman-Filterpapiere, das Trenngel, auf das blasenfrei die Nitrozellulose aufgelegt wurde, wieder zwei Whatman-Filterpapiere und abschließend ein weiterer Schaumstoffschwamm. Das „Blotting-Sandwich“ wurde von der Blotting-Klammer zusammengehalten. Das Ganze wurde so in die zuvor mit Transfer-Puffer gefüllte Blotkammer eingespannt, dass das Gel zwischen Anode und Nitrozellulosemembran lag. Der Transfer auf die Nitrozellulosemembran erfolgte im 4°C-Raum entweder bei einer Spannung von 80V für 2h, oder bei 40V über Nacht.

Der Erfolg des Transfers konnte durch Schwenken der Membran in PonceauS überprüft werden. PonceauS bindet sich reversibel an Proteine, wodurch die transferierten Proteinbanden rot angefärbt werden. Der Standard oder besonders auffällige Banden konnten mit Hilfe der Anfärbung am Rande des Blots markiert werden.

Die freien Bindungsstellen der Nitrozellulose wurden durch Schwenken des Blots in 5%-igem fettfreiem Milchpulver in PBS, 0,1% Tween für mindestens 1h bei RT oder über Nacht bei 4°C abgesättigt (sog. Blocken des Blots).

3.2.5.3 Immunologische Detektion

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran muss das Molekül von Interesse sichtbar gemacht werden. Dazu wird der Blot zunächst mit dem *primären Antikörper* angefärbt, der spezifisch an das gesuchte Protein bindet. Der darauf folgende *sekundäre Antikörper* ist ein polyklonaler Antikörper aus einer anderen Spezies. Er erkennt spezifisch den Fc-Teil der Spezies des primären Antikörpers. Voraussetzung für die Detektion ist die Kopplung von Meerrettichperoxidase (Horse-Raddish-Peroxidase) an den Fc-Teil des sekundären Antikörpers. Die Aktivität des Enzyms bzw. die in Form von Photonen von dem Substrat abgestrahlte Energie wird im Enhanced-Chemiluminescence-(ECL-) System auf einem Röntgenfilm sichtbar.

Für die Färbung der Nitrozellulosemembran wurde der primäre Antikörper in zuvor bestimmter Konzentration entweder in 5%-iges fettfreies Milchpulver in PBS, 0,1% Tween (besonders wichtig bei Antikörper Klon 4G10), oder nur in PBS, 0,1% Tween (sollte getestet werden) gegeben. Die Membran wurde darin 2h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht auf einem Schüttler geschwenkt. Vor dem nächsten Färbeschritt sollte die Membran in einem möglichst großen Volumen mindestens dreimal für je 7min in PBS, 0,1% Tween gewaschen werden.

3.2.5.4 Enhanced-Chemiluminescence-System (ECL-System)

An den sekundären Antikörper ist das Enzym Meerrettichperoxidase (Horse-Raddish-Peroxidase) gebunden. Diese wird aktiv, sobald sie mit ihrem Substrat in Kontakt kommt, das inaktiv in der ECL-Flüssigkeit (Amersham, Braunschweig) vorliegt. Während der enzymatischen Reaktion wird Energie frei, die als Lichtquanten vom Substrat abgestrahlt wird. Dadurch wird der aufgelegte Röntgenfilm an den Stellen belichtet, an der sich der Größe entsprechend das Protein im Gel befindet.

Für die abschließende Färbung wurde der sekundäre Antikörper in der jeweiligen Verdünnung in PBS, 0,1% Tween gemischt und die Membran für 1-1½h bei Raumtemperatur darin bewegt. Vor der Detektion mit dem ECL-System wurde mindestens dreimal für 7min in PBS, 0,1% Tween gewaschen. Anschließend wurden die ECL-Lösungen 1 und 2 zu gleichen Teilen gemischt, auf die abgetropfte Nitrozellulose pipettiert und für 1min inkubiert. Der Blot wurde blasenfrei zwischen zwei Overhead-Folien in eine Filmkassette gelegt. In der Dunkelkammer wurden je nach Stärke des Signals Röntgenfilme (Fuji) unterschiedlich lang exponiert. Nach der Belichtung wurden die Filme entwickelt und fixiert.

3.2.6 Glutathion-S-Transferase (GST) markierte Proteine

Die Expression eukaryotischer Proteine in ausreichender Menge in einem artifiziellen, eukaryotischen Zellsystem ist schwierig. Häufig haben die exprimierten Proteine regulatorische Eigenschaften, oder wirken in der benötigten Konzentration toxisch. So verhindern die Proteine den Wachstum der Zellen oder führen sogar zum Zelltod. Aus diesem Grund werden in der Regel bakterielle Zellsysteme benutzt, in die das Expressionsplasmid transformiert wird. Das pGEX-System (Invitrogen) sieht für **Glutathion-S-Transferase Expression**, was bedeutet, dass N-terminal die **Glutathion-S-Transferase (GST)** codiert wird, an die sich C-terminal im Leseraster das gewünschte Protein anschließt. Die Expression des Vektors wird von einem induzierbaren LacZ-Promotor gesteuert. Die Aufreinigung des Fusionsproteins ist auf Grund des GST-Proteinteils bzw. dessen Bindungseigenschaften zu Glutathion sehr leicht. Aus den Bakterienlysaten werden selektiv die Fusionsproteine mit sogenannten Glutathion-Kügelchen isoliert. Das Fusionsprotein wird mit Hilfe eines Überschusses an freiem reduziertem Glutathion von den Kügelchen gelöst. Wenn nötig, kann das eukaryotische Protein mit dem Faktor Xa enzymatisch von dem GST-Teil getrennt werden.

3.2.6.1 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsprotein (Bsp.: GST- Grb2)

Das GST-Grb2(SH2SH3) codierende Plasmid (freundliches Geschenk von J. Wienands) wurde in den E. coli Bakterienstamm BI-21 (Invitrogen) transformiert. Der Abstrich eines Ampicillin-resistenten Klons wurde in 75ml LB-Amp gegeben und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Etwa 10% des gewünschten Endvolumens wurden in der Übernachtskultur herangezogen. In dem beschriebenen Fall wurde folglich die 75ml Übernachtskultur am Morgen in 800ml LB-Amp Nährlösung gegeben und bis zu einem O.D.600 ist 1 wachsen lassen. Durch Zugabe von IPTG (1mM aus einem 1M stock) wurde dann die Expression des Fusionsproteins induziert und der Ansatz mindestens 1 1/2h weiter geschüttelt.

Die Expression des GST-Fusionproteins wurde durch das Herunterzentrifugieren der Bakterien beendet. Je nach vorhandenen Zentrifugenbechern wurden die 800ml Bakterienlösung in 3-4 Fraktionen geteilt und 10min bei 5000rpm und 4°C zentrifugiert. Die Bakterienpellets wurden in 10ml GST-Lyse Puffer (1xPBS, 100mM EDTA, 1% Triton X-100 und Proteaseinhibitoren-Mix, Boehringer Mannheim) gelöst und in ein 50ml Röhrchen gegeben. Um an die exprimierten Proteine zu gelangen, mussten die Bakterien aufgebrochen werden. Dafür wurden die resuspendierten Bakterien auf Eis bei 80 Zyklen (max. Höhe) 4 Mal je 30s sonifiziert (am Institut für Medizinische Strahlenkunde). Zwischen den Beschallungen von 30s sollten 30s Pausen zum Abkühlen eingehalten werden.

Die Proteine befanden sich nun in Lösung. Zum Entfernen des Bakteriendebris wurden die Lysate in der Tischzentrifuge bei 4°C, 4.300rpm für 20min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 15ml Röhrchen überführt und etwa 200µl Glutathion-Kügelchen zugegeben, die zuvor

zwei Mal mit PBS gewaschen worden waren. Um nun die GST-Fusionsproteine an die Glutathion-Kügelchen binden zu lassen, wurde das Röhrchen mit dem Zelllysate und den Kügelchen etwa 2h bei 4°C geschwenkt. Zum Abschluß wurden die Kügelchen 2min bei 1.600rpm herunterzentrifugiert und mit dem GST-Wasch-Puffer (1xPBS, 1% Triton X-100) drei Mal gewaschen. Abschließend folgte noch ein Waschschrift mit PBS, 1% Azid, worin die GST-Fusionsprotein gebundenen Kügelchen auch aufbewahrt werden konnten.

Für ein Grb2-pull-down Experiment wurde das Fusionsprotein immer frisch hergestellt. Pro Stimulationszeitpunkt wurden in der Regel 5-10µl der GST-Grb2(SH2SH3) gebundenen Kügelchen benutzt.

3.2.7 Durchführung eines ELISA

Mit Hilfe der ELISA-Methode (Enzym-Linked Immunosorbent Assay) können Proteinkonzentrationen von spezifischen Proteinen, wie zum Beispiel Immunglobulintiter im Blut oder sezernierte Proteine wie Interleukine nachgewiesen und quantifiziert werden. Verschiedene ELISA-Varianten stehen zu Verfügung, von denen der Indirekte- und der Sandwich-ELISA durchgeführt wurden.

Sollte die spezifische Immunantwort einer Maus auf ein gespritztes Antigen untersucht werden, wurde der Indirekten-ELISA angewandt. Hierbei wurde das Trägermolekül des Antigens (z.B. TNP oder BSA) an die stark adsorbierenden Plattenböden (Polysorb ELISA-Platten, Nunc) gebunden. Darauf folgte die Inkubation mit dem zu testenden Antiserum. Die Antigen-spezifischen Antikörper binden an das immobilisierte Antigen. Anschließend wurde intensiv gewaschen. Um den gebundenen, spezifischen Antikörper sichtbar zu machen, wurde im nächsten Schritt ein Antikörper benutzt, der das gebundene Antiserum erkennt (z.B. anti Maus IgG) und an den Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt ist. Wieder wurde intensiv gewaschen und daraufhin das Substrat der AP zugegeben. Dadurch kommt es zu einer Farbreaktion. Der photometrisch bestimmbare Farbumschlag ist proportional zu der Menge an antigen-spezifischen Antikörper im Serum.

Sollten die basalen Immunglobulin-Level nicht-immunisierter Mäuse bestimmt werden, wurden der Sandwich-ELISA durchgeführt. Dabei wurden anstelle des Antigens Antikörper an den Plattenboden gekoppelt, die spezifisch die zu untersuchenden Isotypen erkannten. Nach dem Waschen wurden die Seren der Mäuse auf die z.B. mit anti-IgA vorbehandelten Platte gegeben. Aus dem Serum binden die IgA Antikörper an die anti-IgA immobilisierten Antikörper. An den dritten Antikörper war AP gekoppelt und dieser erkannte den Spezies-spezifischen Isotyp. Nach Zugabe des Substrates kam es zur Farbreaktion, die photometrisch bestimmt wurde.

3.2.7.1 Gewinnung der Seren

Sollte der basale Immunglobulintiter von Mäusen unterschiedlichen Genotyps bestimmt werden, wurden 3-5 Mäuse pro Genotyp im Alter von >8-10 Wochen an der Schwanzvene geblutet. Wurde die Immunantwort verschiedener Mäuse getestet, wurden 3-5 Mäuse pro Genotyp zunächst geblutet, dann immunisiert und in Abhängigkeit der zu testenden Immunantwort vor und nach dem „Boost“ wieder geblutet. Die genauen Immunisierungsprotokolle werden bei der Ergebnisdiskussion dargelegt.

50-100µl Blut wurden entweder durch Anritzen der Schwanzvene oder durch Herzpunktion nach Töten der Mäuse gewonnen. Über Nacht wurde das Blut bei 4°C aufbewahrt, dann bei 4°C für 5min bei 3.000rpm herunterzentrifugiert, vorsichtig das klare Serum herauspipettiert. Ggf. musste abermals zentrifugiert werden, um Erythrozyten in den Seren zu vermeiden.

3.2.7.2 Vorbehandlung der ELISA-Platten

96-Napf-Polysorbplatten (Nunc) wurden über Nacht bei 4°C oder 2h 37°C in einer feuchten Kammer mit 50µl/Napf anti-Immunglobulin-Isotyp (1-2µg/ml in PBS) oder im Fall von Seren aus einer Immunisierung mit 10µg/ml in PBS TNP-BSA oder TNP-Ova beschichtet. Am nächsten Tag wurden die unbesetzten Bindungsstellen durch Zugabe von 200µl/Napf 1% BSA in PBS über Nacht bei 4°C oder für 2h bei 37°C blockiert. Anschließend wurde 3x mit je 200µl/Napf PBS gewaschen (alle Waschschritte wurden im Columbus ELISA-Wascher, Tecan Crailsheim durchgeführt).

3.2.7.3 Verdünnungsreihen der Seren und Standards

Die Seren und Standards wurden in unbeschichteten 96-Napf Platten mit 0,1% BSA in PBS mit 0,05% Azid wie folgt vorverdünnt: Im Fall von Seren aus Immunisierungen wurden diese 1:20, im Fall von Antikörpertiterbestimmung 1:200 vorverdünnt. In der nachfolgenden Verdünnungsreihe wurde diese 1:2 seriell weiterverdünnt.

Als Standard von Immunisierungen diene ein Gemisch aus den Seren unterschiedlicher Mäuse an verschiedenen Tagen (ausgenommen d0), das entsprechend den Seren verdünnt wurde. Bei Antikörpertiterbestimmungen wurde ein kommerziell erhältlicher Ig-Standard verwendet, der eine Anfangsverdünnung von 1µg/ml aufweist. Dieser wurde entsprechend den Seren 1:2 verdünnt. Eine zusätzliche Reihe, in der 0,1% BSA in PBS mit 0,05% Azid weiterpipettiert wurde, diene als Kontrolle (Referenz).

Aus den Verdünnungen wurden 50µl/Napf auf die vorbeschichteten Platten (siehe Kapitel 3.2.7.2) gegeben und für 1½h bei 37°C inkubiert. Abschließend wurde mit 0,1% BSA in PBS jeder Napf gründlich gewaschen (3x mit je 200µl/Napf PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺).

3.2.7.4 Auswertung der Enzymantwort

Abschließend wurde der alkalische Phosphatase-konjugierte Antikörper in einer Konzentration von 1µg/ml verdünnt und 50 µl/Napf für 1h bei 37°C auf die Platten gegeben. Nach dreimaligem Waschen wurden 100 µl/Napf des in Diethanolaminpuffer gelösten Substrates p-NPP (1mg/ml p-Nitrophenylphosphat) in die Näpfe verteilt und die Platten für einige Zeit ins Dunkle gestellt. Je nach Quantität des gebundenen Antikörpers konnte die Gelbfärbung in 10min – 3h abgeschlossen sein. Die optische Dichte wurde im ELISA-Reader (Firma Molecular Devices) bei 405nm bestimmt. Mit Hilfe des SoftMax Pro 3.0 Programms wurden die gemessenen Rohdaten ausgewertet.

3.2.8 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

3.2.8.1 UV-Detektion

Die Konzentration von Proteinen in einer Lösung kann durch eine photometrische Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 280nm bestimmt werden. Tyrosine und Tryptophane in der Polypeptidkette sind für die Absorption verantwortlich. Da die Anzahl der beiden Aminosäuren zwischen Proteinen variiert, verschiebt sich der Absorptionswert verschiedener Proteinlösungen gleicher Konzentration.

Deshalb sind folgende Näherungen nötig:

- reine Proteinlösung:

$$c(\text{mg/ml}) = 1.55 \times A_{280}$$

- mit Nukleinsäure kontaminierte Proteinlösung:

$$c(\text{mg/ml}) = (1.55 \times A_{280}) - (0,76 \times A_{260})$$

- für IgG, IgM und BSA:

Protein A_{280} bei 1mg/ml	
IgG	1,35
IgM	1,2
BSA	0,7

3.2.8.2 Mit Hilfe des BIO-RAD Protein-Tests

Dieser Test zur Bestimmung der Proteinkonzentration basiert auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Blue G250 an freie Aminogruppen. Dadurch wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 456nm auf 595nm verschoben, was auch optisch sichtbar wird --- je höher die Proteinkonzentration, um so blauer die proteinhaltige Lösung. Allerdings ist die Bindung des Farbstoffes nicht nur pH- und temperaturabhängig, sondern auch Salze und Detergenzien wirken störend.

10-50 μ l aus einer BSA-Standardreihe oder jeweils 10-50 μ l aus verschiedenen Proteinverdünnungen wurden mit 90-150 μ l der BIO-RAD-Arbeitslösung (Firma Bio-Rad; Verdünnung der Stocklösung 1:5 in Wasser) vermischt. Nach Inkubation von 5min bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 595nm gemessen. Mit Hilfe der BSA-Standardkurve war die Konzentrationsbestimmung der Proteinlösung möglich. Auch konnten die Standard- und Proteinverdünnungen in einer 96-Napf-Platte angesetzt werden, was die Messung im ELISA-Reader (von der Firma Molecular Devices) ermöglicht.

3.2.8.3 Mit Hilfe des MICRO-BCA Protein-Tests

Wie im vorherigen Kapitel erwähnt, ist die Farbentwicklung des BIO-RAD-Tests sensitiv gegenüber höheren Konzentrationen verschiedener Detergenzien und Salze. Um in diesen Ansätzen trotzdem den Proteingehalt zu bestimmen, wurde der BCA-Assay (Firma Pierce) verwendet. Die in der MICRO-BCA Lösung befindlichen Kupferionen (Cu^{2+}) interagieren mit den Peptidbindungen. Unter alkalischen Bedingungen wird das Kupfer reduziert. Mit der nächsten BCA-Lösung werden zwei Moleküle Bicinchoninsäure mit jeweils einem Cu^{1+} komplexiert, wodurch eine lila Farbe entsteht. Es wurde gezeigt, dass sowohl die makromolekulare Struktur des Proteins, als auch die Anzahl an Peptidbindungen und die Aminosäuren Cystein, Cystin, Tryptophan und Tyrosin für die Komplexbildung verantwortlich sind. Der Kupferkomplex zeigt eine starke Absorption bei 562nm, die linear zur Proteinkonzentration steigt.

Zunächst wurde die BCA-Arbeitslösung aus den drei gelieferten Reagenzien im Verhältnis 50:48:2 vermischt. Von dieser BCA-Arbeitslösung wurden 100 μl in einen Napf einer 96-well Platte mit 10-100 μl der BSA-Standard- oder Proteinverdünnung gut gemischt. Die Ansätze wurden bei Raumtemperatur 2h inkubiert, und anschließend die Absorption im ELISA-Reader (Firma Molecular Devices) bei einer Wellenlänge von 562nm bestimmt. Standardkurve und Proteinkonzentration wurden von der Soft-Ware SoftMax Pro 3.0 für Apple-Macintosh berechnet.

3.3 DNS-spezifische Methoden

3.3.1 Typisierung von Mäusen

3.3.1.1 DNS Isolierung aus Mausschwänzen

Beim Trennen der Nachkommen aus den jeweiligen Verpaarungen wurde den Mäusen eine Ohrmarke eingestochen und etwa 5-10mm von der Schwanzspitze abgeschnitten. Dieser wurde in 400-500 μ l Lyse-Puffer und 10 μ l ProteinaseK (Stocklösung 10mg/ml) über Nacht bei 65°C verdaut. Nach gründlichem Vortexen der verdauten Schwänze wurden die Ansätze mit 10.000rpm für 10min bei 4°C zentrifugiert. Währenddessen wurden frische Eppendorf-Gefäße mit 500 μ l Isopropanol bestückt. Auf dieses wurde der Überstand des Verdaus aufpipettiert. Durch langsames Invertieren des Verdau-Isopropanol-Gemisches fiel die DNS aus. Diese wurde mit Hilfe einer zugeschmolzenen Glaspipette aus der Flüssigkeit geangelt (Affinität von DNS zu Glas höher als zu Plastik). Die an die Pipettenspitze gebundene DNS wurde zum Waschen kurz in 70%-igen Ethanol getaucht und anschließend 10-15min getrocknet. Die Spitze der Glaspipette mit der gebundenen DNS wurde in ein Eppendorf-Gefäß mit 100-200 μ l ddH₂O gestellt und das obere Drittel mit einem Glasschneider abgeschnitten. Abschließend wurde das Eppendorf-Gefäß mit dem Stück der Glaspipette und der DNS für 2 Stunden in ein Wasserbad von 56°C inkubiert, bis die DNS gelöst war.

3.3.1.2 Durchführung der PCR

Nach Aufreinigung der DNS aus dem Mausschwanz wurde die PCR mit für die jeweilige Typisierung spezifischen Primern durchgeführt. Dafür wurden 1-2 μ l der DNS eingesetzt. Die Primer für den Nachweis des Wildtyp- als auch des mutierten Allels wurden kombiniert, so dass in einer PCR-Reaktion beide Fragmente nachgewiesen werden konnten. Die nachfolgenden Pipettierschemen zur Herstellung des „Master-Mix“ für die Typisierungs-PCR wurde für die jeweilige knock-out Maus etabliert.

Pipettierschema für Mastermix: **CD22-PCR**

1-2 μ l genomische DNS
 5 μ l 10xTaq-Puffer
 1 μ l dNTPs (10mmol)
 1,5 μ l Primer **CD22 ex12AS**
 1,5 μ l Primer **CD22 ex11-5B**
 1,5 μ l Primer **CD22 2neo for 1**
 0,1 μ l SuperTaq-Polymerase (100U/ μ l)
 ad 50 μ l H₂O

Pipettierschema für Mastermix: **CD45-PCR**

1-2 μ l genomische DNS
 5 μ l 10xTaq-Puffer
 1 μ l dNTPs (10mmol)
 1,5 μ l Primer **CD45 ex6-5**
 1,5 μ l Primer **CD45 ex7-3**

1,5µl Primer **Neo 2A**
 0,1µl SuperTaq-Polymerase (100U/µl)
 ad 50µl H₂O

Pipettierschema für Mastermix: **SLP-65-PCR**

1-2µl genomische DNS
 5µl 10xTaq-Puffer
 1µl dNTPs (10mmol)
 3µl Primer **SLP-65 wt I**
 1,5µl Primer **SLP-65 2**
 0,75µl Primer **Neo 2A**
 0,1µl SuperTaq-Polymerase (100U/µl)
 ad 50µl H₂O

Für die Primerverdünnungen hatte sich die Faustregel 3ng/µl = 1bp (d.h. 60ng/µl H₂O für ein 20bp-mer) bewährt. Entsprechend wurden die Primer verdünnt.

Die jeweilige Typisierungs-PCR erfolgte nach einem der folgenden PCR-Programme in einem T3-Thermocycler von Biometra (Göttingen):

CD22-PCR		
Anzahl der Zyklen	Temperatur °C	Zeit
1	94	2min
30	94	30s
	61	30s
	72	45s
1	72	2min
∞	4	

SLP65- und CD45-PCR		
Anzahl der Zyklen	Temperatur °C	Zeit
1	94	3min
35	94	45s
	52	30s
	72	45s
1	72	2min
∞	4	

Nach der Reaktion wurden die Ansätze mit einem 1%-igen Agarosegel (1xTBE; 2,5-4 µg Ethidiumbromid) aufgetrennt und analysiert. Die erwarteten DNS-Fragmente der jeweiligen PCRs waren wie folgend:

CD22-PCR: k.o.-Fragment: rund 1,2kb
wt-Fragment: 600-800bp

CD45-PCR: k.o.-Fragment: rund 500bp
wt-Fragment: rund 750bp

SLP-65-PCR: k.o.-Fragment: 679bp
wt-Fragment: 385bp

4 Ergebnisse

4.1 Die cytoplasmatische Domäne von CD22

4.1.1 SLP-65/BLNK ein Substrat der Phosphatase SHP-1

An der Entstehung des aktivierenden BZR-Signals ist nicht nur der Antigen-Rezeptor, sondern sind auch sog. „accessory molecules“ --- Transmembranproteine wie CD45, CD19 und CD22 beteiligt. Nach BZR-Stimulation aktiviert die Protein-Tyrosin-Phosphatase CD45 (Leukocyte-specific Receptor-linked Phosphotyrosine Phosphatase) Src-Kinasen wie Lyn, Fyn, Blk, usw. Die Phosphorylierungsziele der aktivierten Src-Kinasen sind u.a. die Tyrosine in den ITAMs (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) von $Ig\alpha/Ig\beta$, die Tyrosine von CD19 und auch die Tyrosine in den ITIMs der cytoplasmatischen Domäne von CD22. Drei der sechs Tyrosine im cytoplasmatischen Teil von CD22 liegen in konservierten Motiven mit der Aminosäuresequenz Ile/Val/Leu/Ser-x-Tyr-x-x-Leu/Val, den sog. ITIMs (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif). Nach Tyrosin-Phosphorylierung der ITIM-Motive binden SH2-Domäne enthaltende Phosphatasen, wie SHP-1 oder SHP-2 (SH2-Domain Containing Tyrosine Phosphatase-1/ -2) oder SHIP (SH2-Domain Containing Inositol Phosphatase) an diese. Während meiner Diplomarbeit konnte ich zeigen, dass ausschließlich SHP-1 mit CD22 co-präzipitiert werden kann. Des weiteren wurde durch die Kristallstruktur von SHP-2 (Hof et al., 1998) deutlich, dass die Affinität und die Aktivität der SHP Phosphatase deutlich zunimmt, wenn die Phosphatase an zwei aufeinanderfolgende ITIMs anlagert. Die inhibitorische Wirkung von CD22 auf das BZR-Signal wurde durch die Analyse der CD22 knock-out Mäuse bzw. deren B-Zellen bestätigt (O'Keefe et al., 1996; Otipoby et al., 1996; Sato et al., 1996; Nitschke et al., 1997).

Ausgehend von der Überlegung, dass das Substrat der an CD22 rekrutierten und aktivierten Phosphatase SHP-1 in CD22-defizienten B-Zellen nach BZR-Stimulation stärker Tyrosin-phosphoryliert sein sollte, wurde mit den vergleichenden Analysen von CD22-defizienten und Kontroll-B-Zellen begonnen. Durch das Fehlen von CD22 in CD22-defizienten B-Zellen sollte SHP-1 nach Stimulation nicht in die unmittelbare Nähe des BZRs gebracht werden. Dies sollte eine erhöhte Tyrosin-Phosphorylierung des Substrates von SHP-1 in CD22-defizienten B-Zellen nach BZR-Stimulation zur Folge haben. Das oder die unbekanntes Substrate sollten Signalmoleküle in der proximalen BZR-Signalkaskade sein, deren Hyperphosphorylierung eine Steigerung des Ca^{2+} -Signals zur Folge hat.

4.1.1.1 Erhöhte Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK in CD22-defizienten B-Zellen nach BZR-Stimulation

In meiner Diplomarbeit (Gerlach, 1998) wurden proximale Signalmoleküle wie Lyn, PLC γ 2, Btk und Vav-1 auf Unterschiede im Tyrosin-Phosphorylierungsgrad nach BZR-Stimulation untersucht. Für die genannten Signalmoleküle wurde kein Unterschied in der Tyrosin-Phosphorylierung in CD22-defizienten und Kontroll-B-Zellen gefunden. Erst das kürzlich beschriebene Adaptermolekül SLP-65 (**S**H2-domain **C**ontaining **L**eukocyte **P**rotein of **65** kD, Wienands et al., 1998), auch BLNK (**B** Cell **L**inker **P**rotein, Fu et al., 1998) oder BASH (**B** Cell **A**daptor **C**ontaining **S**rc **H**omology 2 **D**omain, Goitsuka et al., 1998) genannt, zeigte Unterschiede.

B-Zellen aus CD22-defizienten und Kontroll-Mäusen wurden isoliert und mit anti-BZR Antikörper für die angegebenen Zeiten stimuliert. Die Stimulation der Zellen wurde durch deren Lyse beendet. Mit den Zelllysaten wurde auf zwei unterschiedliche Weisen verfahren. Wie in **Abb.: 4 (A)** gezeigt, wurde das Adaptermolekül zunächst direkt mit anti-SLP-65/BLNK spezifischem Antiserum (Geschenk von A. Chan) immunpräzipitiert. Die Phospho-Tyrosin-Anfärbung des Blots ließ deutlich erkennen, dass in CD22-defizienten B-Zellen SLP-65/BLNK bereits nach 30 Sekunden BZR-Stimulation, d.h. früher als in den Kontroll-B-Zellen, einen sehr hohen Phosphorylierungsgrad aufweist (**Abb.: 4 (A)**). Dieser war im Vergleich zu der SLP-65/BLNK Phosphorylierung in Kontroll-B-Zellen nach 30 Sekunden Stimulation etwa doppelt so hoch (**Abb.: 4 (B)**). In den Kontroll-B-Zellen wurde die höchste Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK nach 5min BZR-Stimulation erreicht. Dieser maximale Phosphorylierungsgrad des Adaptermoleküls in Kontrollzellen lag in CD22-defizienten B-Zellen bereits nach 30s Stimulation vor.

In drei SLP-65/BLNK-Immunpräzipitationen konnte gezeigt werden, dass das Adaptermolekül in CD22-defizienten B-Zellen schon nach 10-30 Sekunden BZR-Stimulation den maximalen Phosphorylierungsgrad erreicht, während dieser in Kontroll-B-Zellen erst nach 3-5 Minuten BZR-Kreuzvernetzung vorliegt.

Der zweite Versuchsansatz zur Analyse des Phosphorylierungsgrades von SLP-65/BLNK waren pull-down Experimente mit einem Grb2(SH2SH3)-GST Fusionsprotein (Geschenk von J. Wienands). In B-Zellen interagiert SLP-65/BLNK mit Vav, Grb2 und PLC γ 2 und bildet einen Multiproteinkomplex. Wienands et al. (1998) hatten gezeigt, dass mit den Grb2-(SH2SH3) Bindungsdomänen SLP-65/BLNK in großen Mengen präzipitiert werden kann. Den Zelllysaten von CD22-defizienten und Kontroll-B-Zellen wurde nach BZR-Stimulation

das Grb2-GST Fusionsprotein, gebunden an Glutathion-Kügelchen, zupipettiert und SLP-65/BLNK über Nacht präzipitiert.

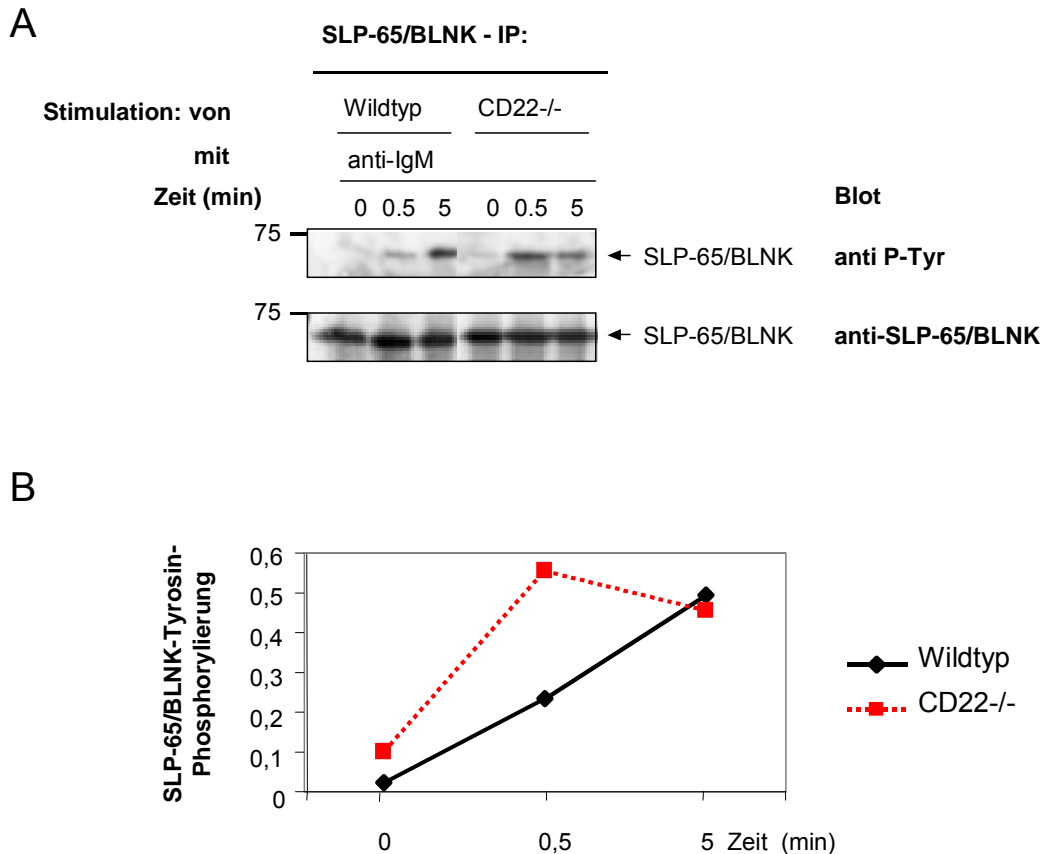


Abbildung 4: Aus CD22-defizienten B-Zellen präzipitiertes SLP-65/BLNK zeigt eine frühere und höhere Tyrosin-Phosphorylierung nach BZR-Stimulation

(A) B-Lymphozyten aus Kontroll- und CD22-defizienten Mäusen wurden aufgereinigt, die Konzentration von $1,5 \times 10^7$ Zellen/ml eingestellt und nach Inkubation mit 2.4G2-Antikörper mit $20 \mu\text{g/ml}$ anti-IgM Antikörper (B7-6) für die angegebene Zeit bei 37°C stimuliert. Die Stimulation wurde durch die Lyse der pelletierten Zellen mit NP-40 Lysepuffer beendet. Aus den Zelllysaten wurde SLP-65/BLNK mit je $3 \mu\text{l}$ Kaninchen anti-SLP-65/BLNK Antiserum (Geschenk von A. Chan) präzipitiert. Nach Transfer der Proteine auf Nitrozellulose wurde diese zunächst mit anti-Phospho-Tyrosin Antikörper (4G10, UBI) und als Ladekontrolle anschließend mit dem Kaninchen anti-SLP-65/BLNK Antiserum (A. Chan) angefärbt. Gezeigt wurde ein repräsentatives von 3 durchgeführten Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen.

(B) Die Signalstärke der SLP-65/BLNK Banden wurde densitometrisch mit dem NIH-Programm ausgewertet. Die Intensität der SLP-65/BLNK-Phospho-Tyrosin Banden wurde durch die Pixelzahl der Ladekontrolle SLP-65/BLNK dividiert. Der gezeigte Graph bezieht sich auf das abgebildete Experiment und zeigt die Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK in Kontroll- und CD22-defizienten B-Zellen in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer.

Das in **Abb.: 5 (A)** abgebildete Ergebnis des Grb2-GST pull-down Experiments bestätigte die bereits beschriebene Beobachtung, dass in CD22-defizienten B-Zellen das Adapterprotein SLP-65/BLNK während der Signalinitiation (10 Sekunden nach Zugabe von anti-BZR-Antikörper) etwa zweifach stärker Tyrosin-phosphoryliert vorliegt als in Kontroll-B-Zellen (**Abb.: 5 (B)**). In den wildtypischen B-Zellen wird die maximale Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK erst nach etwa 5 Minuten BZR-Stimulation erreicht.

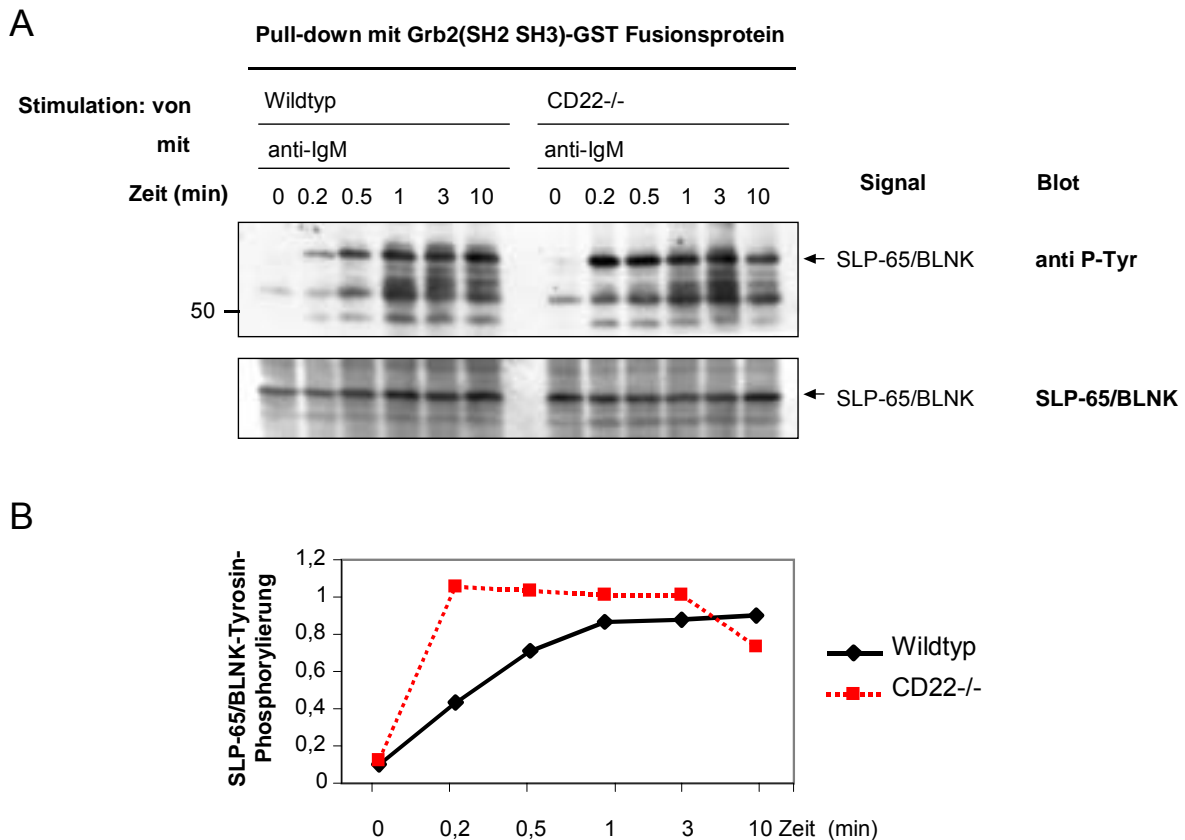


Abbildung 5: **Grb2-GST pull-down Experimente bestätigen die frühere und höhere Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK nach BZR-Stimulation in CD22-defizienten B-Zellen**

(A) B-Lymphozyten aus Kontroll- und CD22-defizienten Mäusen wurden aufgereinigt, die Zellen auf $1,2 \times 10^7$ Zellen/ml verdünnt und nach 2.4G2 Behandlung mit $20 \mu\text{g/ml}$ anti-IgM Antikörper (B7-6) für die angegebene Zeit bei 37°C stimuliert. Die Stimulation wurde durch die Lyse der pelletierten Zellen mit NP-40 Lysepuffer beendet. Den Zelllysaten wurden $15 \mu\text{l}$ der Glutathion-Kügelchen, an die das Grb2-GST Fusionsprotein gebunden war, zupipettiert und über nach SLP-65/BLNK präzipitiert. Die Nitrozellulose wurde nach dem Blocken mit anti-Phospho-Tyrosin Antikörper (4G10, UBI) und als Ladekontrolle anschließend mit dem Kaninchen anti-SLP-65/BLNK Antiserum (A. Chan) angefärbt. Gezeigt ist eines der drei durchgeführten Experimente mit vergleichbaren Resultaten.

(B) Die Signalstärke der SLP-65/BLNK Banden wurde densitometrisch mit dem NIH-Programm ausgewertet. Die Intensität der SLP-65/BLNK-Phospho-Tyrosin Banden wurde durch die Pixelzahl einer Hintergrundbande dividiert. Der gezeigte Graph bezieht sich auf das abgebildete Experiment und zeigt die Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK in Kontroll- und CD22-defizienten B-Zellen in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer.

Auf der Suche nach einem Substrat der an CD22 rekrutierten und aktivierten Phosphatase SHP-1 konnte für das Adaptermolekül SLP-65/BLNK eine frühere und stärkere Tyrosin-Phosphorylierung in CD22-defizienten B-Zellen nachgewiesen werden. Sowohl in direkten SLP-65/BLNK-Immunpräzipitationen, als auch in Grb2-GST pull-down Experimenten wurde die maximale Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK in CD22-defizienten B-Zellen bereits nach 10-30s erreicht, wohingegen in Kontroll-B-Zellen diese erst nach 3-5min BZR-Stimulation nachweisbar war. Anhand der dargelegten Resultate kann nicht ausgeschlossen werden, dass die an CD22 rekrutierte Phosphatase weitere Moleküle in der Signalkaskade dephosphoryliert. Des weiteren klären die Ergebnisse nicht die Wirkungsweise der Phosphatase. SHP-1 könnte das Adaptermolekül direkt dephosphorylieren, oder auch indirekt inhibieren. Um das Adaptermolekül SLP-65/BLNK als Substrat von SHP-1 zu bestätigen, wurden im Folgenden Transfektionsexperimente mit der Plasmazytom-Zelllinie J558L μ m3 begonnen.

4.1.2 Transfektionsexperimente mit der Plasmazytom-Zelllinie J558L μ m3

Beim Vergleich des Phospho-Tyrosin Musters von proximalen Signalmolekülen nach BZR-Stimulation konnte bisher ausschließlich für das Adaptermolekül SLP-65/BLNK ein Unterschied zwischen CD22-defizienten und Kontroll-B-Zellen gefunden werden. In Kapitel 4.1.1 wurde gezeigt, dass SLP-65/BLNK in CD22-defizienten B-Zellen nach BZR-Stimulation früher und stärker Tyrosin-phosphoryliert vorliegt als in Kontroll-B-Zellen. Eine Aufgabe von CD22 in der BZR-Signaltransduktionskaskade ist die Rekrutierung und Aktivierung der Tyrosin-Phosphatase SHP-1. In CD22-defizienten B-Zellen fehlen die ITIMs bzw. die Anlagerungsstellen für die Tyrosin-Phosphatase SHP-1 und dadurch die spezifische inhibierende Aktivität der Phosphatase auf das BZR-Signal. Den bereits gezeigten Daten entsprechend könnte die aktivierte Phosphatase SHP-1 das Adaptermolekül SLP-65/BLNK nach BZR-Stimulation dephosphorylieren, und dadurch den Schwellenwert für die Initiation des BZR-Signals erhöhen. Die genaue Organisation und Regulation an aktivierenden und inhibierenden Signalmolekülen in der unmittelbaren Nähe des BZRs ist Voraussetzung für die Steuerung der Signalstärke.

In Transfektionsexperimenten sollte der Einfluss von CD22 bzw. der an CD22 aktivierten Tyrosin-Phosphatase SHP-1 auf das Adaptermolekül SLP-65/BLNK gezeigt werden. Grundgedanke war, dass durch die Transfektion von CD22 in eine CD22-defiziente murine B-Zelllinie die Phosphatase SHP-1 nach BZR-Stimulation an CD22 rekrutiert und aktiviert

werden würde. Dies sollte eine gerichtete Phosphataseaktivität auf die BZR-Signalkaskade bzw. auf die Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK zur Folge haben. Das BZR-Signal sollte durch das transfizierte CD22 inhibiert werden.

Um die Transfektionsexperimente durchführen zu können, musste eine CD22-defiziente, murine B-Zelllinie gefunden werden, die ein mit primären B-Zellen vergleichbares BZR-Signal initiiert. Da die bekannten Maus B-Zelllinien CD22 auf der Oberfläche tragen, wurde die Plasmazytom-Zelllinie J558L μ m3 für die Transfektionsexperimente ausgewählt. Haben B-Zellen das Stadium der Plasmazelle erreicht, werden die Gene vieler Oberflächenmarker, wie CD22, CD19, CD20, CD40, CD45 und auch die Gene des BZR abgeschaltet. Hombach et al. (1988) hatten in J558L Zellen einen Expressionsvektor codierend für die membranständige Form von IgM (mIgM) mit der Haptenspezifität für 4-Hydroxy-5-Jodo-3-Nitrophenylacetyl (NP) transfiziert. Jener Klon, der IgM auf der Oberfläche trägt, wird J558L μ m3 genannt. Kim et al. (1993) konnten zeigen, dass nach BZR-Kreuzvernetzung der J558L μ m3 Zellen Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK) ähnlich wie in primären B-Zellen phosphoryliert werden. Des weiteren sprach für die Verwendung der J558L μ m3 Zellen, dass Wienands et al. (1998) das Adaptermolekül SLP-65 als eines der am frühesten und prominentesten Tyrosin-phosphorylierten Protein in der Plasmazytom-Zelllinie charakterisiert hatten. Ein Nachteil der Zelllinie war allerdings, dass in J558L μ m3 Zellen nach BZR-Stimulation kein messbares Ca²⁺-Signal induziert wird. Dadurch beschränkte sich die Detektion der BZR-Signalveränderung in den Transfektanten auf Western-Blot Analysen.

Die Transfektionsexperimente mit der Plasmazytom-Zelllinie J558L μ m3 wurden begonnen, um den molekularen Mechanismus der dephosphorylierenden Aktivität der an CD22 aktivierten Phosphatase SHP-1 an SLP-65/BLNK zu bestätigen.

4.1.2.1 Die Stimulation der transfizierten J558L μ m3 Zellen initiiert eine mit primären B-Zellen vergleichbare Tyrosin-Phosphorylierung

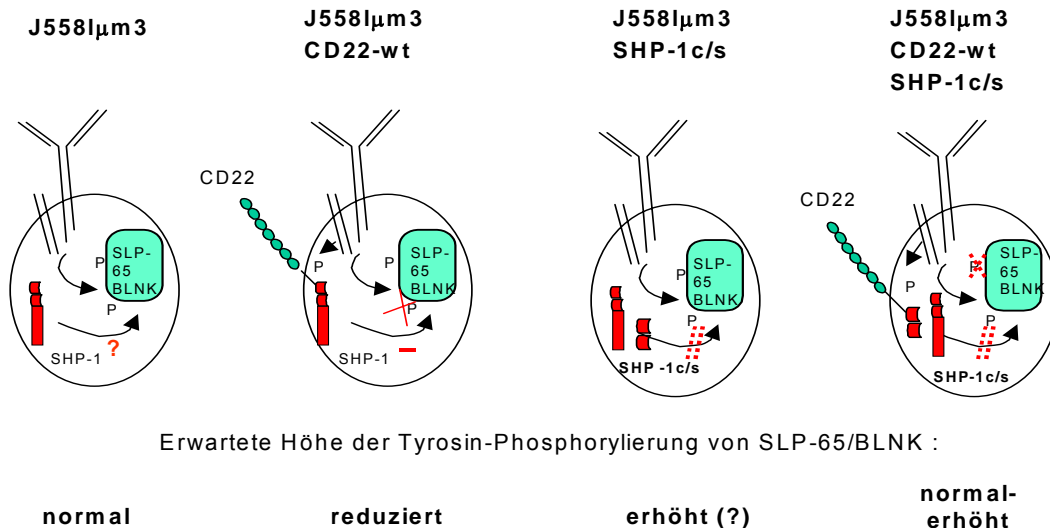
Plasmazellen exprimieren kein CD22. Entsprechend konnte auch auf den J558L μ m3 Zellen kein CD22 in FACS-Analysen nachgewiesen werden (**Abb.: 6 (A)**). Um die J558L μ m3 Zellen stabil mit CD22 transfizieren zu können, wurde von Astrid Heiter und Jörg Klein zunächst die cDNS für wildtypisches CD22 aus C57BL/6J (freundliches Geschenk von P. Anton van der Merwe) in den pcDNS3.1(+)_{Neo} und pcDNS3.1(+)_{Zeo} Vektor (Invitrogen) kloniert. Entsprechend codierten die Expressionsvektoren für die Aminoglycosid Phosphotransferase (Neomycin-Resistenz) und das Bleomycin Gen (Zeocin-Resistenz). Zunächst wurden die

J558L μ m3 Zellen mit dem pcDNS3.1(+)*Neo* CD22-wt Expressionsvektor transfiziert und Einzelzellklone etabliert. Im Folgenden werden die wildtypisches CD22 exprimierenden J558L μ m3 Klone im Text mit CD22-wt und in den Abbildungen werden die J558L μ m3 Zellen mit der Abkürzung J558L bezeichnet.

Des weiteren erhielten wir von Takeshi Tsubata J558L μ m3 Zellen, die stabil mit einer dominant-negativen Mutante der Tyrosin-Phosphatase SHP-1 (SHP-1c/s) transfiziert worden waren (Vektor codiert für Neomycin-Resistenz). In den Expressionsvektor pBluescript war die cDNS für murines SHP-1 kloniert und durch ortsgerichtete Mutagenese des Cystein453 durch Serin ausgetauscht worden. Während die SH2-Bindungsdomäne der SHP-1c/s Mutante unverändert blieb, folglich die Anlagerung an Tyrosin-phosphoryliertes CD22 möglich ist, war die katalytische Domäne der Phosphatase durch den Cystein zu Serin Austausch inaktiviert worden. Neben dem endogenen, funktionsfähigen SHP-1 wurde in den mit SHP-1c/s transfizierten J558L μ m3 Zellen auch inaktive Phosphatase exprimiert. Zu dem Zeitpunkt der Versuche lag die SHP-1c/s nicht „getaggt“ vor, d.h. wildtypisches und mutiertes SHP-1 hatten dieselbe Proteingröße. Die Expression der mutierte Form von SHP-1 (SHP-1c/s) in den transfizierten J558L μ m3 Zellen konnte nur in Western-Blots durch den Vergleich der intrazellulären SHP-1 Menge in un- und transfizierten J558L μ m3 Zellen überprüft werden (siehe Abb.: 10). Der SHP-1c/s exprimierende Klon wurde zusätzlich noch mit dem pcDNS3.1(+)*Zeo*-CD22-wt Vektor transfiziert. Auf diese CD22-wt - SHP-1c/s J558L μ m3 Doppeltransfektanten wird zu einem späteren Zeitpunkt eingegangen.

Wie bereits mehrfach beschrieben, sollte mit den J558L μ m3 Transfektanten die Wirkung von CD22 auf das BZR-Signal bzw. auf den Tyrosin-Phosphorylierungsgrad von SLP-65/BLNK untersucht werden. Anhand von **Modell 1** werden die verschiedenen Transfektionen erläutert und die erwarteten Tyrosin-Phosphorylierungsmuster von SLP-65/BLNK veranschaulicht: Nach diesem Modell liegt in untransfizierten J558L μ m3 Zellen SLP-65/BLNK mit einer „normalen“ Tyrosin-Phosphorylierung vor. Wahrscheinlich reguliert die endogene Phosphatase SHP-1 den Aktivierungsgrad der Signalmoleküle. Dieser Phosphorylierungsgrad von SLP-65/BLNK in untransfizierten J558L μ m3 Zellen wurde als Referenzwert für die SLP-65/BLNK Phosphorylierung in den Transfektanten benutzt.

Dem Modell entsprechend sollten nach Transfektion von CD22-wt in J558L μ m3 Zellen die Tyrosine in der cytoplasmatischen Domäne von CD22 phosphoryliert, SHP-1 an CD22 rekrutiert (vgl. Abb.: 7) und dadurch SHP-1 in die unmittelbare Nähe des BZRs gebracht werden. Die Aktivität der Phosphatase sollte auf das Adaptermolekül gerichtet sein. Wir



Modell 1: Erwarteter Tyrosin-Phosphorylierungsgrad von SLP-65/BLNK in J558Lµm3 Transfektanten

J558Lµm3 Zellen wurden mit CD22-wt, SHP-1c/s und mit CD22-wt zusammen mit SHP-1c/s transfiziert. Abgebildet sind die erwarteten, sehr stark vereinfachten Signalkaskaden nach BZR-Stimulation, die die jeweils angegebene Tyrosin-Phosphorylierung des Adaptermoleküls bewirken sollten. Genauere Erläuterungen sind im Text zu finden.

erwarteten, dass in CD22-Transfektanten SHP-1 SLP-65/BLNK dephosphoryliert, was in Western-Blot Analysen durch eine reduzierte Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK nachweisbar sein sollte. Im Gegensatz dazu wurde in den J558Lµm3 Zellen, die die dominant-negative Variante von SHP-1 exprimieren, eine erhöhte Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK vorhergesagt. Diese Vorhersage würde zutreffen, wenn die Phosphatase auch ohne inhibitorischen Rezeptor wie CD22 aktiv wäre (im Modell gekennzeichnet durch Fragezeichen). Dann sollte in den SHP-1c/s Transfektanten die endogene Menge an funktionellem SHP-1 zwar die gleiche bleiben, aber die SHP-1c/s Mutante würde um das Substrat der Phosphatasen kompetitieren. Mit der CD22-wt - SHP-1c/s Doppeltransfektanten sollte der direkte Bezug zwischen CD22, SHP-1 und SLP-65/BLNK bewiesen werden. Wäre die SHP-1c/s Mutante an CD22 gebunden, blieben die Substrate phosphoryliert, d.h. wäre das Adaptermolekül das Substrat der Phosphatase, dann sollte SLP-65/BLNK in den CD22-wt - SHP-1c/s Doppeltransfektanten höher oder normal phosphoryliert sein (**Modell 1**).

Nach Elektroporation des CD22-wt codierenden Expressionsvektors in J558Lµm3 Zellen wurden die Transfektanten in Neomycin-haltigem Medium selektioniert. Mit Hilfe von FACS-Analysen wurde die Expression von CD22 und IgM auf den etablierten Einzelzellklonen überprüft. Die CD22^{hoch} IgM^{hoch} exprimierenden Klone wurden ausgewählt. Die SHP-c/s Transfektanten wurden in Western-Blot Analysen überprüft. Die intrazelluläre SHP-1 Menge

der Transfektanten sollte mindestens doppelt so hoch sein wie in untransfizierten J558L μ m3 Zellen (vgl. Abb.:10).

In **Abb.: 6 (A)** wurde eine anti-CD22 und anti-IgM Antikörperanfärbung von untransfizierten J558L μ m3 Zellen, einem ausgewählten CD22-wt und SHP-c/s Klon abgebildet. Die Expressionshöhe von IgM auf den Klonen war vergleichbar hoch und auf dem CD22-wt Klon konnte eine deutliche CD22-Expression nachgewiesen werden. Aus diesen Gründen wurden die gezeigten Klone für die vergleichenden Analysen der Tyrosin-Phosphorylierung von Transfektanten mit primären Maus B-Zellen nach Stimulation benutzt. Dem Protokoll von Wienands et al. (1996) folgend, wurden die J558L μ m3 Zellen 3 Minuten mit Per-Vanadat, einem Phosphataseinhibitor, stimuliert. Durch die Stimulation mit Per-Vanadat werden in B-Zellen die gleichen Signalkaskaden initiiert, wie nach BZR-Kreuzvernetzung. Wienands et al. (1996) hatten gezeigt, dass Per-Vanadat BZR nicht ligiert, sondern in die Zellen eindringt und durch die Inhibition der Phosphatasen die BZR-Signalkaskaden aktiviert. Die genaue Wirkungsweise von Per-Vanadat ist noch nicht bekannt. Die primären B-Zellen wurden für 3 und 10 Minuten mit anti-IgM Antikörper stimuliert.

Wie in der anti-Phospho-Tyrosin Anfärbung in **Abb.: 6 (B)** ersichtlich ist, war eine deutliche Induktion der Tyrosin-Phosphorylierung in den J558L μ m3 Klonen nach Stimulation mit Per-Vanadat zu erkennen. Obwohl etwa ein Drittel weniger Proteinlysate der Transfektanten geladen wurde, war die allgemeine Tyrosin-Phosphorylierung in den J558L μ m3 Zellen stärker als in den primären B-Zellen. Nach längerer Exposition des Blots war in den Lysaten der primären B-Zellen auch eine deutliche Signalinduktion zu beobachten. Der Vergleich der Lysate zeigte, dass die relevanten Signalmoleküle CD22 und SLP-65/BLNK in den J558L μ m3 Zellen phosphoryliert werden. Allerdings wurde durch die Anfärbung des Blots mit anti-CD22 Antikörper offensichtlich, dass die Höhe der CD22 Expression in den J558L μ m3 Transfektanten um das 5- bis 10-fache niedriger ist als auf primären B-Zellen (**Abb.: 6 (B)**). Des Weiteren wurde deutlich, dass auch die Menge an SHP-1 in den J558L μ m3 Zellen um ein vielfaches geringer ist als in primären B-Zellen (**Abb.: 6 (B)**). Trotz der Unterschiede in der Expressionshöhe von CD22 und SHP-1 zwischen primären Maus-B-Zellen und transfizierten J558L μ m3 Zellen wurden die J558L μ m3 Transfektanten in vergleichenden Experimenten auf den Phosphorylierungsgrad von SLP-65/BLNK getestet.

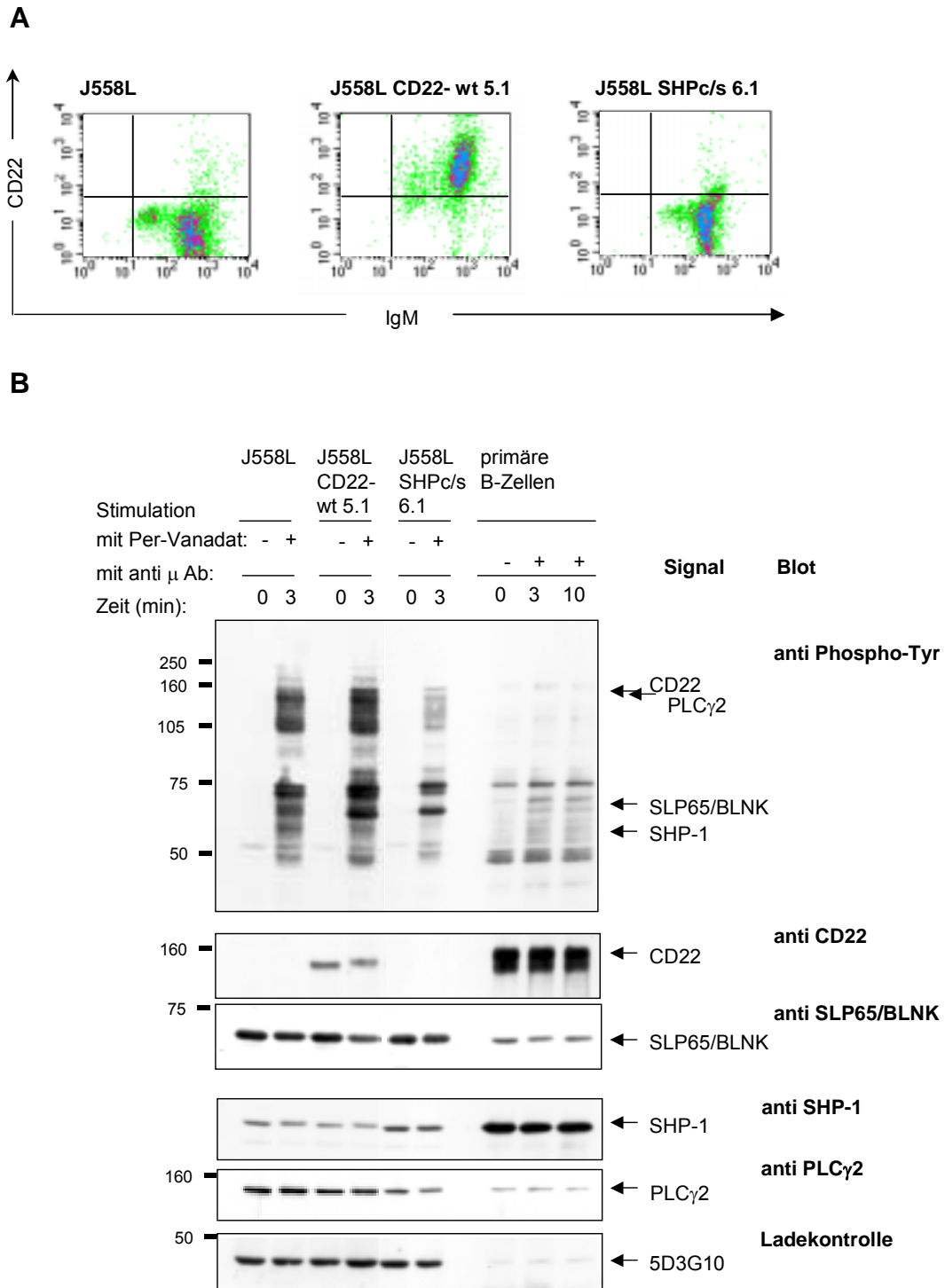


Abbildung 6: Stimulationsvergleich von untransfizierten, CD22-wt und SHP-1c/s transfizierten J558L μ m3 Zellen mit primären B-Zellen

(A) Etwa 1×10^5 untransfizierte, CD22-wt und SHP-1c/s transfizierte J558L μ m3 Zellen wurden mit anti-IgM-FITC und anti-CD22-PE Antikörpern angefärbt und am FACScan ausgewertet. Abgebildet wurde der CD22 und IgM Expressionslevel der untransfizierten J558L μ m3, des J558L μ m3 CD22-wt Klon5.1 und des Klons J558L μ m3 SHP-1c/s 6.1.

(B) Aufgereinigte B-Zellen aus der Milz von C57BL/6J Mäusen wurden mit $10 \mu\text{g/ml}$ anti- μ Antikörper (B7-6) für 3min und 10min stimuliert. Die Stimulation wurde durch die Lyse der Zellen mit Brij-enthaltendem Lyse-

Puffer beendet. Mit untransfizierten, CD22-wt und SHP-1c/s transfizierten J558L μ m3 Zellen wurde in entsprechender Weise verfahren. Allerdings wurden die J558L μ m3 Zellen mit Per-Vanadat (30 μ l 10mM Na-o-Va mit 10 μ l 1M H₂O₂) für 3min stimuliert, dann pelletiert und lysiert. Das Lysat von rund 1,2x10⁵ J558L μ m3 Zellen pro Spur (primäre Zellen 3x10⁵ Zellen pro Spur) wurde im SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine auf Nitrozellulose transferiert, die Membran in 5% fettfreiem Milchpulver geblockt und daraufhin mit anti-Phospho-Tyrosin Antikörper (4G10, UBI) angefärbt. Anschließend wurde der Blot mit Kaninchen anti-CD22, anti-SLP-65/BLNK, anti-Ladekontrolle (alle drei Arbeitskreis) inkubiert und nach ECL-Behandlung exponiert. Nach „Strippen“ des Blots wurde abschließend mit Ziege anti-SHP-1 und Maus anti-PLC γ 2 (beide UBI) angefärbt.

4.1.2.2 *Transfiziertes CD22 wird in J558L μ m3 Zellen phosphoryliert und rekrutiert die Phosphatase SHP-1*

Neben den bisher beschriebenen Einzeltransfektanten wurden auch CD22-wt - SHP-1c/s Doppeltransfektanten etabliert. In einen SHP-1c/s-positiven Klon (Neomycin-Resistenz) wurde der Expressionsvektor codierend für die cDNS von CD22 und die Zeocin-Resistenz transfiziert. Wie bereits in Modell 1 (Kapitel 4.1.2.1) erläutert, sollte mit Hilfe dieser Doppeltransfektanten der direkte Zusammenhang zwischen CD22, der Phosphatase SHP-1 und dem Adaptermolekül SLP-65/BLNK bestätigt werden. Die SHP-1c/s Mutante sollte mit der SH2-Domäne an Tyrosin-phosphoryliertes CD22 binden. Durch die inaktivierte katalytische Domäne der SHP-1c/s Mutante bleibt die dephosphorylierende Wirkung der Phosphatase an SLP-65/BLNK aus. Dies sollte zu einer gestiegenen oder normalen Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK führen, die in Western-Blots nachgewiesen werden kann (vgl. Modell 1).

Bevor die Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK in den Einzel- und Doppeltransfektanten verglichen wurde, sollte zunächst sicher gestellt werden, dass CD22 in den Transfektanten nicht nur Tyrosin-phosphoryliert wird, sondern dass die Phosphatase SHP-1 auch an CD22 bindet. Hierfür wurden Zellen von dem CD22-wt Klon 3.1 und von dem CD22-wt - SHP-1c/s Klon d.1 mit Per-Vanadat für die angegebene Zeit bei 37°C stimuliert. Über Nacht wurde aus den Zelllysaten CD22 immunpräzipitiert. Wie in **Abb.: 7** deutlich zu erkennen ist, wurde CD22 in den transfizierten J558L μ m3 Zellen stark Tyrosin-phosphoryliert. Der Phosphorylierungsgrad von CD22 steigt mit Dauer der Stimulation an. Entsprechend der Tyrosin-Phosphorylierung von CD22 bindet auch SHP-1 bzw. SHP-1c/s an CD22, das mit CD22 co-präzipitiert werden konnte.

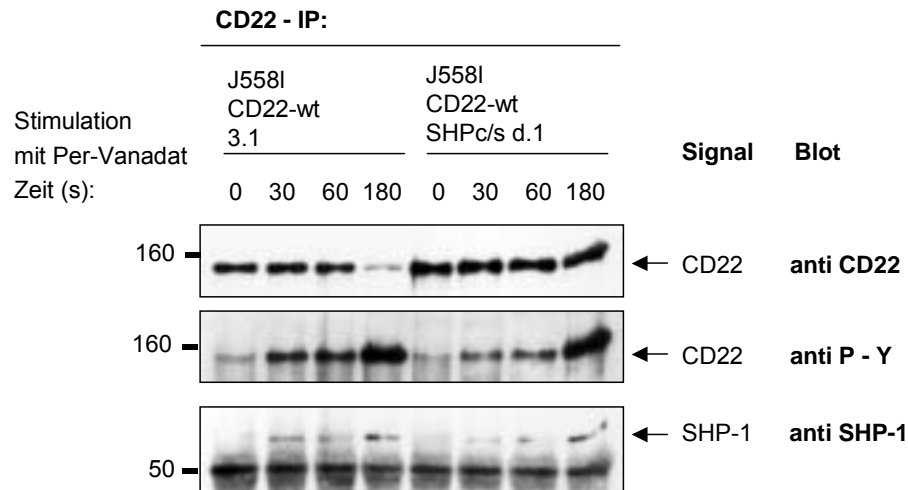


Abbildung 7: **Transfiziertes CD22 wird in J558L μ m3 Zellen nach Stimulation mit Per-Vanadat Tyrosin-phosphoryliert und die Phosphatase SHP-1 an CD22 rekrutiert**

1x10⁷ J558L μ m3 Zellen pro Stimulationszeitpunkt transfiziert mit CD22-wt und mit CD22-wt -SHP-1c/s wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit Per-Vanadat bei 37°C stimuliert, die Zellen pelletiert und in Brij-Lyse-Puffer resuspendiert. Den Zelllysaten wurden 2 μ g Kaninchen anti-CD22 Antikörper (Arbeitskreis) und 20 μ l Sepharose-ProteinA Kügelchen zugegeben und über Nacht CD22 aus den Lysaten präzipitiert. Nach Auftrennung der Proteine im SDS-PAGE und Transfer auf Nitrozellulose-Membran wurde der Blot zuerst mit anti-Phospho-Tyrosin Antikörper (4G10, UBI) angefärbt. Daraufhin wurde der Blot in anti-CD22 (Arbeitskreis) und anti-SHP-1 (UBI) Antikörper inkubiert. Da die Nitrozellulose zunächst mit anti-Phospho-Tyrosin Antikörper angefärbt wurde, kommt es bei der darauf folgenden Behandlung mit dem anti-CD22 Antikörper zu einer sterischen Hinderung der beiden Antikörper. Aus diesem Grund scheint in den CD22-wt 3.1 Zellen nach 3min Stimulation nur eine minimale Menge an CD22 präzipitiert worden zu sein.

Mit dem beschriebenen Resultat wurde gezeigt, dass das in J558L μ m3 Zellen transfizierte CD22 nach Initiation der BZR-Signaltransduktionskaskade Tyrosin-phosphoryliert wird. Entsprechend den Beobachtungen in primären B-Zellen (Doody et al., 1995, Blasioli et al., 1999; Yohannan et al., 1999; Otipoby et al., 2001) lagert sich daraufhin SHP-1 bzw. SHP-1c/s an CD22 an.

4.1.2.3 In J558L μ m3 Zellen transfiziertes CD22 zeigt keinen inhibitorischen Einfluss auf das Adaptermolekül SLP-65/BLNK

In Western-Blot Experimenten wurde die Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK in den zuvor beschriebenen CD22-wt Einzel- und CD22-wt - SHP-1c/s Doppeltransfektanten nach Stimulation mit Per-Vanadat verglichen. Für die Stimulationsversuche wurden jene Transfektanten ausgewählt, die vergleichbare Mengen an IgM und/oder CD22 auf der Oberfläche trugen (FACS-Anfärbung nicht abgebildet). In **Abb.: 8** ist ein exemplarisches

Experiment gezeigt, in dem untransfizierte, CD22-wt einzel- und CD22-wt - SHP-1c/s doppel-transfizierte J558L μ m3 Zellen mit Per-Vanadat für die angegebene Zeit stimuliert und anschließend lysiert wurden. Um das Adaptermolekül gezielter analysieren zu können, wurden neben Ganzzelllysaten auch Grb2-GST pull-down Experimente durchgeführt (**Abb.: 8**). Das Grb2-GST Fusionsprotein wurde zur Präzipitation von SLP-65/BLNK benutzt (vgl. Kapitel 4.1.1.). Allerdings interagiert das Grb2-GST Protein neben dem Adaptermolekül noch mit weiteren Phosphoproteinen in dem Zelllysate, was deutlich in der anti-Phospho-Tyrosin Anfärbung der Nitrozellulose zu erkennen ist (**Abb.: 8**). Mit Dauer der Stimulation steigt der Phosphorylierungsgrad von mehreren Tyrosin-phosphorylierten Proteinen, unter ihnen das anhand der Größe identifizierte SLP-65/BLNK. Entgegen den Erwartungen ist die Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK in den CD22-Transfektanten im Vergleich zu den untransfizierten J558L μ m3 Zellen nicht reduziert. In Klon CD22-wt 5.1 ist das Adaptermolekül mehrfach höher und in Klon CD22-wt 3.1 etwa gleich stark Tyrosin-phosphoryliert wie in untransfizierten J558L μ m3 Zellen nach Per-Vanadat Stimulation.

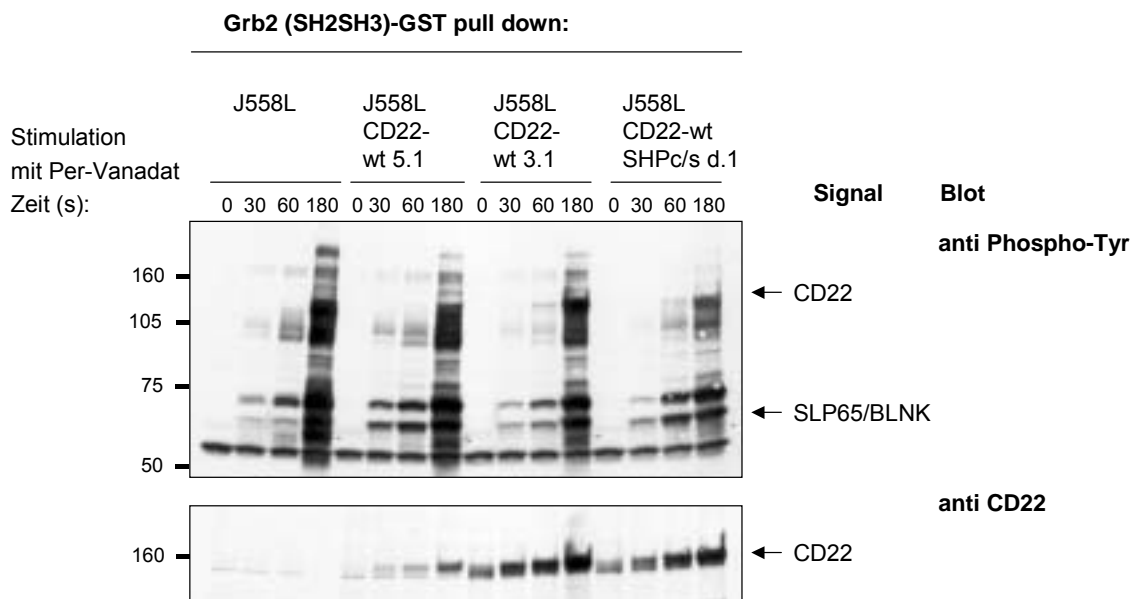


Abbildung 8: Keine Verringerung der SLP-65/BLNK Tyrosin-Phosphorylierung nach Stimulation mit Per-Vanadat in CD22 transfizierten J558L μ m3

7×10^6 untransfizierte, mit CD22-wt transfizierte und mit CD22-wt - SHP-1c/s doppel-transfizierte J558L μ m3 Zellen wurden für die angegebenen Zeit mit Per-Vanadat bei 37°C stimuliert. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden die Zellen zentrifugiert und das Pellet in eiskaltem NP-40 Lyse-Puffer resuspendiert. Den Lysaten wurden je 15 μ l Grb2-GST gebunden an Glutathion-Kügelchen zugegeben und über Nacht bei 4°C rotiert. Die durch das Fusionsprotein präzipitierten Proteine wurden auf ein SDS-PAGE aufgetragen und darin aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf Nitrozellulose-Membran wurde der Blot zuerst mit anti-Phospho-Tyrosin Antikörper (4G10, UBI) angefärbt. Daraufhin wurde der Blot in Kaninchen anti-CD22 und anti-SLP-65/BLNK (beide Arbeitskreis, letzteres nicht gezeigt) Antikörper inkubiert. Nach dem „Strippen“ der Nitrozellulose wurde der Blot noch in anti-SHP-1 (UBI) Antikörper inkubiert. Durchgeführt wurden insgesamt 7 Experimente, in denen CD22-

Einzel und Doppeltransfektanten nach Per-Vanadat Stimulation auf ihre SLP-65/BLNK Tyrosin-Phosphorylierung getestet wurden. Von diesen waren 4 Experimente Grb2-GST pull-down Experimente und 3 Ganzzelllysate.

Insgesamt wurden 7 Experimente (3 Ganzzelllysate und 4 Grb2-GST pull down Experimente) durchgeführt, um den Phosphorylierungsgrad von SLP-65/BLNK in 6 verschiedenen CD22-wt Klonen mit untransfizierten J558L μ m3 Zellen nach Per-Vanadat Stimulation zu vergleichen. Es wurde kein CD22 positiver J558L μ m3 Klon gefunden, in dem die Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK reproduzierbar niedriger war als in untransfizierten J558L μ m3 Zellen. Dagegen entsprach die Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK in der getesteten CD22-wt - SHP-1c/s Doppeltransfektanten den Erwartungen. Die Phosphorylierung von SLP-65/BLNK war immer höher im Vergleich zu untransfizierten J558L μ m3 Zellen (**Abb.: 8**). Allerdings könnte dies an der Inaktivität der mutierten Phosphatase SHP-1c/s liegen. Wie in dem nachfolgenden Kapitel 4.1.2.4 dargelegt wird, war die Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK in der SHP-1c/s Einzeltransfektanten bereits deutlich höher im Vergleich zu untransfizierten J558L μ m Zellen. Des Weiteren wurden die CD22-wt - SHP-1c/s Doppeltransfektanten nicht statistisch durchgetestet. Der Grund hierfür war, dass die Resultate der Doppeltransfektanten keine Aussagekraft haben, solange das Grundmodell der CD22-wt Einzeltransfektanten nicht den Erwartungen entspricht.

Als mögliche Erklärung für die unerwartet gestiegene Phosphorylierung von SLP-65/BLNK in den CD22-wt Einzeltransfektanten wurde die Stimulation mit dem Phosphataseinhibitor Per-Vanadat erwogen. Aus diesem Grund wurden die vergleichenden Stimulationsexperimente der CD22-wt Transfektanten mit dem spezifischen Antigen der J558L μ m3 Zellen wiederholt. Die Plasmazytom-Zelllinie exprimiert einen für das Hapten 4-Hydroxy-3-Nitrophenylacetyl (NP) spezifischen BZR. Um die BZR kreuzvernetzen zu können, wurden das NP-Hapten an BSA (Bovine Serum Albumin; benutzter Besetzungsgrad: NP₉-BSA) gekoppelt. Untransfizierten J558L μ m3 Zellen und CD22-wt Transfektanten wurden mit NP₉-BSA stimuliert, lysiert und sowohl die beschriebenen Ganzzelllysate, als auch die Grb2-GST pull-down Experimente durchgeführt. Aber auch in diesen Ansätzen blieb die Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK in CD22-transfizierten J558L μ m3 Zellen höher als in untransfizierten J558L μ m3 Zellen (Daten nicht gezeigt).

Um eine Erklärung für die beschriebenen Ergebnisse zu finden, wurden CD22-wt Klone „negativ sortiert“, d.h. zwei CD22 positive J558L μ m3 Klone wurden mit anti-IgM und anti-CD22 Antikörpern angefärbt und im FACS-Sorter nach CD22^{negativen} IgM^{hoch} exprimierenden

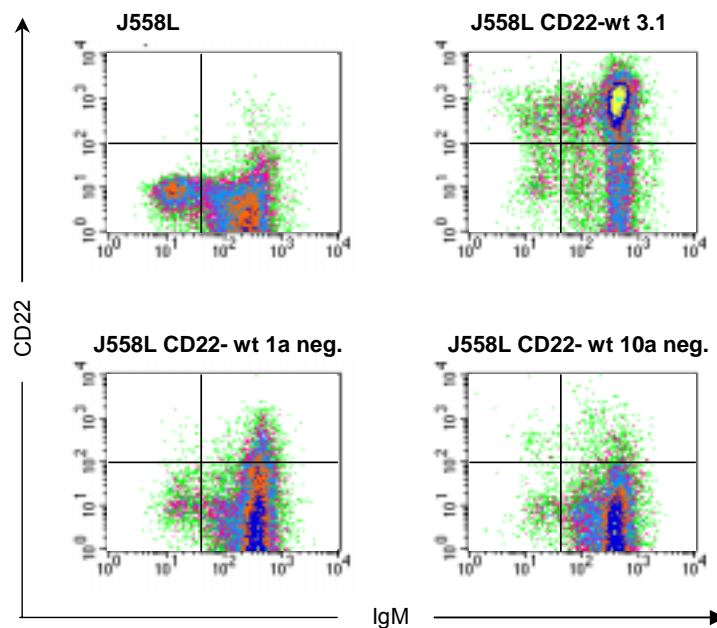
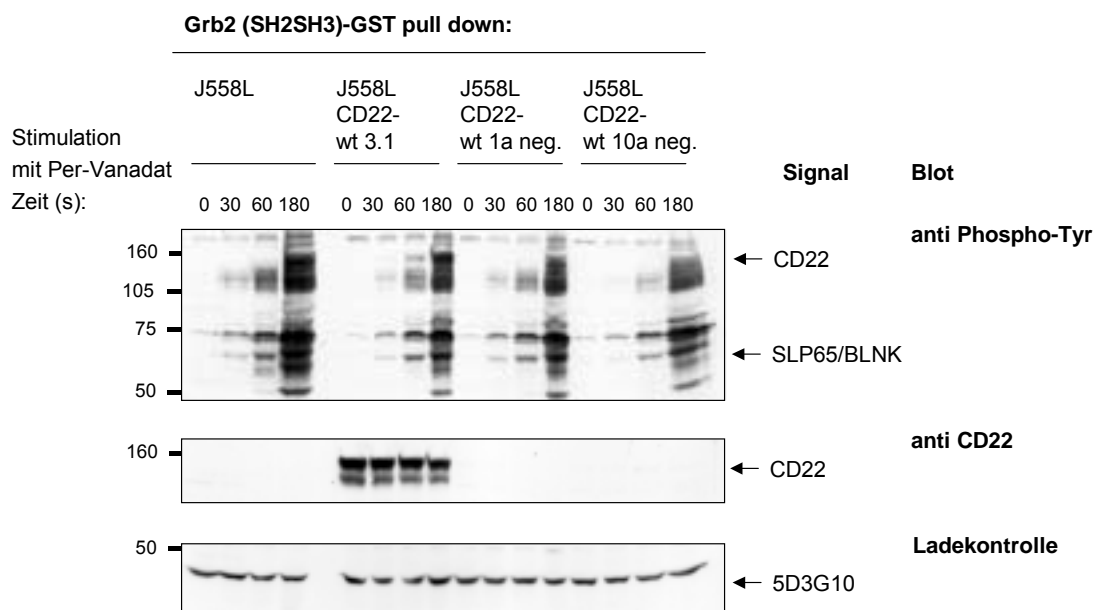
A**B**

Abbildung 9: Die SLP-65/BLNK Tyrosin-Phosphorylierung korreliert nicht mit der Expression von CD22 in transfizierten J558L μ m3 Zellen

(A) Etwa 5×10^5 untransfizierte und CD22-wt transfizierte J558L μ m3 Zellen wurden mit anti-IgM-FITC und anti-CD22-PE Antikörpern angefärbt und am FACScan analysiert. Abgebildet wurde der CD22 und der IgM Expressionslevel der untransfizierten J558L μ m3, des Klon CD22-wt 3.1, des Klon1a und Klon10a. Die Klone 1a und 10a waren zuvor auf CD22-negative Zellen im FACS-Sorter sortiert und weiter in Selektionsmedium gehalten worden.

(B) 1×10^7 untransfizierte und mit CD22-wt transfizierte und negativ sortierten J558L μ m3 wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit Per-Vanadat auf 37°C stimuliert. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden die Zellen zentrifugiert und das Pellet in eiskaltem NP-40 Lyse-Puffer resuspendiert. Aus den Lysaten wurden etwa $1,6 \times 10^6$

Zellen pro Spur auf ein SDS-PAGE aufgetragen und im Gel aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf Nitrozellulose-Membran wurde der Blot zuerst mit anti-Phospho-Tyrosin Antikörper (4G10, UBI) angefärbt. Daraufhin wurde der Blot in Kaninchen anti-CD22 und anti-SLP-65/BLNK (beide Arbeitskreis, nicht gezeigt) Antikörper inkubiert. Nach dem „Strippen“ der Nitrozellulose wurde der Blot noch in anti-5D3G10 Antikörper (Ladekontrolle, Arbeitskreis) inkubiert. Abgebildet wurde ein Experiment von drei durchgeführten mit denselben, im Text beschriebenen Resultaten.

Zellen sortiert. In Stimulationsexperimenten mit Per-Vanadat wurden diese CD22^{negativen} Subklone mit einer überwiegend CD22^{positiven} Transfektante verglichen **Abb.: 9 (B)**. Obwohl die CD22^{negativen} Subklone kein CD22 mehr auf der Oberfläche trugen (**Abb.: 9 (A)**), blieben die Zellen Neomycin-resistent. Durch die anti-CD22 Anfärbung in **Abb.: 9 (B)** wird deutlich, dass auch in Western-Blot Analysen in den „negativ sortierten“ J558L μ m3 Lysaten kein CD22 mehr detektierbar war. Die anti-Phospho-Tyrosin Anfärbung der Ganzzelllysate verdeutlicht den SLP-65/BLNK Phosphorylierungsgrad nach Stimulation. Dieser ist zwischen CD22-wt positiven und negativen J558L μ m3 Zellen vergleichbar hoch.

In den Experimenten konnte kein Unterschied in der SLP-65/BLNK Tyrosin-Phosphorylierung in CD22 positiven oder CD22 negativen Klonen festgestellt werden. Dieser Versuchsansatz überzeugte uns davon, dass die Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK in den transfizierten J558L μ m3 Zellen nicht mit der Expression von CD22 korreliert.

4.1.2.4 Die Tyrosin-Phosphatase SHP-1 reguliert den Phosphorylierungsgrad von SLP-65/BLNK

Die im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Resultate stellten die in Modell 1 dargelegten Arbeitshypothesen in Frage. Daher musste geklärt werden, ob die Phosphatase SHP-1 an der Regulation der Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK beteiligt ist. Experimente wurden durchgeführt, in denen der Phosphorylierungsgrad von SLP-65/BLNK in untransfizierten mit dem Phosphorylierungsgrad von SLP-65/BLNK in SHP-1c/s transfizierten J558L μ m3 Zellen verglichen wurde.

Wie bereits erwähnt, stand zur Zeit der Transfektion nur der Expressionsvektor codierend für die cDNS der „ungetaggte“ SHP-1c/s Mutante zur Verfügung. Die erfolgreiche Transfektion mit der SHP-1c/s Mutanten war ausschließlich durch Western-Blot Anfärbungen detektierbar. In diesen wurde die intrazelluläre SHP-1 Menge in untransfizierten J558L μ m3 Zellen mit der SHP-1 plus SHP-1c/s Menge in transfizierten J558L μ m3 Zellen verglichen. Der SHP-1

spezifische Western-Blot Antikörper erkennt beide Formen der Phosphatase in den Transfektanten. Wie in der anti-SHP-1 Anfärbung in **Abb.: 10** ersichtlich, ist die Menge an SHP-1 in der SHP-1c/s Transfektanten mindestens doppelt so hoch wie in untransfizierten J558L μ m3 Zellen.

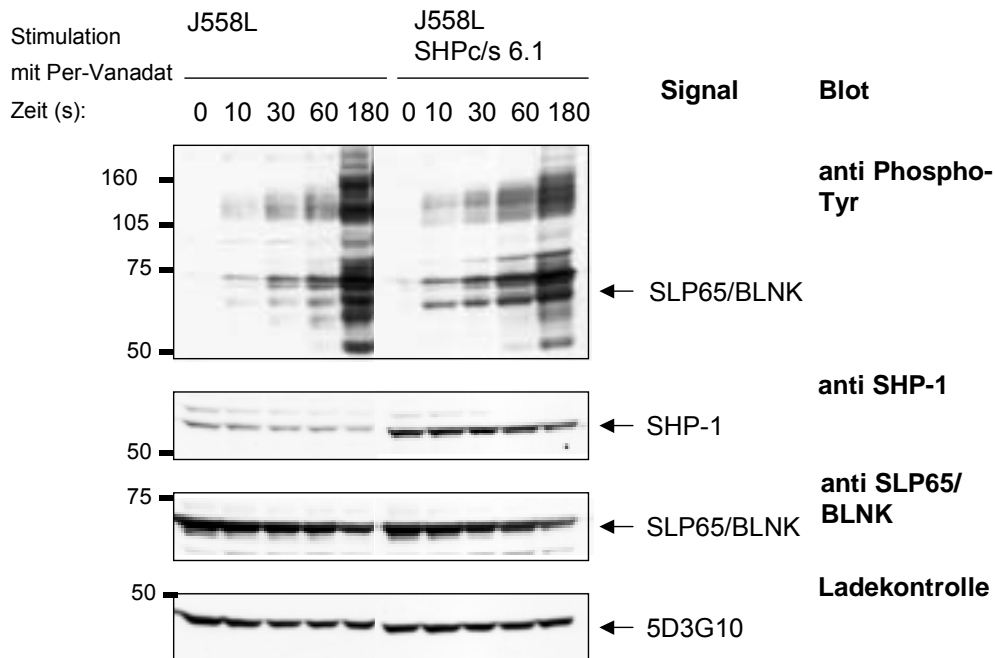


Abbildung 10: In J558L μ m3 Zellen transfiziert mit der dominant-negativen Mutante SHP-1c/s ist SLP-65/BLNK höher Tyrosin-phosphoryliert als in untransfizierten J558L μ m3

Mit Per-Vanadat wurden 1×10^7 untransfizierte und mit SHP-1c/s transfizierte J558L μ m3 Zellen für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden die Zellen zentrifugiert und das Pellet in eiskaltem NP-40 Lyse-Puffer resuspendiert. Aus den Lysaten wurden etwa $1,6 \times 10^6$ Zellen pro Spur auf ein SDS-PAGE aufgetragen und im Gel aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf Nitrozellulose-Membran wurde der Blot zuerst mit anti-Phospho-Tyrosin Antikörper (4G10, UBI) angefärbt. Daraufhin wurde der Blot in anti-SLP-65/BLNK (Arbeitskreis), anti-SHP-1 (UBI) und anti-5D3G10 (Ladekontrolle, Arbeitskreis) Antikörpern inkubiert.

Um die Notwendigkeit von SHP-1 in der Regulation der Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK nachzuprüfen, wurden untransfizierte und mit SHP-1c/s transfizierte J558L μ m3 Zellen mit Per-Vanadat für die angegebene Zeit stimuliert, lysiert und im Western-Blot der Phosphorylierungsgrad von SLP-65/BLNK analysiert. Wie in **Abb.: 10** gezeigt, ist das Adaptermolekül SLP-65/BLNK in SHP-1c/s transfizierten J558L μ m3 Zellen höher Tyrosin-phosphoryliert. In der abgebildeten anti-Phospho-Tyrosin Anfärbung ist deutlich zu erkennen, dass in der SHP-1c/s Transfektanten neben SLP-65/BLNK noch weitere Moleküle dominant phosphoryliert sind. Dies deutete darauf hin, dass die Tyrosin-Phosphatase SHP-1 noch

weitere, unbekannte Signalmoleküle in der BZR-Signalkaskade durch ihre dephosphorylierende Aktivität reguliert.

Die bisher mit den CD22-wt transfizierten J558L μ m3 Zellen durchgeführten Stimulationsexperimente hatten nicht die erwartete Reduktion der Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK gezeigt. Diese Beobachtung konnte nicht mit fehlender SHP-1 Phosphataseaktivität erklärt werden, denn die dephosphorylierende Aktivität von SHP-1 an SLP-65/BLNK wurde im Vergleich von untransfizierten und mit SHP-1c/s transfizierten J558L μ m3 Zellen deutlich (**Abb.: 10**). Das in die J558L μ m3 Zellen transfizierte CD22 hatte keinen inhibitorischen Einfluss, sondern das Gegenteil schien der Fall zu sein. Die Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK stieg nach Stimulation stärker an als in untransfizierten Zellen. Wir stellten uns die Frage, welcher Unterschied zwischen primären B-Zellen und dem ausgewählten Modellsystem der J558L μ m3 Zellen solche Folgen in der intrazellulären BZR-Signalleitung verursachen könnte. Neben den intrazellulären Veränderungen, die eine Tumorzelle unsterblich machen, fehlen auf den J558L μ m3 Plasmazytomzellen wichtige co-stimulatorisch wirkende Oberflächenmoleküle wie CD45, CD19, usw. Das Fehlen dieser Moleküle auf den J558L μ m3 Zellen hatte bei den bisher veröffentlichten Resultaten über die intrazelluläre Signalweiterleitung keinen Unterschied zu primären Zellen erkennen lassen. Allerdings hatten Hennes et al. (1998) in ST5Gal1 Sialinsäuretransferase knock-out Mäusen gezeigt, dass für die Initiation des BZR-Signals alpha2,6-gekoppelte Sialinsäure auf der Oberfläche von B-Zellen wichtig ist. Der spezifische Ligand von CD22 ist die alpha2,6-verknüpfte Sialinsäure. Daher erschien es uns wichtig, J558L μ m3 Zellen auf alpha2,6 Sialinsäure auf ihrer Oberfläche zu überprüfen.

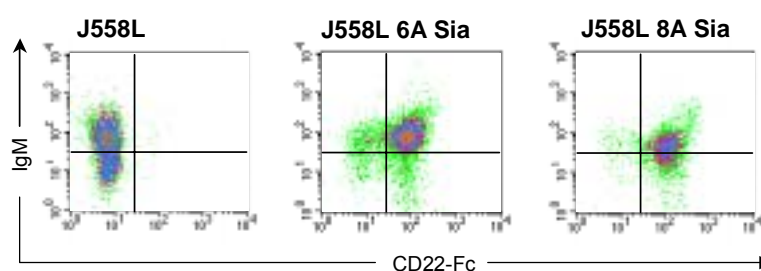
4.1.2.5 Transfektion der Plasmazytomzellen J558L μ m3 mit dem Sialinsäuretransferase ST6Gal1 codierenden Expressionsvektor

Die Bindungsspezifität von CD22 für alpha2,6-gekoppelte Sialinsäure wurde von Sgroi et al. (1993) mit Hilfe von löslichen CD22-Ig Fusionsproteinen erstmals gezeigt. Im Laufe der Jahre wurde deutlich, dass die N-terminale Lectin-Domäne (V-set Domäne) von CD22 für die Erkennung essentiell ist. Unabhängig vom Proteingerüst, dessen Zuckergruppen mit alpha2,6 Sialinsäure modifiziert wurde, bindet CD22 den Liganden (Bakker et al., 2002). Weder der physiologische Nutzen, noch die Auswirkungen dieser alpha2,6 Sialinsäure-abhängigen Interaktion von CD22 konnte bisher geklärt werden. Die starke negative Ladung der Sialinsäure auf der Oberfläche von Zellen bewirkt den Zell-Zell-Abstoßungseffekt.

Ruhende, primäre B-Zellen sind in der Regel stark sialyliert. Deshalb wurde die Expression von alpha2,6-verknüpfter Sialinsäure auf J558L μ m3 Zellen überprüft. Hierfür wurde ein CD22-Fc Fusionsprotein benutzt, das spezifisch an alpha2,6-verknüpfter Sialinsäure bindet. P. Crocker hatte dieses chimere Fusionsprotein hergestellt, das aus den drei N-terminalen Ig-Domänen von CD22 (V-set und zwei C₂-set Domänen) gekoppelt an einen humanen IgG-Fc Teil besteht. Dadurch ergibt sich ein Antikörper-ähnliches Molekül mit 2 F(ab) Teilen, die durch die N-terminale Adhäsionsdomäne von CD22 spezifisch alpha2,6 Sialinsäure erkennen.

Die FACS-Analyse der mit dem CD22-Fc Molekül angefärbten J558L μ m3 Zellen verdeutlichte, dass sich auf der Oberfläche der Plasmazytomzellen keine alpha2,6 Sialinsäure befindet (**Abb.: 11 (A)**). Daher wurde in J558L μ m3 Zellen ein Expressionsvektor codierend für die cDNS der Sialinsäuretransferase ST6Gal1 (Neomycin-Resistenz, freundliches Geschenk von Karen Snapp) transfiziert. Die Expression der Sialinsäuretransferase führt im Golgi-Apparat zur Sialylierung von Proteinen, die daraufhin auf die Zelloberfläche transportiert werden. Anfärbungen der ST6Gal1-transfizierten Einzelzellklone mit dem CD22-Fc Molekül und IgM Antikörper und anschließender FACS-Analyse ergaben zwei alpha2,6 Sialinsäure^{positiv} IgM^{positiv} Transfektanten (**Abb.: 11 (A)**), die im Folgenden 6A Sia und 8A Sia genannt werden.

In Stimulationsexperimenten mit dem spezifischen Antigen NP₉-BSA wurde die Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK in den ST6Gal1 Transfektanten überprüft (**Abb.: 11 (B)**). Die Induktion der Tyrosin-Phosphorylierung nach NP₉-BSA Stimulation verläuft langsamer als nach Per-Vanadat Behandlung. Deutlich aber steigt die Phosphorylierung von SLP-65/BLNK mit der Stimulationsdauer an. In der ST6Gal1 Transfektanten 6A Sia ist SLP-65/BLNK weniger Tyrosin-phosphoryliert als in untransfizierten Zellen, wohingegen in den Zellen des 8A Sia Klons SLP-65/BLNK nach Stimulation höher phosphoryliert vorliegt.

A

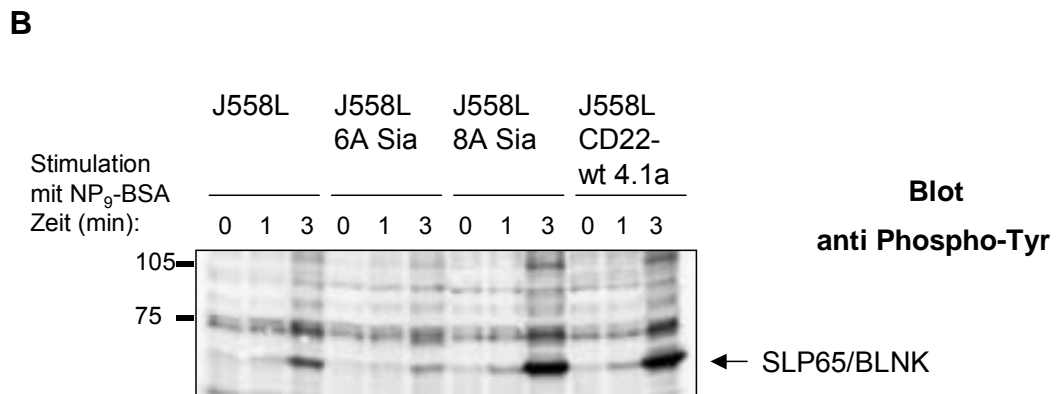


Abbildung 11: **J558L μ m3 Plasmazytomzellen tragen nach Transfektion mit der Sialinsäuretransferase ST6Gal1 alpha2,6 Sialinsäure auf der Oberfläche**

(A) 1×10^5 untransfizierte und mit Sialinsäuretransferase ST6Gal1 transfizierte J558L μ m3 Zellen wurden mit dem CD22-Fc Molekül (anschließend anti-human IgG-FITC Antikörper) und anti-IgM-PE angefärbt und am FACScan analysiert. Abgebildet wurde die Menge an alpha2,6 Sialinsäure auf der Zelloberfläche und der IgM Expressionslevel der untransfizierten J558L μ m3 Zellen und der Klone 6A Sia und 8A Sia.

(B) Die zuvor im FACScan analysierten Klone wurden anschließend mit dem Antigen NP₉-BSA für die angegebene Zeit stimuliert (1×10^7 Zellen pro Zeitpunkt). Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden die Zellen in eiskaltem NP-40 Lyse-Puffer resuspendiert. Etwa $1,5 \times 10^6$ Zellen wurden pro Spur auf ein SDS-PAGE aufgetragen und die Proteine im Gel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrozellulose-Membran wurde der Blot mit anti-Phospho-Tyrosin Antikörper (4G10, UBI) angefärbt. Die Experimente wurden drei Mal wiederholt und zeigten immer das beschriebene Phosphorylierungsmuster.

4.1.2.6 Nach Doppeltransfektion von J558L μ m3 Zellen mit Sialinsäuretransferase ST6Gal1 und CD22 liegt CD22 auf der Zelloberfläche maskiert vor

Nachdem alpha2,6 Sialinsäure tragende Klone etabliert und getestet worden waren, wurden diese zusätzlich mit dem Expressionsvektor codierend für die cDNS von CD22 (Zeocin-Resistenz) transfiziert. Mit diesen Doppeltransfektanten sollte untersucht werden, ob durch die Sialinsäurebindung von CD22 auf der Zelloberfläche die Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK inhibiert wird.

Parallel zu den Transfektionen der 6A Sia und 8A Sia Klone mit wildtypischem CD22 wurde auch der Expressionsvektor, der die cDNS für mutiertes CD22 enthält, in die Sia Klone transfiziert (Zeocin-Resistenz, freundliches Geschenk von P. Anton van der Merwe). Bei diesem mutierten CD22 handelt es sich um einen Austausch der Aminosäure 130 von Arginin in Glutaminsäure (R130E). Dieses Arginin ist in der Lectin-Domäne von Siglecs hochkonserviert und verantwortlich für die Interaktion mit Sialinsäure (van der Merwe et

al.,1995). Ohne das Arginin R130 kann in der Bindungstasche keine Salzbrücke zu der Carboxylgruppe der Sialinsäure entstehen, die Voraussetzung für die Ligandenbindung ist (May et al., 1998). Die ST6Gal1 – CD22-R130E Doppeltransfektante wurde als Negativkontrolle etabliert. Wäre die inhibitorische Wirkung von CD22 abhängig von der Sialinsäure-Bindung von CD22 auf der Zelloberfläche, dann sollte in der ST6Gal1 – R130E Doppeltransfektanten keine Reduktion der SLP-65/BLNK Tyrosin-Phosphorylierung nach Stimulation nachweisbar sein.

Die Doppeltransfektanten wurden zunächst auf die Expression von CD22 und IgM in FACS-Analysen überprüft. Die ersten Doppeltransfektion von 6A Sia und 8A Sia ergab 11 CD22-wt und 11 CD22-R130E Klone, die $IgM^{hoch}CD22^{med-hoch}$ exprimierten (**Tab 8**). Durch die anschließende Färbung der $IgM^{hoch}CD22^{med-hoch}$ Klone mit dem CD22-Fc Molekül blieben 6 CD22-wt und 4 CD22-R130E Klone, die $IgM^{hoch}CD22^{med-hoch}$ und $Sia^{med-hoch}$ auf ihrer Oberfläche hatten. Um die alpha2,6 Sialinsäure-Bindung des transfizierten CD22 auf den zehn etablierten Klonen zu testen, wurde die CD22-Maskierung auf den Doppeltransfektanten untersucht.

Auf ruhenden, primären B-Zellen liegt CD22 cis-maskiert vor. Diese cis-Maskierung umschreibt die Interaktion von CD22 mit alpha2,6 Sialinsäure tragenden Liganden auf derselben Zelloberfläche (Razi und Varki, 1998). Eine Interaktion von CD22 mit alpha2,6 Sialinsäure auf anderen Zellen ist dann nicht möglich. Um diese cis-Liganden Bindung von CD22 zu bestimmen, wurde eine synthetische Probe benutzt. Diese bestehen aus einem Poly-Acryl-Amid (PAA) Träger, an den der spezifische Ligand für murines CD22, nämlich N-Glycolyl-Sialyllactose (Abk.: NeuGc2,6-PAA), gekoppelt wurde. Damit die Probe in FACS-Anfärbungen genutzt werden konnte, war sie biotinyliert worden (Abk.: NeuGc2,6-PAA-bio). Durch die cis-Maskierung kann die Adhäsionsdomäne von CD22 auf B-Zellen mit der NeuGc2,6-PAA-bio Probe nicht angefärbt werden. Erst nach Entfernen der Sialinsäure durch die Behandlung mit Sialidase wird die Adhäsionsdomäne frei und die NeuGc2,6-PAA-bio Probe kann binden. Da in der CD22-R130E Mutanten das für die alpha2,6 Sialinsäure Bindung essentielle Arginin substituiert wurde, kommt es zu keiner Interaktion zwischen den Sia – CD22-R130E Doppeltransfektanten und der Probe.

Die CD22-Maskierung der $IgM^{hoch} CD22^{med-hoch} Sia^{med-hoch}$ J558L μ m3 Doppeltransfektanten wurde mit der NeuGc2,6-PAA-bio Probe untersucht. Untransfizierte J558L μ m3 Zellen, CD22-wt , CD22-R130E und Sia- Einzeltransfektanten, Sia - CD22-wt und Sia - CD22-R130E Doppeltransfektanten wurden vor (blaue Graphen) und nach Sialidase-Behandlung (rote Graphen) mit der NeuGc2,6-PAA-bio Probe angefärbt. In **Abb.: 12** wurden einige

Anfärbungen abgebildet. Die Spezifität der NeuGc2,6-PAA-bio Probe für CD22 wurde durch die Anfärbung der untransfizierte J558L μ m3 Zellen bestätigt.

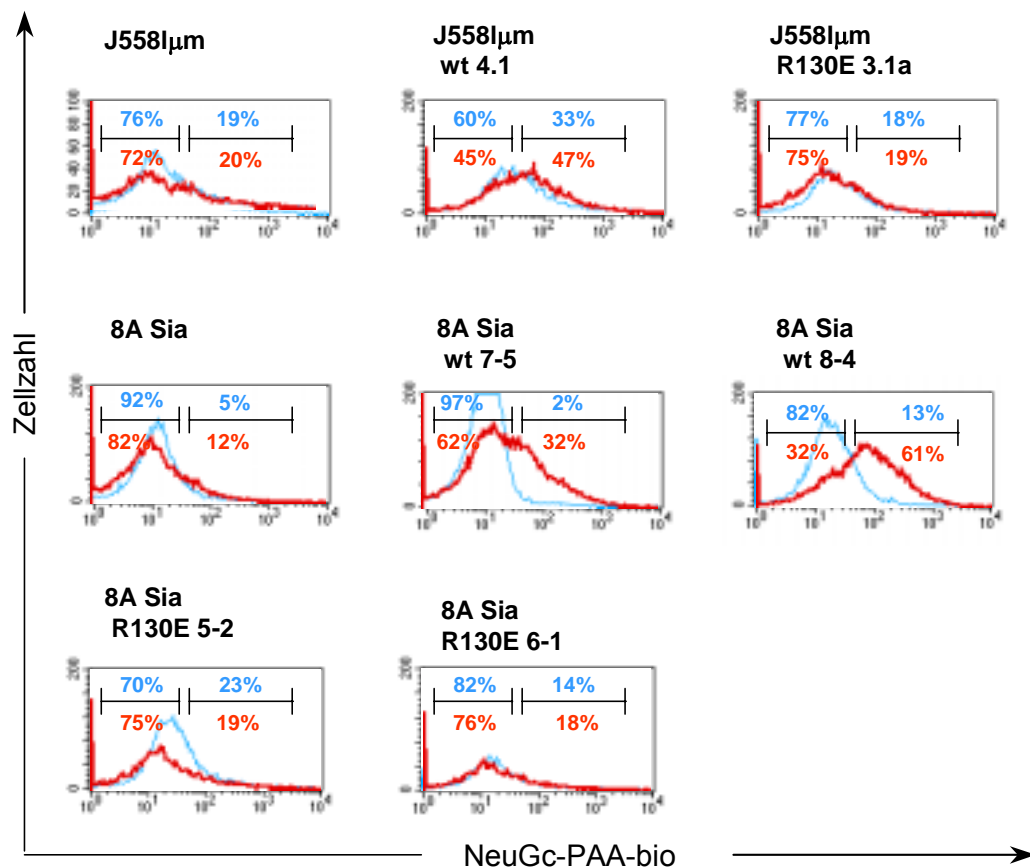


Abbildung 12: **Auf der Zelloberfläche von Sia - CD22 J558L μ m3 Doppeltransfektanten ist CD22 cis-maskiert**
 Von den gezeigten Klonen wurden je 2×10^6 untransfizierte bzw. transfizierte J558L μ m3 Zellen ohne (blaue Graphen) oder mit Sialidase (0,2U/ml in PBS, rote Graphen) für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der behandelten Zellen wurden diese mit der NeuGc2,6-PAA-bio Probe und anschließend mit Strept-PE angefärbt. Parallel wurde die Menge an alpha2,6 Sialinsäure auf den Zellen überprüft, indem die un- und behandelten J558L μ m3 Zellen mit CD22-Fc Molekül inkubiert wurde (nicht gezeigt). Außerdem wurden die Zellen noch gegen IgM und CD22 angefärbt (nicht gezeigt). Angegeben wurde die MFI der nicht (blaue Zahlen) bzw. mit Sialidase behandelten Zellen (rote Zahlen). Die Liganden-Bindung von CD22 aller in Tab. 8 aufgeführten Transfektanten wurden nach dem beschriebenen Protokoll getestet.

Da J558L μ m3 Zellen kein CD22 auf der Zelloberfläche haben, waren über 70% der Zellen nicht mit der Probe anfärbbar. Bei den rund 20% der untransfizierten J558L μ m3 Zellen, die positiv für die NeuGc2,6-PAA-bio Probe waren, kam es zu unspezifischen Interaktionen der Probe mit den Zellen. Im Gegensatz zu den untransfizierten J558L μ m3 Zellen interagierten mehr als 30% der CD22-wt transfizierten Zellen mit der NeuGc2,6-PAA-bio Probe. Die Sialidasebehandlung der CD22-wt Zellen steigerte, unerwarteter Weise, die Bindung der Probe auf 47% der Zellen. Dies könnte durch die Sialidasebehandlung verursacht werden,

während der einige der Zellen sterben. Die Anfärbungen der CD22-R130E Einzeltransfektante und der Zellen des 8A Sia Klons ergaben nur unspezifische Interaktionen der Probe. Die FACS-Analyse der Doppeltransfektanten 8A Sia wt7-5 und 8A Sia wt 8-4 nach der Probenbindung verdeutlicht, dass 97% bzw. 82% des CD22 auf der Oberfläche der Doppeltransfektanten nicht mit der Probe anfärbbar war (blaue Graphen). Die cis-Maskierung wurde durch die Anfärbung der Zellen nach Sialidase Behandlung deutlich. Durch die Inkubation der Zellen in Sialidase (rote Graphen) wird die Adhäsionsdomäne von CD22 frei und die CD22-spezifische Probe kann binden. Im Fall des Klons 8A Sia wt 8-4 waren 61% der Zellen und für Klon 8A Sia wt7-5 etwa 32% der Zellen positiv für die Probenbindung (**Abb.: 12**). Der große Unterschied in der Anzahl der Proben-positiven Zellen kann mit der unterschiedlichen Stabilität der Transfektanten erklärt werden. Einige Zellen des Klon 8A Sia wt7-5 verloren CD22 auf der Oberfläche, wodurch die Anzahl an CD22^{positiven} Doppeltransfektanten sank.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass auf den ST6Gal1 – CD22-wt J558L μ m3 Doppeltransfektanten CD22 ähnlich maskiert vorliegt wie auf primären, murinen B-Zellen. Die alpha2,6 Sialinsäure tragenden Moleküle gelangten auf die Oberfläche und wurden von CD22 gebunden. Allerdings konnte durch diese Ergebnisse nicht geklärt werden, ob CD22 auf den J558L μ m3 Zellen mit denselben alpha2,6 Sialinsäure tragenden Liganden interagiert wie auf primären Zellen.

4.1.2.7 Keine eindeutige Wirkung von CD22 auf die SLP-65/BLNK Tyrosin-Phosphorylierung in Sialinsäuretransferase – CD22 Doppeltransfektanten

Der Phosphorylierungsgrad von SLP-65/BLNK in den ST6Gal1 – CD22-wt J558L μ m3 Doppeltransfektanten nach NP₉-BSA Stimulation wurde in Western-Blot Experimenten untersucht. Entsprechend dem bereits mehrfach beschriebenen Versuchsprotokoll wurden die verschiedenen Doppel- und Einzeltransfektanten mit dem Antigen NP₉-BSA stimuliert, die Zellen lysiert und die Proteine im SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf Nitrozellulose wurden die Blots mit anti-Phospho-Tyrosin, anti-SLP-65/BLNK, anti-CD22 und anti-Ladekontrolle angefärbt. Wie in **Tabelle 8** zusammengefasst dargestellt, wurde die 6A Sia Transfektante in zwei unabhängigen Elektroporationen und die 8A Sia Transfektante in drei unabhängigen Elektroporationen mit den Expressionsvektoren codierend für CD22-wt und CD22-R130E transfiziert. Insgesamt ergaben die Transfektionen 146 IgM^{hoch}CD22-wt^{med-hoch} und 152 IgM^{hoch}CD22-R130E^{med-hoch} stabil exprimierende Einzelzellklone. Von diesen wurde für 51 Klone CD22-wt und 57 Klone CD22-R130E das Expressionsmuster

IgM^{hoch}CD22^{med-hoch}Sia^{med-hoch} nachgewiesen. Aus den optimalen Klonen wurden 20 CD22-wt und 17 CD22-R130E Klone herausgesucht, mit denen Stimulationsexperimente durchgeführt wurden. Wie in dem **Modell 1** verdeutlicht, wurde durch die Transfektion der J558L μ m3 Zellen mit CD22 erwartet, dass SLP-65/BLNK geringer Tyrosin-phosphoryliert vorliegt als in untransfizierten Zellen. Diese niedrigere SLP-65/BLNK Phosphorylierung wurde in 15 von 20 getestete Sia – CD22-wt Doppeltransfektanten nachgewiesen. Nur in vier der Sia – CD22-wt Doppeltransfektanten war SLP-65/BLNK höher phosphoryliert als in untransfizierten J558L μ m3 Zellen. Parallel zu den Stimulationsversuchen wurde die Expression von CD22, IgM und die Menge von alpha2,6 Sialinsäure auf den Zellen überprüft. Es konnte keine Korrelation zwischen der Phosphorylierung von SLP-65/BLNK und dem Expressionslevel von CD22 oder alpha2,6 Sialinsäure nachgewiesen werden. In einem Klon war der Phosphorylierungsgrad zwischen un- und transfizierten Zellen gleich (in Klammern).

Transfektion	Transfektion von Klon	erhaltene Klone (CD22-FITC IgM-PE)	Klone IgM ^{hoch} CD22 ^{med-hoch} Sia ^{med-hoch}	Western-Blot: Anzahl der getesteten Klone (n)	davon SLP-65/BLNK P höher	SLP-65/BLNK P niedriger
1	6A Sia	Wt: 6	Wt: 2	Wt: 1		1
		R130E: 6	R130E: 2	R130E: 2		2
	8A Sia	Wt: 5	Wt: 4	Wt: 4	1	3
		R130E: 5	R130E: 2	R130E: 1	1	
2	6A Sia	Wt: 33	Wt: 7	Wt: 5		5
		R130E: 31	R130E: 10	R130E: 5	1	4
3	8A Sia	Wt: 31	Wt: 19	Wt: 5	2	3
		R130E: 40	R130E: 20	R130E: 4	1	3
4	8A Sia	Wt: 71	Wt: 19	Wt: 5	1	3 (1)
		R130E: 70	R130E: 23	R130E: 5	1	2 (2)

Gesamt **wt: 146** **wt: 51** **wt:20** **4** **15 (1)**
 R130E: 152 **R130E: 57** **R130E: 17** **4** **11 (2)**

Tabelle 8: **SLP-65/BLNK ist in Sia - CD22-wt J558L μ m3 Doppeltransfektanten geringer Tyrosin-phosphoryliert**

Die Sialinsäuretransferase exprimierenden Klone 6A Sia und 8A Sia wurden vier Mal mit CD22-wt bzw. CD22-R130E transfiziert. Insgesamt ergaben die Transfektionen 146 IgM^{hoch}CD22-wt^{med-hoch} und 152 IgM^{hoch}CD22-R130E^{med-hoch} exprimierende Klone. Von diesen waren 51 Klone CD22-wt und 57 R130E IgM^{hoch}CD22^{med-hoch}Sia^{med-hoch}. Aus den optimalen Klonen wurden 20 CD22-wt und 17 CD22-R130E Klone herausgesucht und in Stimulationsexperimenten die Wirkung von CD22 auf das Adaptermolekül überprüft. Insgesamt 15 der 20 CD22-wt transfizierten Klone zeigten eine niedrigere SLP-65/BLNK Tyrosin-Phosphorylierung nach NP₉-BSA

Stimulation. In einem Klon war SLP-65/BLNK gleich stark phosphoryliert wie in der Mutterzelllinie (in Klammern). Bei den CD22-R130E Transfektanten wurde nur in 4 der 17 getesteten Klone eine höhere Phosphorylierung des Adaptermoleküls gefunden.

Durch die Resultate der Sia - CD22-wt Doppeltransfektanten schien es, als sei die Sialinsäurebindung von CD22 auf der Zelloberfläche für die Inhibition der Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK notwendig. Entsprechend erwarteten wir, dass in den Sia - CD22-R130E Transfektanten CD22 keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von SLP-65/BLNK hat. Das Adaptermolekül sollte folglich so stark Tyrosin-phosphoryliert sein wie in untransfizierten bzw. Sialinsäuretransferase transfizierten J558L μ m3 Zellen. Dies konnte aber nur in 4 der 17 untersuchten Sia - CD22-R130E Klone gezeigt werden. In 11 der 17 CD22-R130E Doppeltransfektanten war die Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK nach NP₉-BSA Stimulation deutlich niedriger als in den Kontrollen (**Tabelle 8**).

Mit den Transfektionsexperimenten sollte das in primären B-Zellen erhaltenen Resultat bestätigt werden, dass das Adaptermolekül SLP-65/BLNK ein Substrat der an CD22 rekrutierten Tyrosin-Phosphatase SHP-1 ist. Während der Etablierung der Experimente mit den J558L μ m3 Zellen kam die Frage auf, ob neben der cytoplasmatischen Domäne auch die extrazelluläre Adhäsionsdomäne von CD22 einen Einfluss auf die inhibitorische Wirkung von CD22 auf das BZR-Signal hat. Diese Annahme wurde später mit einer anderen Zelllinie bestätigt (siehe Kapitel 4.2). In Stimulationsexperimenten der Sia - CD22-wt Doppeltransfektanten war SLP-65/BLNK in 75% der getesteten Klone niedriger Tyrosin-phosphoryliert als in untransfizierten J558L μ m3 Zellen. Wenn die extrazelluläre Domäne von CD22 Voraussetzung für die inhibitorische Wirkung von CD22 auf das BZR Signal ist, dann sollte in den CD22-R130E Doppeltransfektanten diese Inhibition aufgehoben sein. Die Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK sollte in den meisten der CD22-R130E Doppeltransfektanten der in untransfizierten J558L μ m3 Zellen bzw. Sialinsäuretransferase-Transfektanten entsprechen. Dies konnte nur in 24% der mit NP₉-BSA stimulierten Sia - CD22-R130E Doppeltransfektanten gezeigt werden.

4.1.3 Charakterisierung CD22 x SLP-65- doppel-defizienter Mäuse

Die Transfektionsexperimente mit der Plasmazytom-Zelllinie J558L μ m3 hatten die in Kapitel 4.1.1 beschriebene Beobachtung, dass SLP-65/BLNK ein Substrat der an CD22 aktivierten Phosphatase SHP-1 ist, nicht uneingeschränkt bestätigt. Daher sollte der mögliche Einfluss des CD22- und SLP-65/BLNK-Signalwegs auf das BZR-Signal im Mausmodell geklärt werden. SLP-65-knock-out Mäuse von Hassan Jumaa (MPI Freiburg) wurden mit den CD22-defizienten Mäusen in Würzburg gekreuzt.

4.1.3.1 Deutliches Ca²⁺-Signal in SLP-65xCD22-doppel-defizienten B-Zellen nach BZR-Stimulation

Mit den SLP-65xCD22-doppel-defizienten Mäusen sollte die Frage beantwortet werden, ob CD22 tatsächlich den BZR-Signalweg über SLP-65/BLNK beeinflusst. Nach BZR-Stimulation SLP-65xCD22-doppel-defizienter B-Zellen sollte anhand der Höhe und des Verlaufs des induzierten Ca²⁺-Signals die funktionelle Abhängigkeit von CD22 und SLP-65/BLNK geklärt werden. Wäre SLP-65/BLNK das direkte und ausschließliche Substrat von CD22 bzw. SHP-1, sollte der Phänotyp der SLP-65-defizienten B-Zellen dominant sein und kein Ca²⁺-Signal in doppel-defizienten B-Zellen induziert werden. Hat aber CD22 einen indirekten Einfluss auf SLP-65/BLNK, oder befinden sich beide in unabhängigen Signalwegen, sollte ein Ca²⁺-Signal messbar sein.

Splenozyten aus CD22-, SLP-65-, doppel-defizienten und Kontroll-Mäusen wurden mit Indo-1 Farbstoff beladen und anschließend gegen Thy1.2 (T-Zell-spezifisch) und Mac.1 (Makrophagen-spezifisch) angefärbt. Thy.1^{neg} und Mac.1^{neg} B-Zellen wurden sowohl mit monoklonalem anti-IgM Antikörper (B7-6), als auch mit polyklonalem anti- κ F(ab')₂ Fragment stimuliert. Wie bereits beschrieben, verläuft das Ca²⁺-Signal in CD22-defizienten B-Zellen im Vergleich zu Kontroll-B-Zellen erhöht und verlängert (**Abb.: 13**). Im Gegensatz dazu wurde in SLP-65-defizienten B-Zellen bei Stimulation mit monoklonalem Antikörper kein Signal und mit polyklonalem anti- κ Antikörper (nicht gezeigt) ein schwaches Ca²⁺-Signal gemessen. Der Ca²⁺-Strom in den SLP-65xCD22-doppel-defizienten B-Zellen war wieder hergestellt. Allerdings erreichte das Signal nicht die Stärke von Kontroll-B-Zellen.

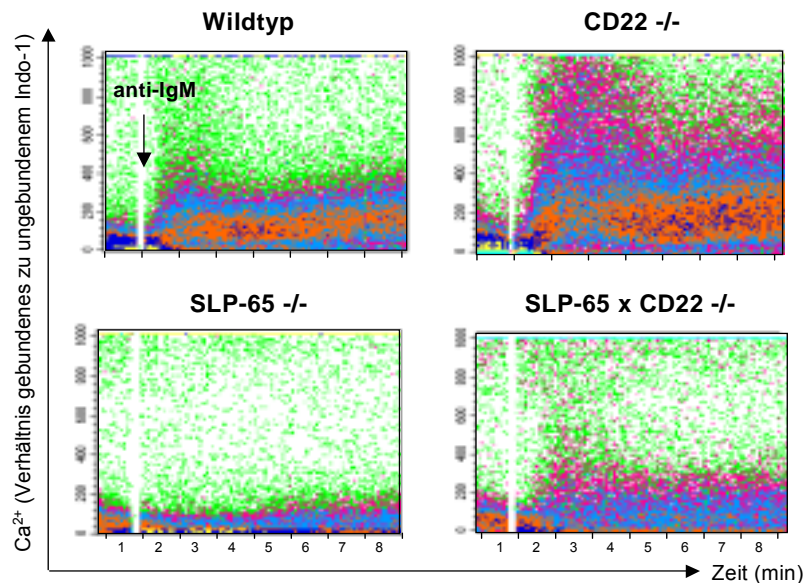


Abbildung 13: In SLP-65xCD22-doppel-defizienten B-Zellen deutliches Ca^{2+} -Signal nach BZR-Stimulation

Splenozyten aus den Milzen von SLP-65 $-/-$, CD22 $-/-$, SLP-65xCD22-doppel-defizienten und Kontroll-Mäusen (6 bis 8 Wochen alt) wurden mit dem Chelator Indo-1 beladen und gegen Mac.1 und Thy1.2 angefärbt. Mac.1 neg und Thy1.2 neg B-Zellen wurden entweder mit 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti- μ Antikörper (B7-6) oder mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ polyklonalem anti- κ F(ab') $_2$ Fragment stimuliert und der initiierte Ca^{2+} -Strom gemessen. Der Pfeil zeigt den Zeitpunkt der Antikörperzugabe. Das Ca^{2+} -Signal wurde durch das Verhältnis von gebundenem zu ungebundenem Indo-1 (F15/F14) innerhalb der abgebildeten Zelle in Abhängigkeit von der Zeit berechnet. Abgebildet wurde eines der zwei durchgeführten Experimente, deren Resultate identisch waren.

Dieses Resultat verdeutlichte, dass die an CD22 rekrutierte Phosphatase SHP-1 entweder nicht direkt SLP-65/BLNK dephosphoryliert, oder dass SHP-1 neben SLP-65/BLNK noch weitere Substrate im BZR-Signalweg beeinflusst.

4.1.3.2 Im Knochenmark von SLP-65xCD22-doppel-defizienten Mäusen bleibt der Entwicklungsblock im prä-BII-Zellstadium erhalten

Im Gegensatz zu SLP-65-defizienten wurde in SLP-65xCD22-doppel-defizienten B-Zellen nach BZR-Stimulation ein Ca^{2+} -Signal induziert. Wie relevant intrazelluläre Ca^{2+} -Ströme während der B-Zellentwicklung im Knochenmark sind, konnte noch nicht geklärt werden. Allerdings sind Signale vom prä-BZR überlebensnotwendig für die B-Zelle. FACS-Analysen vom Knochenmark SLP-65xCD22-doppel-defizienter Mäuse wurden durchgeführt, um eventuelle Entwicklungsvorteile der doppel-defizienten B-Vorläuferzellen zu finden.

Wie von Jumaa et al. (1999) beschrieben wurde, haben SLP-65-defizienten Mäuse eine unveränderte Gesamtzellzahl im Knochenmark und in der Peripherie, allerdings ist in dieser

die Gesamt-B-Zellzahl bis zu 40% verringert. FACS-Analysen des Knochenmarks ergaben, dass die meisten B-Vorläuferzellen in SLP-65-defizienten Mäusen im prä-BII-Zellstadium ($CD43^+BP-1^+IgM^+B220^+$) verharren. Nur ein Bruchteil der prä-BII-Zellen überwinden den Entwicklungsblock und reifen weiter zu unreifen B-Zelle ($CD43^-BP-1^-IgM^+B220^+IgD^-$). Entsprechend zeigten Jumaa et al. (1999) eine 5- bis 10-fache Reduktion reifer B-Zellen in der Milz von SLP-65-defizienten Mäusen. Rezirkulierende B-Zellen konnten im Knochenmark nur vereinzelt gefunden werden. Im Gegensatz dazu entwickelten sich die B-Zellen im Knochenmark von CD22-defizienten Mäusen normal (O'Keefe et al., 1996; Otipoby et al., 1996; Sato et al., 1996; Nitschke et al., 1997). In der Milz wiesen sie einen voraktivierten Zustand auf, was der Grund für die beschleunigte Reifung zu reifen B-Zellen ($IgM^{niedrig} IgD^{hoch}$) sein könnte. In CD22-defizienten Mäusen fehlten ebenfalls die rezirkulierenden B-Zellen im Knochenmark. Dies lag nicht an einem Reifedefizit, sondern an der Rolle von CD22 als Homing-Rezeptor für das Knochenmark (Nitschke et al., 1999).

Für FACS-Analysen wurden Mäuse aus den SLP-65xCD22-Verpaarungen mit den entsprechenden Genotypen getötet, und das Knochenmark entnommen. Der Reifungsblock

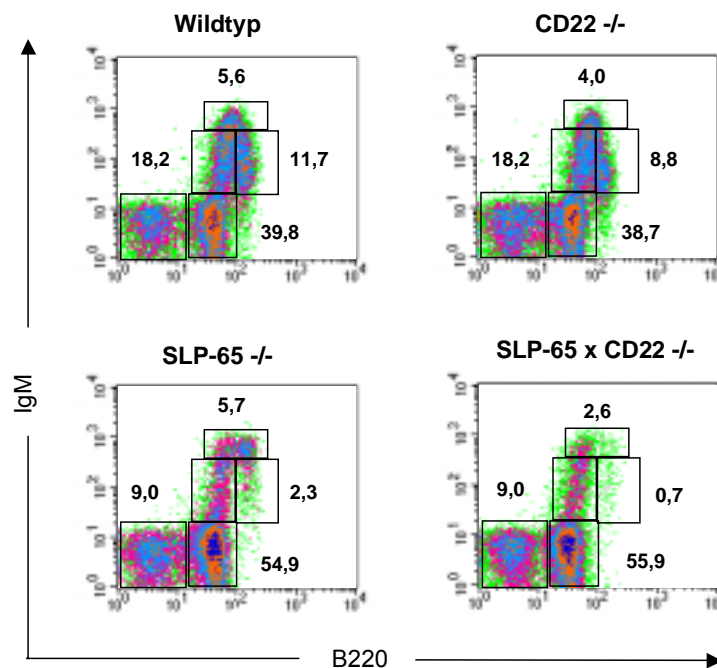


Abbildung 14: Im Knochenmark von SLP-65xCD22-doppel-defizienten Mäusen bleibt der Entwicklungsblock im prä-BII-Zellstadium erhalten

Das Knochenmark von 6-8 Wochen alten wildtypischen, SLP-65-, CD22- und doppel-defizienten Mäusen wurde aus den Oberschenkelknochen herausgespült und die Erythrozyten durch Gey's-Lyse deletiert. Etwa 5×10^5 Zellen pro Genotyp wurden mit anti-B220-FITC, anti-IgM-PE und anti-IgD (nicht gezeigt) Antikörpern angefärbt und im FACScalibur analysiert. Gezeigt sind die relativen Prozentzahlen für die jeweils „gegateten“ B-Zellpopulationen. Abgebildet wurde ein repräsentatives von drei durchgeführten Experimenten.

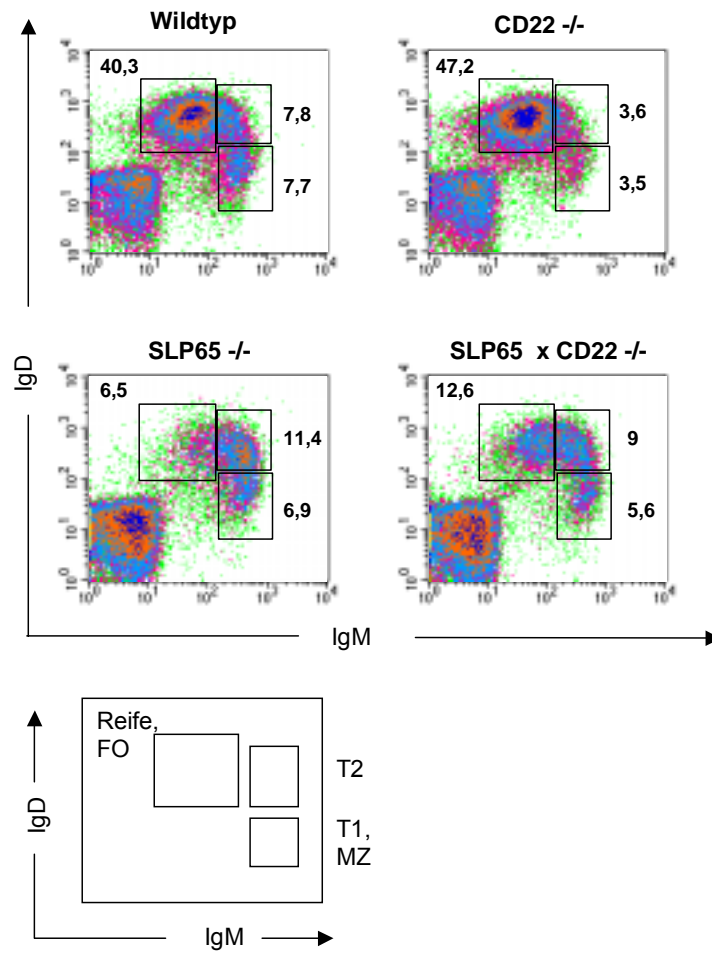
im prä-BII-Zellstadium ($CD43^+BP-1^+IgM^+B220^+$) der SLP-65-defizienten Mäuse konnte durch die zusätzliche Deletion von CD22 nicht behoben werden (**Abb.: 14**). Etwa 70-80% der B-Linienzellen ($B220^+$) im Knochenmark von SLP-65^{-/-} und SLP-65xCD22^{-/-} Mäusen verharren im prä-BII-Zellstadium (IgM^+B220^+). Die SLP-65^{-/-} oder SLP-65xCD22^{-/-} B-Vorläuferzellen, die diese erste Hürde überwunden hatten, reiften weiter bis zum transitionalen B-Zellstadium ($IgM^{hoch} B220^{niedrig-hoch}$, **Abb.: 14**).

4.1.3.3 Verdopplung der Anzahl reifer B-Zellen in der Milz von SLP-65xCD22-doppel-defizienten im Vergleich zu SLP-65-defizienten Mäusen

Um die Entwicklung der SLP-65xCD22-doppel-defizienten B-Zellen in der Peripherie zu untersuchen, wurden Splenozyten aus SLP-65-, CD22-, doppel-defizienten und Kontroll-Mäusen entnommen und mit anti-IgM, anti-IgD und anti-CD21 Antikörpern angefärbt. Mit Hilfe dieser Anfärbungen wurde es möglich, die B-Zellpopulationen in der Milz zu unterscheiden: transitionelle T1 ($T1: IgM^{hoch}IgD^{niedrig}CD21^{niedrig}$) und T2 ($T2: IgM^{hoch}IgD^{hoch}CD21^{hoch}$), Marginalzonen B-Zellen (MZ: $IgM^{hoch}IgD^{niedrig}CD21^{hoch}$) und reife, folliculäre B-Zellen (FO: $IgM^{niedrig}IgD^{hoch}CD21^{niedrig-med}$).

Wie bereits beschrieben, durchlaufen B-Zellen in der Peripherie von CD22-defizienten Mäusen ihre Reifung schneller (O'Keefe et al., 1996; Otipoby et al., 1996; Sato et al., 1996; Nitschke et al., 1997). Daher konnte in den Milzen von CD22-defizienten Mäusen eine erhöhte Anzahl reifer B-Zellen ($IgM^{niedrig}IgD^{hoch}CD21^{niedrig-med}$) nachgewiesen werden. Weiterhin wurde von Samardzic et al. (2002) gezeigt, dass in CD22^{-/-} Milzen die MZ B-Zellen fehlen. Dies wird deutlich, vergleicht man die relativen Prozentzahlen der transitionellen T1 und MZ B-Zellen (beide $IgM^{hoch}IgD^{niedrig}$, **Abb.: 15 (A)**), mit den transitionellen T2 und MZ B-Zellen (beide $IgM^{hoch}CD21^{hoch}$, **Abb.: 15 (B)**). Im Fall der SLP-65-defizienten Mäuse wurde durch die FACS-Anfärbungen deutlich, dass es sich bei der Anhäufung von $IgM^{hoch}IgD^{hoch}CD21^{hoch}$ B-Zellen um T2 B-Zellen handelt (**Abb.: 15 (A)** und **15 (B)**). Die T2 B-Zellen in den Milzen von SLP-65-defizienten Mäusen waren um 30-50% erhöht. Dieser deutliche Reifungsblock war in den Milzen der SLP-65xCD22-doppel-defizienten Mäuse nicht mehr feststellbar. Dagegen verdoppelte sich die relative Anzahl reifer B-Zellen in SLP-65xCD22-doppel-defizienter Mäuse. Das Verhältnis von T2 zu reifen B-Zellen in den Milzen SLP-65-defizienten Mäuse lag bei etwa 2 : 1 und steigerte sich in den SLP-65xCD22-doppel-defizienter Mäuse zu 1 : 1,5 T2 zu reifen B-Zellen (**Abb.: 15 (A)** und **15 (B)**).

A



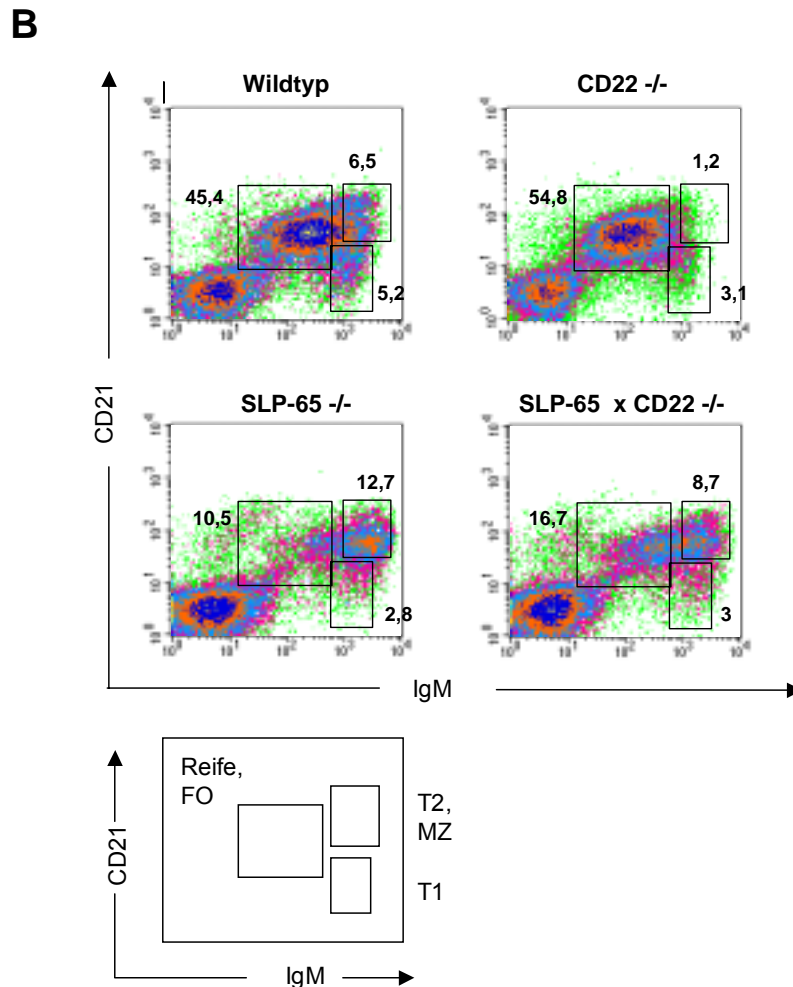


Abbildung 15: **Der zusätzliche Verlust von CD22 bewirkt eine verbesserte Reifung von SLP-65-defizienten B-Zellen in der Milz**

Die Milzen aus wildtypischen-, CD22-, SLP-65- und doppel-defizienten Mäusen wurde herausgenommen und nach der Gey's-Lyse mit (A) anti-IgM-PE gegen anti-IgD-bio oder (B) anti-CD21-FITC gegen anti-IgM-bio angefärbt. Die Analyse wurde am FACScalibur für lebende Lymphozyten durchgeführt. Angegeben ist die relative Prozentzahl der jeweiligen B-Zellpopulation für das abgebildete Experiment (ein repräsentatives von vier durchgeführten Experimenten).

Auch wurde die Bauchhöhle der wildtypischen, CD22-, SLP-65- und doppel-defizienten Mäuse gespült, um die B1 Zellen zu untersuchen. Jumaa et al. (1999) konnte keine CD5⁺ IgM⁺ B1 Zellen im Peritoneum von SLP-65 Mäusen nachweisen. In CD22-defizienten Mäusen wurde kein Unterschied zu der Anzahl an B1 Zellen in wildtypischen Mäusen gefunden (Nitschke et al., 1997). Im Peritoneum von SLP-65xCD22-doppel-defizienten Mäusen konnten keine CD5⁺ IgM⁺ B1 Zellen in FACS-Anfärbungen detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Die FACS-Analysen der SLP-65xCD22-doppel-defizienten Mäuse ergaben, dass sowohl in der Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark, als auch im Verlust der B1 Zellen der Phänotyp der SLP-65-defizienten Mäuse dominiert. Allerdings führte die zusätzliche Deletion von CD22 während der B-Zellreifung zu einer direkten Weiterentwicklung ins reife B-Zellstadium.

4.1.3.4 Keine Verbesserung der Immunkompetenz von SLP-65xCD22-doppel-defizienten Mäusen

Die Immunglobulinkonzentrationen im Blut nicht immunisierter Mäuse geben Auskunft über die Immunkompetenz der Tiere. Antikörper werden von B1, MZ oder reifen B-Zellen nach Antigen-Stimulation sekretiert. Die Deletion von lymphoid-spezifischen Genen in knock-out-Mäusen kann zu Änderungen in der B-Zellfunktion und/oder der Verteilung von B-Zellpopulationen führen, was häufig Abweichungen der Antikörperkonzentrationen im Blut verursacht. Unzureichende Immunantworten oder Autoimmunkrankheiten sind die Folge.

Von Nitschke et al. (1997) wurde in CD22-defizienten Mäusen kein Unterschied in den basalen Immunglobulinleveln gefunden. Dagegen wurde von Jumaa et al. (1999) gezeigt, dass in SLP-65^{-/-} Mäusen die IgM und IgG₃ Antikörpertiter sehr stark reduziert sind. Um herauszufinden, ob die verbesserte B-Zellreifung in der Peripherie von SLP-65xCD22-doppel-defizienten Mäusen einen Einfluss auf die Antikörperproduktion hat, wurden die basalen Antikörperkonzentrationen im Blut mit Hilfe von ELISA bestimmt. Wie in **Abb.: 16 (A)** ersichtlich, stieg die IgM-Konzentration im Blut doppel-defizienter Mäuse um etwa das zweifache an, aber eine signifikante Verbesserung der IgM und IgG₃ Antikörperkonzentrationen konnte nicht festgestellt werden.

Des Weiteren wurde die Thymus-unabhängige Immunantwort (TI-Typ2) der SLP-65xCD22-doppel-defizienten Mäuse genauer analysiert. Hierfür wurde Mäusen des jeweiligen Genotyps an Tag null TNP-Ficoll intraperitoneal (i.p.) gespritzt. Vor der Antigeninjektion (d0), fünf Tage (d5) nach und sieben Tage (d7) nach der Injektion wurde den Mäusen Blut abgenommen. Die Seren wurden auf den Gehalt an anti-TNP-spezifischem IgM und IgG₃ getestet. Die Immunisierung der Kontroll-Mäuse induzierte eine deutliche IgM und IgG₃ Antwort, wohingegen in CD22-defizienten Mäusen die TNP-spezifischen Antikörperkonzentrationen um etwa die Hälfte geringer waren (**Abb.: 16 (B)**). Wie von Jumaa et al. (1998) bereits gezeigt, entwickeln SLP-65-defiziente Mäuse keine T-Zell-unabhängige Immunantwort. In SLP-65xCD22-doppel-defizienten Mäusen war die Konzentration an TNP-spezifischen IgM und IgG₃ Antikörpern nicht messbar (n.m.).

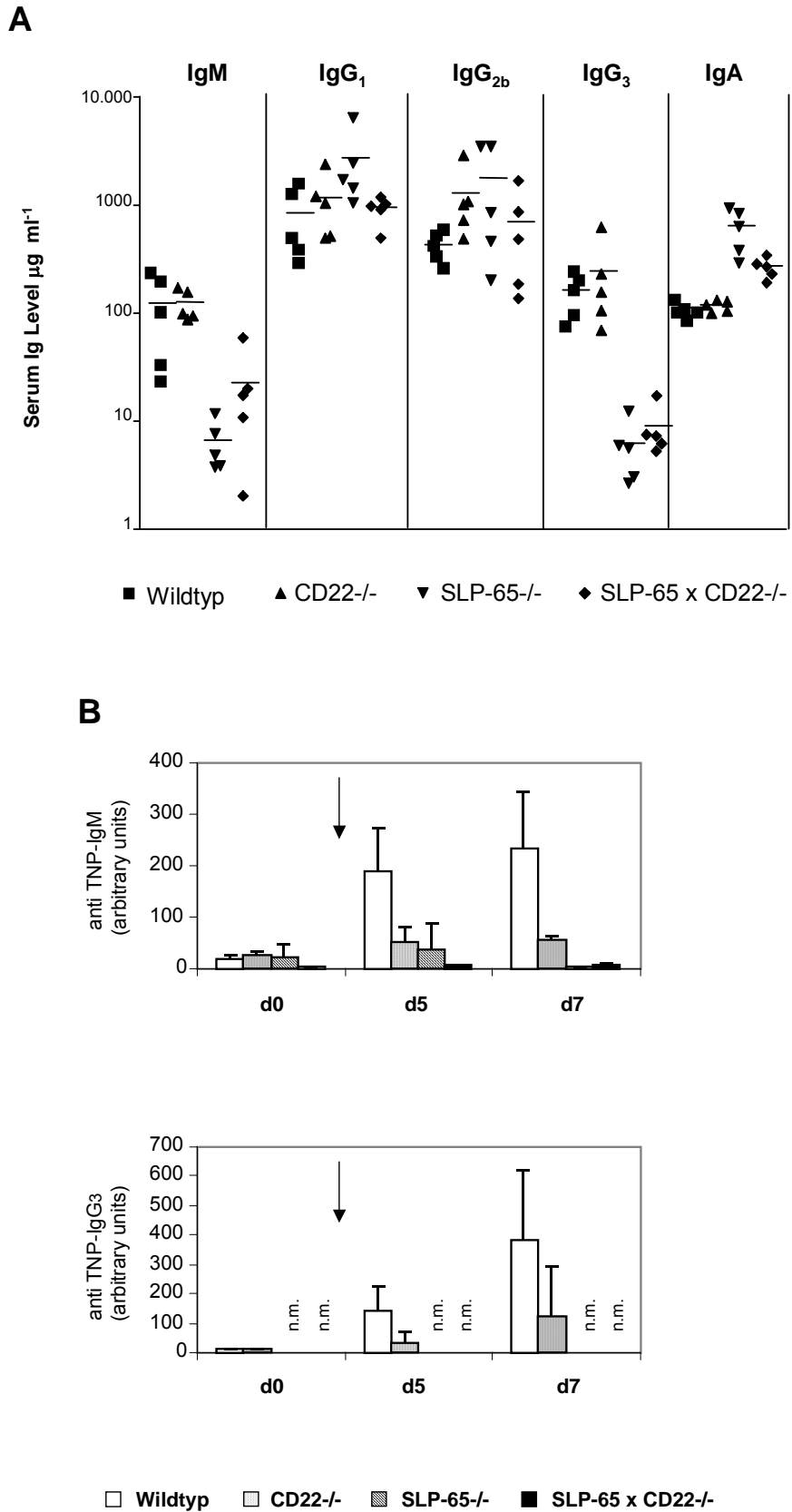


Abbildung 16: **Keine Immunantworten in SLP-65^{-/-} und SLP-65xCD22-doppel-defizienten Mäusen**

(A) Seren von 8-12 Wochen alten wildtypischen, CD22^{-/-}, SLP-65^{-/-} und doppel-defizienten Mäusen wurden auf ihre Konzentration an IgM, IgG₁, IgG_{2b}, IgG₃ und IgA im ELISA untersucht. Angegeben wurden die μg isotyp-

spezifischen Antikörpers pro ml Serum. Jedes abgebildete Symbol entspricht einem gebluteten Tier (5 Mäuse pro Isotyp in einer Genotypgruppe). Der Mittelwert des jeweiligen Isotypes wurde durch den Querbalken dargestellt.

(B) Drei bis vier Mäuse des jeweiligen Genotyps wurden i.p. mit 10 μ g/ml TNP-Ficoll an Tag d0 immunisiert, was in der Abbildung durch den Pfeil gekennzeichnet wurde. Geblutet wurden die Mäuse vor der Immunisierung (d0), an Tag d5 und d7. Die Immunantwort wurde über die im Serum enthaltenen TNP-spezifischen IgM und IgG₃ Antikörper mit Hilfe des ELISA bestimmt. Die durchschnittliche Antikörperkonzentration mit Standardabweichung einer Genotypgruppe zu dem bestimmten Zeitpunkt wurde errechnet und graphisch dargestellt. Die IgG₃ Serumkonzentration und die IgG₃ Immunantwort SLP-65-defizienter und SLP-65xCD22-doppel-defizienter Mäuse war so niedrig, dass kein linearer Konzentrationsbereich berechnet werden konnte (n.m. für nicht messbar). Als Standard wurden verschiedene Seren zusammenpipettiert und entsprechend der TNP-spezifischen Antikörper verdünnt und detektiert.

Der Grund für die schwache T-Zell-unabhängige Immunantwort der SLP-65- und SLP-65xCD22-doppel-defizienten Mäusen ist wahrscheinlich das Fehlen der B1 Zellen im Peritoneum.

4.1.3.5 Minimale proliferative Antwort von SLP-65xCD22-doppel-defizienten B-Zellen nach BZR-Stimulation

Die Ca²⁺-Messungen hatten ergeben, dass in SLP-65xCD22-doppel-defizienten B-Zellen ein deutliches Ca²⁺-Signal nach BZR-Stimulation induziert wird. Dieses war nicht so hoch wie in Kontroll-B-Zellen, könnte aber ein Hinweis dafür sein, dass in doppel-defizienten B-Zellen das BZR-Signal ausreicht, um Proliferation zu initiieren. In Stimulationsexperimenten wurde die Proliferation von SLP-65xCD22-doppel-defizienten B-Zellen getestet.

B-Zellen aus den Milzen von Kontroll-, CD22-, SLP-65- und doppel-defizienten Mäusen wurden aufgereinigt, und sowohl mit polyklonalem anti- μ F(ab')₂ Fragment, als auch mit monoklonalem anti- μ Antikörper (B7-6) für 24, 48 und 72 Stunden stimuliert. Weder die SLP-65-, noch die SLP-65xCD22-doppel-defizienten B-Zellen proliferierten nach BZR-Kreuzvernetzung (**Abb.: 17**). Auch die Zugabe von IL-4 in den Stimulationsansatz verstärkte die Proliferation nicht. Allerdings bewirkte die Stimulation mit anti-CD40 Antikörper und IL-4, die T-Zell Hilfe repräsentieren, die Proliferation von SLP-65- und doppel-defizienten B-Zellen. CD22^{-/-} B-Zellen teilten sich nach anti-IgM Behandlung deutlich langsamer als Kontroll-B-Zellen. Nach Zugabe von anti-CD40 und IL-4 proliferierten die CD22-defizienten B-Zellen fast doppelt so schnell wie wildtypische B-Zellen.

Von Nitschke et al. (1997) war kein signifikanter Unterschied im ³H-Thymidin Einbau zwischen CD22^{-/-} und Kontroll-B-Zellen nach anti-IgM, anti-CD40 oder IL-4 Stimulation beschrieben worden. Im Gegensatz dazu zeigten die Proliferationsexperimente von Sato et

al. (1996), dass CD22^{-/-} B-Zellen nach Stimulation mit anti-IgM und IL-4 signifikant geringer proliferierten. CD40 und CD40 plus IL-4 Behandlung dagegen führte zu einer deutlich stärkeren Proliferation der CD22-defizienten im Vergleich zu Kontroll-B-Zellen. Die Resultate von Sato et al. entsprechen den Proliferationsdaten, die wir mit den B-Zellen aus SLP-65xCD22-Verpaarungen erhalten haben. Um die B-Zellen der verschiedenen Genotypen vergleichen zu können, wurden für die Experimente Mäuse aus den SLP-65xCD22-Verpaarungen benutzt (Genotyp: SLP-65^{+/-}CD22^{+/-}; SLP-65^{-/-}CD22^{+/-}, SLP-65^{+/-}CD22^{-/-}, SLP-65^{-/-}CD22^{-/-}). Dies und die Kreuzung der Mausstämmen C57BL/6J (CD22-k.o.) und BALB/C (SLP-65-k.o.) könnten die Gründe für die zwei- bis dreifach niedrigere Proliferation der

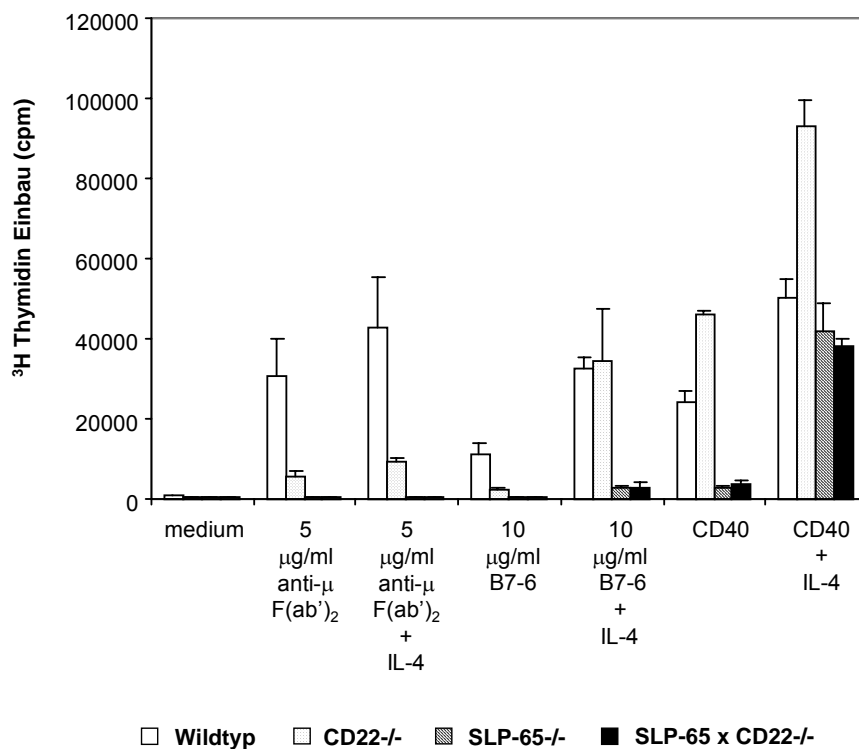


Abbildung 17: **Keine Verbesserung der Proliferation von SLP-65xCD22-doppel-defizienten B-Zellen nach BZR-Stimulation**

Splenozyten aus Kontroll (CD22^{+/-}SLP-65^{+/-}), CD22 (CD22^{-/-}SLP-65^{+/-}), SLP-65 (CD22^{+/-}SLP-65^{-/-})- und doppel-defizienten Mäusen wurden isoliert und aufgereinigt. In Triplets wurden 2x10⁵ Zellen/Napf pro Genotyp ausplattiert und entweder mit polyklonalem anti-µ F(ab')₂ Fragment, oder mit monoklonalem anti-µ Antikörper (B7-6) stimuliert. Wie angegeben wurde IL-4 zu manchen Ansätzen dazugegeben. Auch wurde die Proliferation nach Stimulation mit CD40 alleine und CD40 und IL-4 durchgeführt. Die Zellen wurden für 24, 48 und 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Etwa 8 Stunden vor Stimulationsende wurde jedem Napf 1µCi ³H-markiertes Thymidin zupipettiert. Mit Hilfe des Harvesters (Bio-Rad) wurde die ³H-Thymidin markierte DNS aus den Zellen auf Filtermatten aufgefangen und im β-Counter die Radioaktivität gemessen. Abgebildet wurden die Mittelwerte der gemessenen Triplets mit entsprechender Standardabweichung für den 48 Stunden Stimulationsansatz. Dieser Proliferationstest wurde zwei Mal durchgeführt und vergleichbare Ergebnisse wurden erhalten.

CD22-defizienten B-Zellen nach BZR-Stimulation sein. Ob im Fall der CD40 Stimulation der Hintergrund einen solchen Einfluss auf die Teilungsrate hat, oder ob es an dem Stimulans liegt, konnte nicht eindeutig geklärt werden.

Obwohl in SLP-65xCD22-doppel-defizienten B-Zellen ein deutliches Ca^{2+} -Signal gemessen werden konnte, proliferierten die doppel-defizienten B-Zellen nicht bei BZR-Stimulation.

4.1.3.6 Die zusätzliche Deletion von CD22 in SLP-65^{-/-} B-Zellen führt nach LPS-Stimulation zu einer Teilungsrate vergleichbar mit Kontroll-B-Zellen

B-Zellen werden neben der hochspezifischen Antigen-Erkennung über den BZR auch über die Toll-ähnlichen Rezeptoren (Toll-like receptor; TLR) zur Proliferation angeregt. Im Gegensatz zum BZR erkennen die TLR bestimmte Proteinmuster (Protein Recognition Pattern, PRR), die oft in der Natur vorkommen. So bindet z.B. der TLR-4 die LPS-Struktur (Lipopolysaccharid), die natürlicherweise in der Zellwand von gram-negativen Bakterien vorkommt. Diese relativ einfachen Erkennungsstrukturen ermöglichen es der B-Zelle, ähnlich den Zellen des angeborenen Immunsystems, ein breites Spektrum an Erregern abzudecken. In wie weit die Signalkaskaden des BZR mit den Signalkaskaden der TLR interagieren, wurde noch nicht geklärt.

CD22-defiziente B-Zellen teilen sich nach Stimulation mit dem Mitogen LPS mindestens doppelt so schnell wie Kontroll-B-Zellen (Nitschke et al. 1997). Im Gegensatz dazu proliferieren SLP-65^{-/-} B-Zellen nach LPS Gabe nur etwa halb so stark wie Kontroll-B-Zellen (Jumaa et al. 1999). In Proliferationstests konnte gezeigt werden, dass sich SLP-65xCD22-doppel-defizienten B-Zellen nach LPS-Gabe vergleichbar stark teilen wie Kontroll-B-Zellen. In **Abb.: 18** wurde der ³H-Tymidine Einbau von CD22^{-/-}, SLP-65^{-/-}, SLP-65xCD22^{-/-} und Kontroll-B-Zellen nach 24 Stunden LPS-Stimulation gezeigt. Die doppel-defizienten B-Zellen erreichten eine Prolifationsrate, die mindestens der von wildtypischen B-Zellen entspricht.

Anhand der proliferativen Antwort von SLP-65xCD22-doppel-defizienten B-Zellen nach LPS-Stimulation wird deutlich, dass die Signalwege in CD22- und SLP-65-defizienten B-Zellen unabhängig voneinander verlaufen.

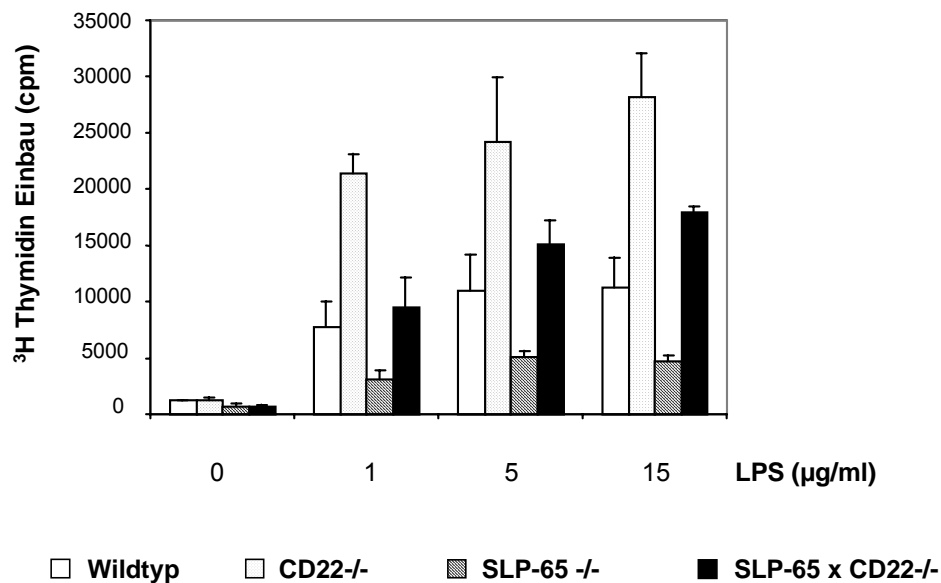


Abbildung 18: **Proliferation von SLP-65xCD22-doppel-defizienten B-Zellen nach LPS-Stimulation**

Nach der T-Zell-vermittelten Lyse wurden 2×10^5 B-Zellen pro Napf von CD22^{-/-}, BOB.1/OBF.1^{-/-}, doppel-defizienten und Kontroll-Mäusen auf 96-iger Napfplatten in Triplets verteilt und mit der angegebenen Konzentration an LPS für 24 Stunden stimuliert. Für die letzten 8 Stunden vor Ablauf der Stimulationszeit wurde jedem Napf $1 \mu\text{Ci}$ ^3H -markiertes Thymidin zupipettiert. Im β -Counter wurde der Einbau an ^3H -Thymidin gemessen. Abgebildet wurde der Mittelwert der gemessenen Triplets mit entsprechender Standardabweichung. Ein typisches von drei durchgeführten Experimenten ist gezeigt.

Mit Hilfe der SLP-65xCD22-doppel-defizienten B-Zellen sollte der Einfluss von CD22 auf das Adaptermolekül SLP-65/BLNK bestätigt werden. In den doppel-defizienten B-Zellen konnte nach BZR-Stimulation ein deutliches Ca^{2+} -Signal gemessen werden. Dieses Resultat deutete darauf hin, dass SLP-65/BLNK nicht das entscheidende Substrat im CD22/SHP-1 Signalweg ist. Des weiteren bleibt der Entwicklungsblock im prä-BII-Zellstadium im Knochenmark der SLP-65xCD22-doppel-defizienten Mäuse erhalten. In der Milz der SLP-65xCD22^{-/-} Mäuse verdoppelt sich die relative Anzahl an reifen B-Zellen im Vergleich zu SLP-65-defizienten Mäusen. Trotz dieser gestiegenen Anzahl an reifen B-Zellen in der Peripherie verbessert sich die Immunkompetenz der doppel-defizienten Mäuse nicht. Auch ist der Phänotyp der SLP65-defizienten B-Zellen in Bezug auf die Proliferation nach BZR-Stimulation dominant. SLP-65xCD22-doppel-defiziente B-Zellen proliferieren nicht nach anti-IgM, CD40 und IL-4 Stimulation. Allerdings proliferieren die B-Zellen aus den doppel-defizienten Mäusen nach LPS-Stimulation etwa so stark wie Kontroll-B-Zellen. Zusammenfassend dominiert in den SLPxCD22-doppel-defizienten Mäusen in der Regel der Phänotyp der SLP-65 knock-out Maus.

4.2 Die Adhäsionsdomäne von CD22

CD22 gehört in die Familie der Sialinsäure-abhängigen Adhäsionsmoleküle (Kelm et al., 1994), die Siglecs (**S**ialic-acid binding **I**g-like **l**ectins) genannt werden (Crocker et al., 1998). Für die N-terminale Liganden-Bindungsdomäne (V-set Domäne) von CD22 wurde eine Spezifität für alpha2,6-gebundene Sialinsäure beschrieben. CD22 interagiert sowohl mit alpha2,6 Sialinsäure-tragenden Liganden auf derselben Zelloberfläche (cis-Bindung), als auch mit Sialinsäure-tragenden Oberflächenmolekülen auf benachbarten Zellen (trans-Bindung). Razi und Varki (1998) zeigten mit Hilfe einer synthetischen alpha2,6 Sialyllaktose-tragenden PAA-bio Probe, dass auf unstimulierten, humanen B-Zellen CD22 an alpha2,6 Sialinsäure derselben Zelle gebunden vorliegt, was CD22-Maskierung genannt wurde. Nach Stimulation der B-Zellen mit IL-4 und CD40 konnte die Adhäsionsdomäne von CD22 mit der synthetischen Probe angefärbt werden (Razi und Varki; 1998). Dies deutet darauf hin, dass die cis-Maskierung von CD22 entsprechend dem Aktivierungszustand der Zelle reguliert wird.

Wir stellten die Frage, ob die Liganden-Bindungsdomäne von CD22 einen Einfluss auf die inhibitorische Wirkung von CD22 auf das BZR-Signal hat. Um diese Frage beantworten zu können, hatten Sørge Kelm (Universität Bremen) und Reinhard Brossmer (Universität Heidelberg) synthetische Sialinsäure-Derivate (Sialoside) entwickelt, synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Mit diesen wurde es möglich, die Interaktion zwischen CD22 und dessen alpha2,6 Sialinsäure-tragenden Liganden zu stören und die dadurch bewirkte Veränderung in der BZR-Signalstärke nach Stimulation zu beobachten.

4.2.1 Die Notwendigkeit der Liganden-Bindungsdomäne von CD22 für die inhibitorische Wirkung auf das BZR-Signal

4.2.1.1 Die Bindungseigenschaften der Sialoside

Voraussetzung für die Entwicklung der synthetischen Sialinsäure-Derivate war die Co-Kristallstruktur von Sialoadhesin (Siglec-1) mit gebundener alpha2,3 Sialinsäurelaktose (May et al., 1998). Durch Modelling konnte die wahrscheinliche Protein-Struktur von CD22 vorausgesagt, die beiden Siglecs verglichen, und die Bindungseigenschaften der Adhäsionsdomäne von CD22 beurteilt werden. Genutzt wurden die Protein-Strukturen, um synthetische Liganden für CD22 zu entwickeln. Als Grundgerüst diente der natürliche Ligand Sialinsäure, auch Neuraminsäure (Neu5Ac) genannt. Da die Affinität von Siglecs zu ihren Zuckerliganden niedrig ist (Sialoadhesin und CD22 rund 10^{-3} M, Bakker et al., 2002),

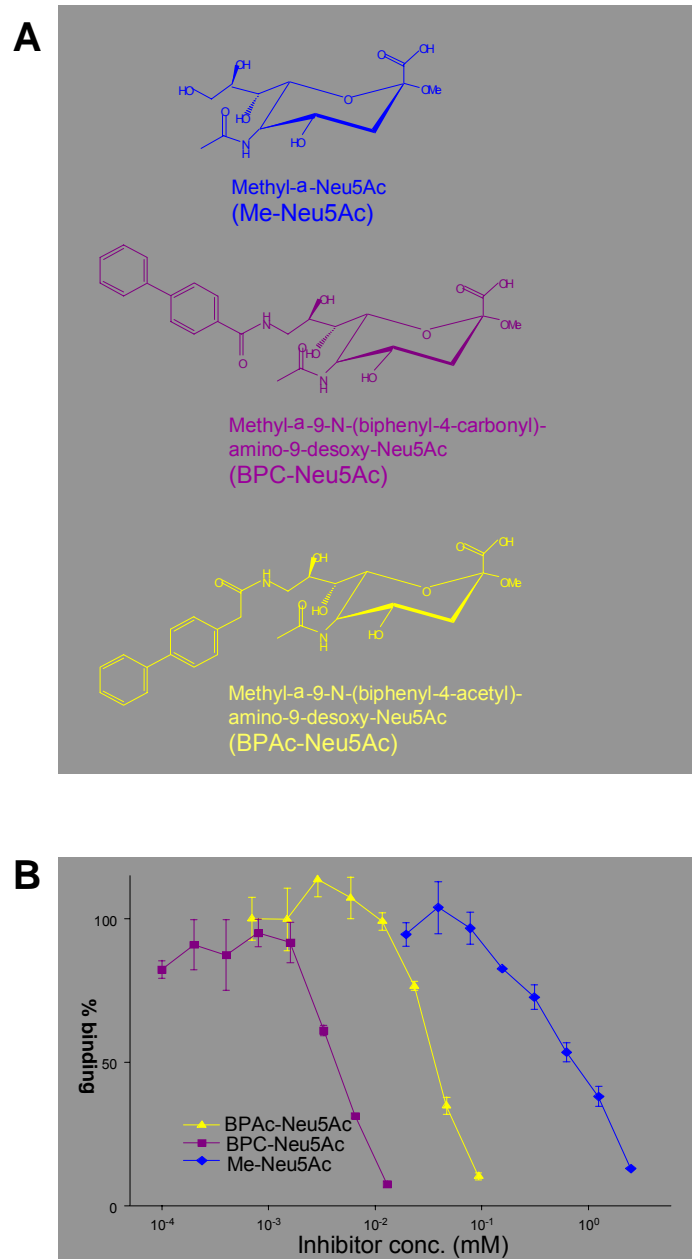


Abbildung 19: **Die Bindung von CD22-Fc Molekülen an alpha2,6 Sialinsäure-tragende Zielzellen wird durch synthetische Sialoside inhibiert**

(A) Die Struktur von Sialin- bzw. Neuraminsäure und deren Derivate nach Substitution des C9. Angegeben wurden auch die im Text verwendeten Abkürzungen.

(B) Der Hapten-Bindungstest wurde mit Fc-Chimeren von humanem und murinem CD22 und murinem Sialoadhesin (hCD22_{d1-3}-Fc, mCD22_{d1-3}-Fc, mSn_{d1-3}-Fc) durchgeführt. Die jodierten Fc-Chimere wurden mit fixierten murinen AG8 Zellen oder humanen Erythrozyten nach oder ohne Vorbehandlung mit dem jeweiligen Sialosid inkubiert. Das relative inhibitorische Potential (rIP) des getesteten Sialosids wurde anhand der gebundenen Menge an Radioaktivität errechnet. Das genaue Protokoll ist bei Stamenkovic et al., 1991 und Kelm et al., 1994 nachzulesen. Abbildung von Sørge Kelm zur Verfügung gestellt.

sollte die Affinität der synthetischen Sialoside zu der V-set Domäne erhöht werden. Die Proteinstruktur von Sialoadhesin mit gebundener alpha2,3 Sialyllaktose hatte gezeigt, dass die Glycerin-Gruppe am C9 der Sialinsäure in Richtung eines hydrophoben Bereiches innerhalb der Bindungstasche reicht. Aus diesem Grund wurden aromatische Gruppen an das C9 der Sialinsäure substituiert, die in diese hydrophobe Tasche ragen sollten (**Abb.: 19 (A)**).

Etwa fünfzig verschiedene Derivate wurden von S. Kelm und R. Brossmer synthetisiert und in einem Hapten-Bindungstest auf deren relatives inhibitorisches Potential (rIP) für verschiedenen Siglecs untersucht (**Abb.: 19 (B)**). Im Bindungstest von BPC-Neu5Ac (biphenyl-carbonyl-Neu5Ac) im Vergleich zu Me-Neu5Ac (methyl-Neu5Ac) an humanes CD22 (hCD22) bewies BPC-Neu5Ac ein 200-fach höheres relatives inhibitorisches Potential als Me-Neu5Ac (**Abb.: 19 (B)**). Das relative inhibitorische Potential von BPC-Neu5Ac sank drastisch, wenn die Carbonyl- durch eine Acetyl-Gruppe ersetzt wurde. Zwar waren die chemischen Verbindungen von BPC-Neu5Ac und BPAC-Neu5Ac (biphenyl-acetyl-Neu5Ac) fast identisch, allerdings hatte sich die Orientierung des Biphenylrings von BPAC-Neu5Ac geändert, was zu einer Verringerung des relativen inhibitorischen Potentials auf rund 30 führte (**Tabelle 9**). Die Spezifität von BPC-Neu5Ac für humanes CD22 wird deutlich, wenn man das rIP von BPC-Neu5Ac zwischen humanem oder murinem CD22, oder murinem Sialoadhesin vergleicht. BPC-Neu5Ac bindet spezifisch an humanes CD22 (**Tabelle 9**).

Inhibitor	hCD22		mCD22		mSn	
	IC ₅₀ (nM)	rIP	IC ₅₀ (nM)	rIP	IC ₅₀ (nM)	rIP
Me-Neu5Ac	1388	1	4689	1	884	1
BPC-Neu5Ac	4	224	1220	5	52	13
BPAC-Neu5Ac	35	29	123	48	3000	0.3

Tabelle 9 : Vergleich des relativen inhibitorischen Potentials (rIP) der synthetischen Sialoside

Das inhibitorische Potential wurde anhand der im Bindungs-Test erhaltenen Daten für humanes und murines CD22 und für Sialoadhesin von Sørge Kelm errechnet. Die Werte wurden mit drei aus sechs unabhängigen Experimenten bestimmt. IC₅₀ : Konzentration in μM für 50%-ige Inhibition der Bindung

4.2.1.2 Spezifitätstest der Sialoside für zelluläres CD22

Gewöhnlich liegt CD22 auf der Zelloberfläche maskiert vor, was eine cis-Interaktion von CD22 mit alpha2,6 Sialinsäure-tragenden Liganden auf derselben Zelle bedeutet. Durch die Behandlung der Zellen mit Sialidase bzw. Neuraminidase, isoliert aus *A. ureafaciens*, kann die Sialinsäure von der Zelloberfläche entfernt werden. Daraufhin ist es möglich, die freie Liganden-Bindungsdomäne von CD22 mit dem spezifischen Liganden NeuGc α 2,6Gal β 1,4GlcNAc (Abk.: NeuGc-2,6), der an biotinyliertes Polyacrylamid (PAA) gekoppelt wurde, anzufärben und im FACScalibur zu analysieren (Collins et al., 2002).

Um die Spezifität der Sialoside auch für zelluläres CD22 zeigen zu können, wurde mit humanen Daudi Zellen und primären Maus B-Zellen ein kompetitiver Bindungstest durchgeführt. Bei diesem wurde nach Sialidase-Behandlung die Liganden-Bindungsdomäne von CD22 entweder direkt mit der NeuGc-2,6-PAA-bio Probe angefärbt, oder die Zellen zunächst in dem jeweiligen Sialosid inkubiert und dann mit der PAA-Probe angefärbt. Wie in **Abb.: 20** ersichtlich, konnten mit Sialidase behandelte humane Daudi Zellen und primäre Maus B-Zellen mit der NeuGc-2,6-PAA-bio Probe angefärbt werden (rote Graphen). Nach Inkubation der sialinsäure-freien Daudi Zellen in 1mM BPC-Neu5Ac (grüner Graph) wurden nur vereinzelt NeuGc-2,6-PAA-positive Zellen detektiert. Durch serielles Verdünnen des Sialosids BPC-Neu5Ac stieg die Anzahl der Zellen an, die mit der PAA-Probe anfärbbar waren (gelbe und blaue Kurven). Mit diesem Inhibitionstests wurde gezeigt, dass die Affinität des Sialosids BPC-Neu5Ac für zelluläres, humanes CD22 höher ist als die Affinität des natürlichen Liganden in Form der NeuGc-2,6-PAA Probe.

Das geringe relative inhibitorische Potential von BPAC-Neu5Ac für humanes CD22, das anhand des CD22-Fc Bindungstest errechnet wurde, konnte in diesem Inhibitionstest bestätigt werden. Ausschließlich bei den höchsten Konzentrationen von BPAC-Neu5Ac war eine geringe Inhibition der PAA-Proben-Bindung messbar. Die NeuGc-2,6-PAA-bio Probe verdrängte Me-Neu5Ac vollständig aus der Liganden-Bindungsdomäne von CD22, da vermutlich die Avidität der oligomeren NeuGc-2,6-PAA-bio Probe höher ist.

Im Fall der primären B-Zellen aus der Maus inhibierte BPAC-Neu5Ac in hohen Konzentrationen entsprechend dem höheren relativen inhibitorischen Potential (vergleiche Tab.: 9) die PAA-Proben-Bindung. Die entscheidende Kontrolle für die Spezifität der NeuGc-2,6-PAA-bio Probe war die Anfärbung CD22-defizienten B-Zellen mit der Probe. Da keine Bindung an CD22-defizienten B-Zellen nachgewiesen werden konnte, handelt es sich bei

NeuGc-2,6-PAA-bio Probe um einen hochspezifische Liganden von CD22 (Collins et al., 2002).

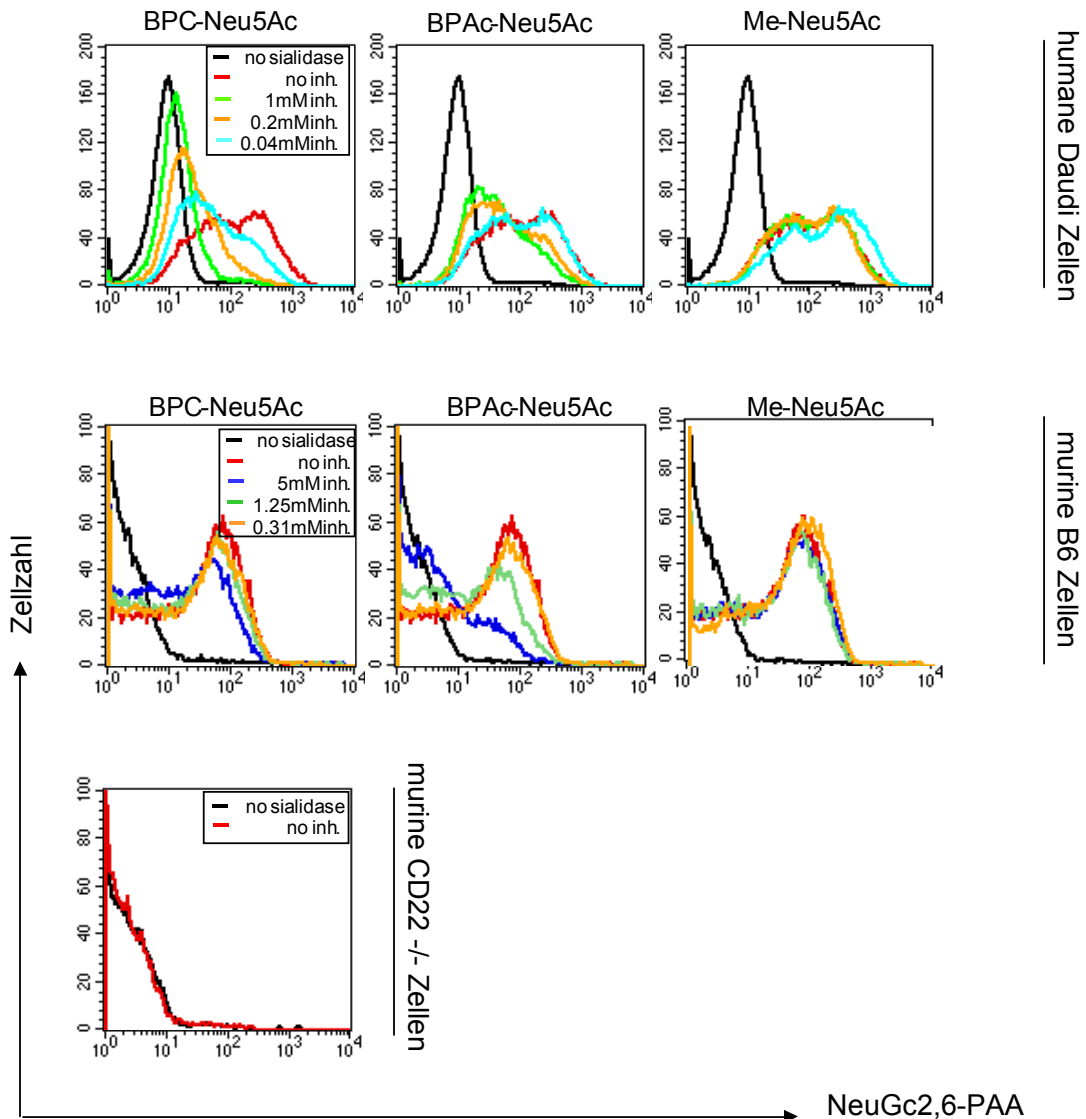


Abbildung 20: Die Spezifität der Sialoside für zelluläres CD22

Humane Daudi Zellen, murine C57BL/6J oder CD22-defiziente B-Zellen wurden direkt (schwarze Graphen) oder nach Sialidase-Behandlung (bunte Graphen) in der NeuGc-2,6-PAA-bio Probe inkubiert, mit Streptavidin-PE angefärbt und im FACS analysiert. Vor der Färbung mit der PAA-Probe wurden die Zellen mit den jeweiligen Sialosiden in angegebener Konzentrationen oder keinem Inhibitor (rote Kurven) vorbehandelt. Als Kontrolle für die Spezifität der synthetischen Proben wurden primäre CD22-defiziente B-Zellen (B220^{pos}) benutzt. Abgebildet ist ein exemplarisches von drei durchgeführten Experimenten mit dem gleichen Ergebnis.

4.2.1.3 In Gegenwart von BPC-Neu5Ac erhöhtes Ca^{2+} -Signal in humanen Daudi Zellen nach BZR-Stimulation

Nachdem die hohe Spezifität von BPC-Neu5Ac auch für zelluläres CD22 bewiesen worden war, sollte die Wirkungen von BPC-Neu5Ac auf das intrazelluläre BZR-Signal untersucht werden. Das synthetische Sialosid interferiert mit der natürlichen Ligandenbindung von CD22. Nach Stimulation dieser vorbehandelten Zellen sollte die Höhe des BZR-Signals Aufschluss über die Wirkung der extrazellulären Domäne von CD22 auf das BZR-Signal geben.

Ein direkter Nachweis für die Stärke des initiierten BZR-Signals nach Stimulation ist die Ca^{2+} -Mobilisation innerhalb der Zelle. Wie bereits beschrieben, werden innerhalb von Sekunden die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher geleert, was das Öffnen der Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran und den darauf folgenden extrazellulären Ca^{2+} -Einstrom induziert. Dabei ist die Höhe des Ca^{2+} -Flusses abhängig von der Stärke des BZR-Signals. In CD22-defizienten B-Zellen fehlt die inhibitorische Wirkung von CD22 auf das BZR-Signal, entsprechend verläuft das Ca^{2+} -Signal in CD22-defizienten B-Zellen im Vergleich zu Kontroll-B-Zellen erhöht und verlängert.

Humane Daudi Zellen wurden von L. Nitschke 7min auf Eis mit dem entsprechenden Sialosid bzw. PBS inkubiert, das Volumen des Ansatzes 40-fach mit vorgewärmten Medium verdünnt und die Zellen mit monoklonalem anti-IgM Antikörper stimuliert. In **Abb.: 21** wurde die Ca^{2+} -Mobilisation in Abhängigkeit von der Zeit abgebildet. Nach Vorbehandlungen der Daudi Zellen mit Me-Neu5Ac konnte kein Unterschied zum Ca^{2+} -Signal nach Inkubation mit PBS festgestellt werden, was bedingt durch das niedrige relative inhibitorische Potential von Me-Neu5Ac (Tab.: 9) nicht anders zu erwarten war. Wurden die Daudi Zellen aber mit BPC-Neu5Ac vorbehandelt, konnte bei hohen Sialosidkonzentrationen (160-100 μ M BPC-Neu5Ac) ein deutlicher Anstieg des Ca^{2+} -Peaks beobachtet werden.

Auch primäre menschliche Zellen wurden getestet. Der nach BZR-Stimulation initiierte Ca^{2+} -Peak in den B-Zellen von L. Nitschke war nach Inkubation mit BPC-Neu5Ac mehrfach höher als nach Vorbehandlung mit PBS, Me-Neu5Ac oder BPAC-Neu5Ac (Daten nicht gezeigt, veröffentlicht in Kelm et al., 2002).

Die Ergebnisse verdeutlichten, dass der gestiegene Ca^{2+} -Strom spezifisch für das Sialosid BPC-Neu5Ac bzw. dessen Wirkung auf CD22 ist. Die chemisch fast identisch aufgebaute Verbindung BPAC-Neu5Ac hatte keinen Einfluss auf das BZR-Signal, was eine unspezifische

Interaktion der Sialoside mit beispielsweise der Zellmembran oder anderen Oberflächenmolekülen ausschließt. Des Weiteren war zu beobachten, dass der Inhibitor eine hohe Affinität zu CD22 haben musste, um einen Effekt auf das BZR-Signal zu verursachen.

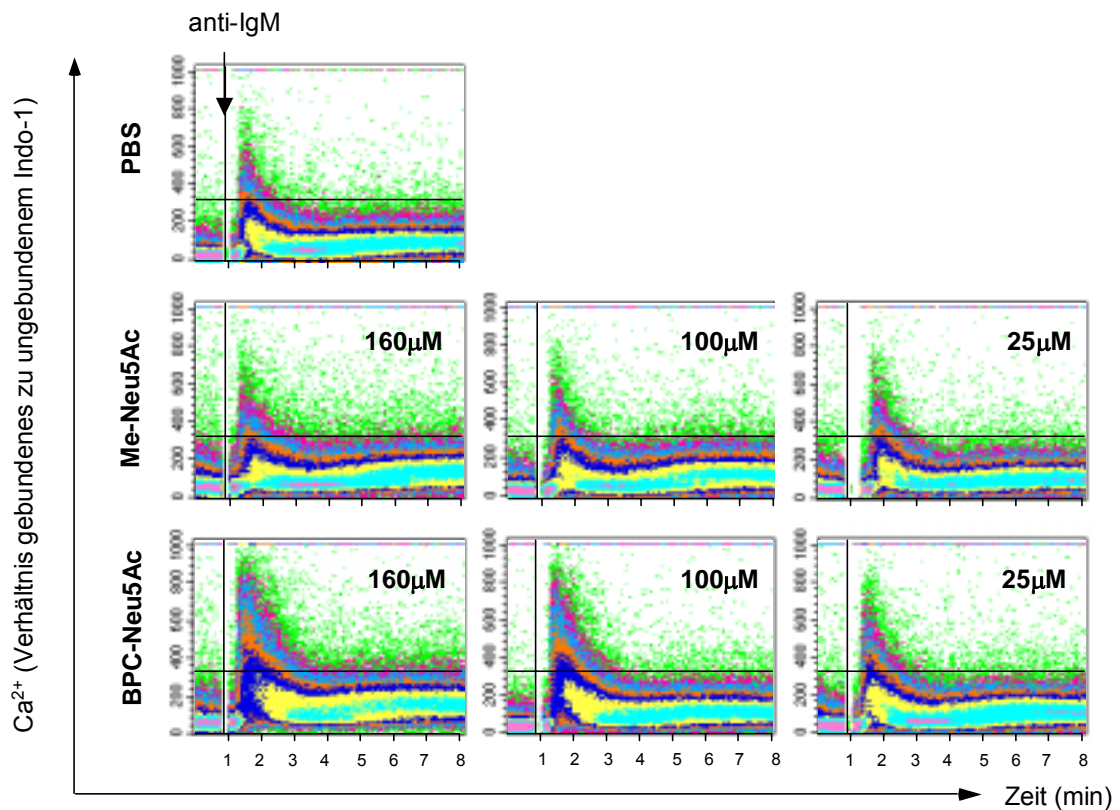


Abbildung 21: **Die Gegenwart des Sialosids BPC-Neu5Ac bewirkt nach BZR-Stimulation ein verstärktes Ca²⁺-Signal in humanen Daudi Zellen**

Kontinuierlich wachsende Daudi Zellen wurden zunächst mit Indo-1 beladen. Daraufhin wurden 1×10^6 Zellen entweder mit PBS, Me-Neu5Ac oder BPC-Neu5Ac in der angegebenen Konzentration 7 min auf Eis vorbehandelt, das Volumen mit vorgewärmtem Medium auf 2 ml aufgefüllt, in Gegenwart des jeweiligen Sialosids mit anti-BZR Antikörper (Klon BU.1) stimuliert und die Ca²⁺-Mobilisation innerhalb der Zelle im FACSORTER gemessen. Das Ca²⁺-Signal wurde durch das Verhältnis von gebundenem zu ungebundenem Indo-1 innerhalb der abgebildeten Zelle in Abhängigkeit von der Zeit berechnet. Gezeigt wurde ein repräsentatives von fünf durchgeführten Experimenten, deren Resultate gleich waren. Durchgeführt wurden die Experimente von L. Nitschke.

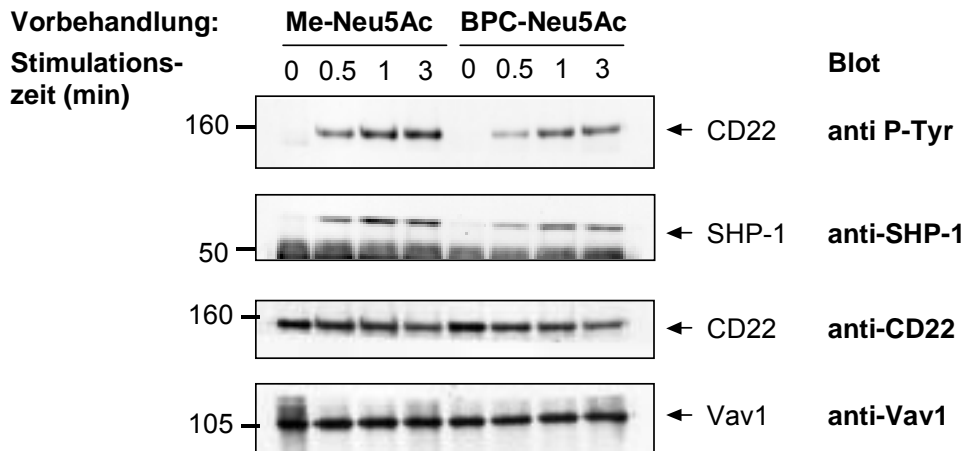
4.2.1.4 In Gegenwart von BPC-Neu5Ac reduzierte CD22-Tyrosin-Phosphorylierung und verringerte SHP-1 Assoziation nach BZR-Stimulation

Die Beobachtung, dass sich nach Vorbehandlung mit dem CD22-spezifischen Sialosid BPC-Neu5Ac das Ca^{2+} -Signal nach BZR-Stimulation erhöht, erinnerte an den Phänotyp CD22-defizienter B-Zellen. Im Fall letzterer wird davon ausgegangen, dass durch das Fehlen von CD22 die Anlagerungsstelle und die spezifische Aktivierung der Tyrosin-Phosphatase SHP-1 fehlt, was zu dem deutlich gesteigerten Ca^{2+} -Strom führt. BPC-Neu5Ac nun verdrängt partiell den natürlichen Liganden von CD22 auf der Zelloberfläche, was einen erhöhten Ca^{2+} -Fluss zur Folge hat.

Es stellte sich die Frage, ob das höhere Ca^{2+} -Signal durch einen verringerten inhibitorischen Einfluss von CD22 auf das BZR-Signal verursacht wird. Aus diesem Grund wurde die CD22 Tyrosin-Phosphorylierung nach BZR-Stimulation und die Menge des mit CD22 assoziierten SHP-1 in Western-Blots genauer analysiert. Dazu wurden humane Daudi Zellen bei RT für 7min mit dem entsprechenden Sialosid bzw. PBS (nicht gezeigt) inkubiert, das Volumen des Ansatzes etwa 20-fach mit vorgewärmten Medium verdünnt und die Zellen mit monoklonalem anti-IgM Antikörper für die angegebene Zeit stimuliert. Die Stimulation wurde durch Lyse der pelletierten Zellen beendet. Über Nacht wurden aus den Zelllysaten CD22 und als Ladekontrolle Vav1 präzipitiert. Wie in **Abb.: 22 (A)** ersichtlich, war präzipitiertes CD22 in Gegenwart von BPC-Neu5Ac geringer Tyrosin-phosphoryliert und entsprechend konnte nur weniger Phosphatase SHP-1 co-präzipitiert werden, als nach der Vorbehandlung mit Me-Neu5Ac. Das Sialosid Me-Neu5Ac diente als Kontrollsubstanz, da nach dessen Vorbehandlung dieselbe CD22 Tyrosin-Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte wie bei der Inkubation mit PBS. Die Blots von vier Experimenten wurden eingescannt, mit dem NIH-Programm densitometrisch quantifiziert und statistisch ausgewertet. Die BPC-Neu5Ac Behandlung führte zu einer signifikanten Reduktion der Tyrosin-Phosphorylierung von CD22 nach 1min und 3min anti-BZR Stimulation (**Abb.: 22 (B)**). Entsprechend war die Co-Präzipitation von SHP-1 auch nach 1min bzw. 3min anti-BZR Stimulation signifikant verringert (**Abb.: 22 (B)**).

Mit den beschriebenen Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von CD22 mit alpha2,6 Sialinsäure-tragenden Liganden Voraussetzung für die inhibitorische Wirkung des Siglecs auf das BZR-Signal ist.

A



B

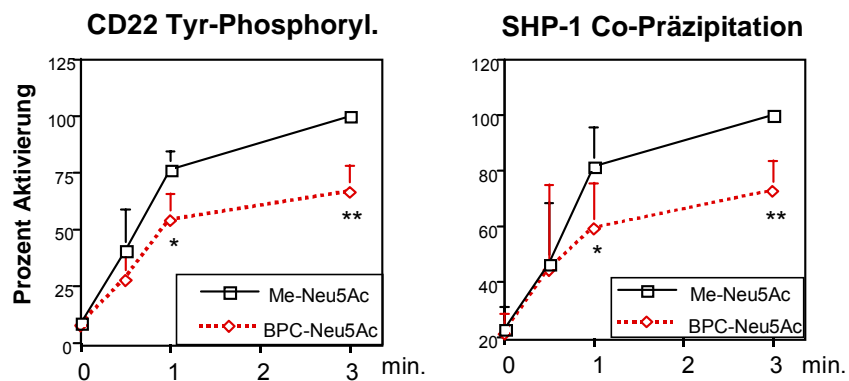


Abbildung 22: **Reduzierte Tyrosin-Phosphorylierung von CD22 nach BZR-Stimulation in Gegenwart des Sialosids BPC-Neu5Ac und verringerte SHP-1 Co-Präzipitation**

(A) $0,6 \times 10^7$ Daudi Zellen wurden bei RT für 7min mit Me-Neu5Ac (Kontrolle) oder BPC-Neu5Ac (beide $250\mu\text{M}$) vorbehandelt, mit vorgewärmten 1%-igem FCS RPMI⁺ auf 1ml aufgefüllt und mit $10\mu\text{g/ml}$ anti-IgM Antikörper (BU.1) für die angegebene Zeit auf 37°C stimuliert. Die Stimulation wurde durch die Lyse der pelletierten Zellen mit 1ml NP-40 Lysepuffer beendet. Aus den Zelllysaten wurde hCD22 (DAKO) und Vav1 (Santa Cruse Biotechnology) präzipitiert. Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulose in drei Teile geschnitten: CD22 wurde zuerst mit einem anti-Phospho-Tyrosin Antikörper (4G10, UBI) und daraufhin mit einem anti-hCD22 (Santa Cruse Biotechnology) Antikörper angefärbt. Da sich sterische Hinderungen zwischen 4G10 und anti-CD22 Antikörper ergaben, wurde Vav1 als Ladekontrolle mitpräzipitiert und unabhängig angefärbt. Der Teil der Nitrozellulose, der die Proteine der Größe 75-35kDa enthielt, wurde auf co-präzipitiertes SHP-1 (UBI) untersucht.

(B) Die Signalstärke der Banden wurde densitometrisch mit Hilfe des NIH-Programms ausgewertet. Die Intensität der CD22-Tyrosin und der SHP-1 Bande wurde durch die Pixelzahl der Ladekontrolle Vav1 dividiert. Das errechnete Verhältnis der stärksten Stimulation (Me-Neu5Ac, 3min) wurde auf 100% festgelegt und die restlichen Verhältnisse dazu in Bezug gesetzt. Angegeben wurden die durchschnittlichen Werte mit Standardabweichung von 4 unabhängigen Experimenten. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ im Student's *t* test

Durch die beschriebenen Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Adhäsionsdomäne von CD22 einen direkten und positiven Einfluss auf die intrazelluläre Funktion von CD22 hat. Da CD22 mit dem alpha2,6 Sialinsäure-tragenden Liganden unabhängig von dessen Proteingerüst interagiert, scheint eine spezifische CD22-Liganden Interaktion ausgeschlossen zu sein. Wie die cis-Ligandenbindung von CD22 reguliert wird, konnte bisher nicht geklärt werden. Es scheint, als seien jene Liganden im Vorteil, die hoch exprimiert und stark sialyliert sind. Möglicherweise bindet CD22 sämtliche alpha2,6 Sialinsäure-tragenden Moleküle, und nur Interaktionen mit spezifischen Liganden verursachen zu intrazellulären Konsequenzen.

4.2.2 BPC-Neu5Ac stört die Interaktion zwischen CD22 und dem BZR

Wie erst kürzlich von Bakker et al. (2002) beschrieben wurde, erkennt CD22 seinen Liganden ausschließlich über die alpha2,6 Sialinsäure. Wird das alpha2,6 Sialinsäure-tragende Proteingerüst für die Liganden-Erkennung nicht einbezogen, sollte eine spezifische Interaktion der Siglecs ausgeschlossen sein. Nach diesem Modell könnte CD22 mit allen Oberflächenmolekülen interagieren, die sich auf der B-Zelle befinden und mit alpha2,6 Sialinsäure modifiziert wurden. Dies scheint nicht mit den bisher beschriebenen Ergebnissen vereinbar zu sein, denn die Störung der CD22-Liganden Bindung mit dem Inhibitor BPC-Neu5Ac resultierte in einem spezifischen Effekt auf das BZR-Signal.

Möglicherweise interagiert CD22 tatsächlich mit verschiedenen Oberflächenmolekülen, jedoch könnten hoch exprimierte und stark sialylierte Moleküle wie CD45 oder membrangebundenes IgM (mIgM, BZR) einen Vorteil haben. Auch würde der BZR als Ligand für CD22 aus Gründen der Lokalisation einleuchten, denn die Kreuzvernetzung des mIgM ist Voraussetzung für die Aktivierung der BZR-Signalkaskade, durch deren proximale Schritte auch CD22 Tyrosin-phosphoryliert wird. Gleichzeitig wird die Phosphatase SHP-1 an CD22 rekrutiert und aktiviert. Die Phosphatase ist für die feine Abstimmung der Signalintensität des BZRs notwendig. Leprince et al. und Peaker et al. (beide 1993) hatten bereits beschrieben, dass eine kleine Menge an CD22 aus Daudi Zellen mit IgM co-präzipitiert werden kann. Immunpräzipitationen von mIgM und gleichzeitiger Co-Präzipitation von CD22 aus stimulierten humanen Daudi Zellen nach Vorbehandlung mit PBS (Kontrolle) oder BPC-Neu5Ac sollten klären, ob der BZR ein Ligand von CD22 ist, und ob diese Interaktion in Abhängigkeit von Sialinsäure verläuft.

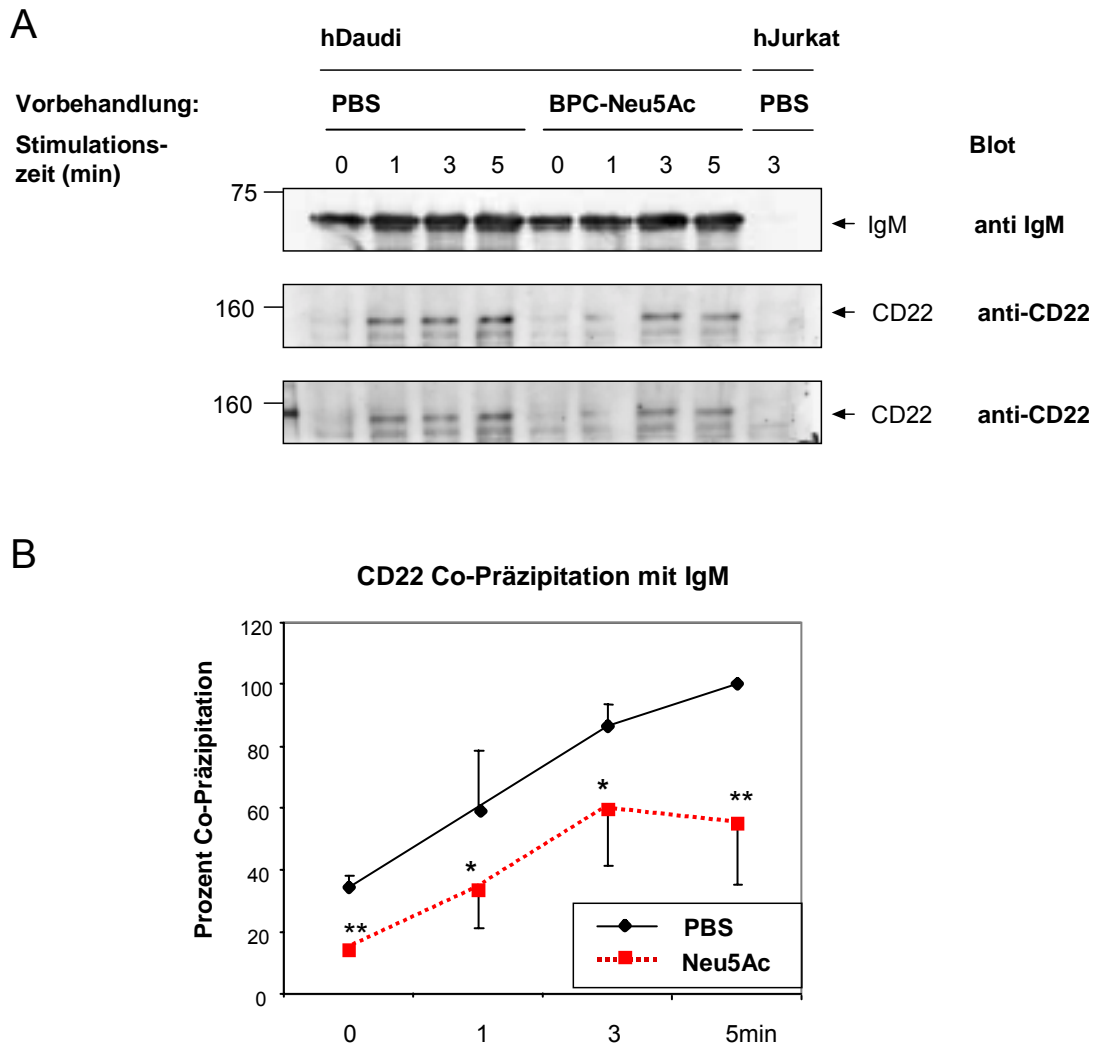


Abbildung 23: **CD22 co-präzipitiert mit dem BZR in Abhängigkeit von alpha2,6 Sialinsäure**

(A) $0,8 \times 10^7$ Daudi Zellen wurden bei RT für 7min mit PBS (Kontrolle) oder BPC-Neu5Ac ($250\mu\text{M}$) inkubiert, mit vorgewärmten 1%-igem FCS RPMI⁺ auf 1ml aufgefüllt und mit $1\mu\text{g/ml}$ polyklonalem anti-hIgM F(ab')₂ Fragment für die angegebene Zeit auf 37°C stimuliert. Die Stimulation wurde durch die Lyse der pelletierten Zellen mit Brij-TNE-Puffer beendet. Aus den Zelllysaten wurde hIgM präzipitiert. In der Höhe von 160kD wurde CD22 mit einem CD22-spezifischen Antikörper (Santa Cruse Biotechnology) angefärbt. Als Ladekontrolle wurde IgM (DAKO) sichtbar gemacht.

(B) Die Blots wurden eingescannt und die Banden densitometrisch mit Hilfe des NIH-Programms ausgewertet. Die Intensität der CD22 Banden wurde durch die Pixelzahl der Ladekontrolle IgM dividiert. Das errechnete Verhältnis der stärksten Stimulation (PBS, 3min) wurde auf 100% festgelegt und die anderen Verhältnisse dazu in Bezug gesetzt. Angegeben wurden die durchschnittlichen Werte mit Standardabweichung von 4 unabhängigen Experimenten. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ im Student's *t* test

Hierfür musste das in Kapitel 4.2.1.4. beschriebene Versuchsprotokoll zunächst modifiziert werden, da der bisher verwendete intakte Stimulations-Antikörper (Klon BU.1) bei Präzipitationen auch an die Sepharose-Kügelchen bindet und dadurch die Menge an präzipitiertem mIgM verfälscht. Zur Stimulation wurde der monoklonale Antikörper durch ein polyklonales anti-human IgM F(ab')₂ Fragment ersetzt. Um vergleichbare

Versuchsbedingungen bei der Stimulationen von Daudi Zellen zu haben, wurde die Konzentration des F(ab')₂ Fragments so titriert, dass die Inhibition der CD22-Tyrosin-Phosphorylierung in Gegenwart von BPC-Neu5Ac nach BZR-Stimulation reproduziert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Die Vorbehandlung der Daudi Zellen mit PBS oder BPC-Neu5Ac wurde wie bereits beschrieben durchgeführt, die Zellen mit 1 µg/ml anti-human IgM F(ab')₂ Fragment für die angegebene Zeit stimuliert und die Stimulation durch die Lyse mit Brij-TNE-Lysepuffer beendet. Über Nacht wurde mIgM präzipitiert, im SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Wie in **Abb.: 23 (A)** deutlich zu sehen ist, wurde nach Inkubation der Daudi Zellen mit BPC-Neu5Ac weniger CD22 co-präzipitiert als in der Kontrollpräzipitation. Die Blots von vier unabhängigen Experimenten wurden eingescannt, mit dem NIH-Programm densitometrisch quantifiziert und statistisch ausgewertet (**Abb.: 23 (B)**). Die Vorbehandlung der Daudi Zellen mit BPC-Neu5Ac führte zu einer signifikanten Reduktion der Interaktion von CD22 mit dem BZR. Besonders deutlich wurde diese nach 5min anti-BZR Stimulation.

Eine direkte Interaktion zwischen dem BZR und CD22 konnte durch die beschriebenen Ergebnisse bestätigt werden. Da die Interaktion zwischen CD22 und dem BZR durch den Inhibitor BPC-Neu5Ac gestört wurde, bindet CD22 den BZR über dessen alpha2,6 Sialinsäure.

4.2.3 CD45 als potentieller Ligand für CD22

Die mögliche Interaktion von CD22 mit B220, der B-zellspezifischen Variante von CD45, wird durch folgende Daten unterstützt: erstens konnten von Stamenkovic et al. (1992) große Mengen an verschiedenen CD45 Isoformen mit einem rekombinanten CD22 Molekül (CD22Rg) präzipitiert werden. Die potentielle Interaktion zwischen CD22 und CD45 ist folglich schon lange bekannt. Zweitens bekräftigt die hohe Expression von B220 auf der B-Zelloberfläche und die starke Sialylierung die Interaktion von CD22 und CD45. Drittens wäre die dichte Lokalisation beider Moleküle für die intrazelluläre Funktion von CD45 einleuchtend. Die Protein-Tyrosin-Phosphatase CD45 ist verantwortlich für die Aktivierung der Src-Kinasen wie Lyn, Fyn, Blk, usw. Wie essentiell die src-Kinase Lyn für die Tyrosin-Phosphorylierung von CD22 ist, wurde überzeugend in Lyn-defizienten B-Zellen von Chan et al. (1997), Nishizumi et al. (1998) und Smith et al. (1998) gezeigt. Die Tyrosin-Phosphorylierung von CD22 in Lyn-defizienten B-Zellen nach BZR-Stimulation ist sehr stark verringert.

Wir stellten die Frage, ob in CD45-defizienten B-Zellen der Phosphorylierungsgrad von CD22 nach BZR-Stimulation im Vergleich zu Kontroll-Zellen verringert ist. Hierfür hatte die Arbeitsgruppe von L. Nitschke die CD45-knock-out Maus von Rita Carsetti (MPI, Freiburg) zu Verfügung gestellt bekommen (Kishihara et al., 1993).

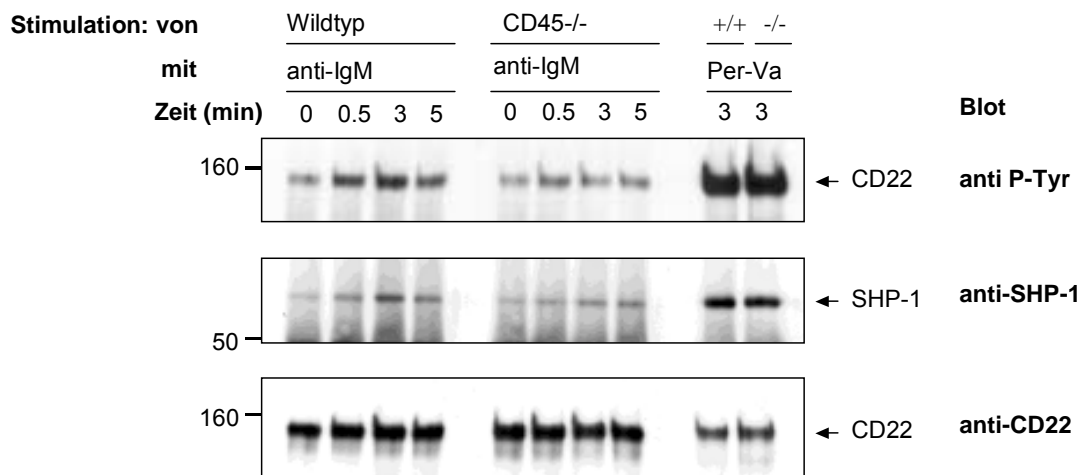
4.2.3.1 In CD45-defizienten B-Zellen stark verringerte CD22 Tyrosin-Phosphorylierung nach BZR-Stimulation

Um den Zusammenhang zwischen CD45, der Src-Kinase Lyn und dessen Substrat CD22 zu zeigen, wurde CD22 aus CD45-defizienten B-Zellen immunpräzipitiert und dessen Tyrosin-Phosphorylierung mit dem CD22 aus wildtypischen B-Zellen nach BZR-Stimulation verglichen.

Für die Immunpräzipitation von CD22 aus CD45-defizienten und Kontroll-Mäusen wurden deren B-Zellen aufgereinigt, für die angegebene Zeit mit monoklonalem anti-IgM Antikörper oder als Kontrolle mit Per-Vanadat stimuliert, in eiskaltem Lysepuffer resuspendiert und CD22 immunpräzipitiert. Nach Transfer der Proteine auf Nitrozellulose wurde diese mit dem jeweils beschriebenen Antikörper angefärbt (**Abb.: 24 (A)**). Die Blots wurden eingescannt und densitometrisch ausgewertet. Es wurde deutlich, dass der Tyrosin-Phosphorylierungsgrad von CD22 in CD45-defizienten B-Zellen um 30-50% verringert vorliegt (**Abb.: 24 (B)**). Entsprechend konnte nur eine anteilige Menge an SHP-1 aus CD45-defizienten Zellen mit CD22 co-präzipitiert werden. Die Stimulation mit dem Phosphatase-Inhibitor Per-Vanadat diente zur Kontrolle für den erfolgreichen Versuchsablauf und die Funktionalität der verwendeten Antikörper.

Wie mit den Experimenten gezeigt wurde, übernimmt die Phosphatase CD45 eine wichtige Aufgabe in der Tyrosin-Phosphorylierung von CD22. Diese scheint allerdings nicht exklusiv zu sein, denn in jedem durchgeführten Experiment konnte eine basale Tyrosin-Phosphorylierung von CD22 nach BZR-Stimulation nachgewiesen werden. Verursacht durch die verringerte Phosphorylierung von CD22 assoziiert auch weniger SHP-1 Phosphatase an CD22. Entsprechend der bisher gezeigten Daten würde man ein gestiegenes Ca^{2+} -Signal in CD45-defizienten B-Zellen nach BZR-Stimulation erwarten. Die Tyrosin-Phosphatase ist aber für die allgemeine Aktivierung der Src-Kinasen in der BZR-Signalkaskade verantwortlich. Da dies der dominante Effekt für die Ca^{2+} -Mobilisation zu sein scheint, kann in CD45-defizienten B-Zellen kein Ca^{2+} -Signal gemessen werden (Daten nicht gezeigt).

A



B

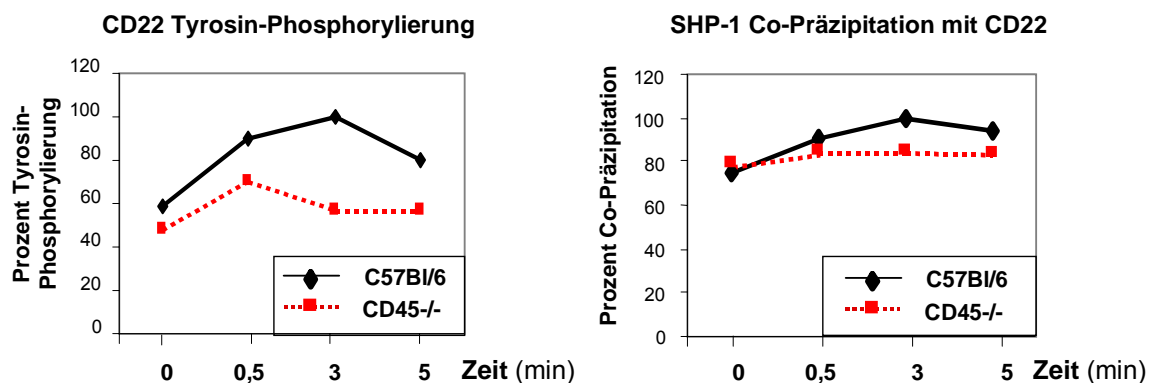


Abbildung 24: In CD45-defizienten B-Zellen 30-50% reduzierte Tyrosin-Phosphorylierung von CD22 nach BZR-Stimulation und verringerte SHP-1 Co-Präzipitation

(A) B-Lymphozyten aus Kontroll- und CD45-defizienten Mäusen wurden aufgereinigt und die Konzentration auf $1,5 \times 10^7$ Zellen/ml verdünnt. Vor der Stimulation mit $10 \mu\text{g/ml}$ monoklonalem anti-IgM Antikörper (B7-6) für die angegebene Zeit wurden die Fc γ -Rezeptoren durch eine Vorbehandlung mit 2.4G2-Antikörper blockiert. Die Stimulation wurde durch die Lyse der pelletierten Zellen mit NP-40 Lysepuffer beendet. Aus den Zelllysaten wurde CD22 mit je $4 \mu\text{g/ml}$ Kaninchen anti-CD22 Antikörper präzipitiert. Die Nitrozellulose wurde zunächst mit anti-Phospho-Tyrosin Antikörper (4G10, UBI) und anschließend mit Kaninchen anti-SHP-1 Antikörper (UBI) angefärbt. Als Ladekontrolle wurde der Blot nach dem Strippen mit Kaninchen anti-CD22 Antikörper (Arbeitskreis) behandelt. Abgebildet wurde ein repräsentatives von 3 durchgeführten Experimenten.

(B) Die Signalstärke der Banden des abgebildeten Blots wurde densitometrisch mit dem NIH-Programm ausgewertet. Die Intensität der CD22-Tyrosin und der SHP-1 Bande wurde durch die Pixelzahl der Ladekontrolle CD22 dividiert. Das errechnete Verhältnis der CD22-Tyrosin-Phosphorylierung nach 3min Stimulation wurde als 100% gesetzt und die übrigen Daten in Bezug dazu berechnet.

Diese vorläufigen Experimente haben gezeigt, dass in CD45-defizienten B-Zellen CD22 geringer Tyrosin-phosphoryliert vorliegt, wodurch weniger Phosphatase SHP-1 mit CD22 co-präzipitiert werden kann. In den folgenden Untersuchungen sollte der direkte Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung von CD22 und CD45 bewiesen werden. Weiterhin wäre es interessant zu wissen, ob CD22 und die Phosphatase CD45 Sialinsäure-abhängig interagieren. Dies könnte mit Hilfe von Immunpräzipitationen von CD45 und der möglichen Co-Präzipitation von CD22 aus humanen Daudi Zellen gezeigt werden. Auch wäre es dann möglich, die Daudi Zellen vor der Immunpräzipitation mit den verschiedenen Sialosiden vorzubehandeln. Des weiteren sollte die CD22-Maskierung auf CD45-defizienten B-Zellen überprüft werden. Wäre CD45 der hauptsächliche Interaktionspartner von CD22 auf B-Zellen, könnte CD22 auf CD45-defizienten B-Zellen teilweise unmaskiert vorliegen, oder durch die Interaktion mit anderen Liganden könnte sich die Lokalisation von CD22 auf der Zelloberfläche verändern.

4.3 Die Rolle von CD22 in BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen

Für die B-zellspezifische Expression von Oktamer-Motiv-enthaltenden Genen ist der transkriptionelle Co-Aktivat BOB.1/OBF.1 (**B**-cell Specific **O**ctamer-motife **B**inding Protein/**O**ct-binding **F**actor) verantwortlich. BOB.1/OBF.1 interagiert mit der Pou-Domäne von Oct-1 oder Oct-2 und wirkt dadurch wie eine molekulare Klammer, die beide DNS-bindenden Proteine zusammenhält. Durch die Charakterisierung von BOB.1/OBF.1-knock-out Mäusen wurden Informationen über die Aufgaben des transkriptionellen Co-Aktivators während der B-Zellentwicklung, der B-Zelldifferenzierung und während Immunantworten gewonnen.

Um die Rolle des transkriptionellen Co-Aktivators BOB.1/OBF.1 während der B-Zellentwicklung zu analysieren, wurde die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle von B-Zellen aus dem Knochenmark von BOB.1/OBF.1-defizienten mit Kontroll-B-Zellen verglichen. Da die Expression von CD22 auf BOB.1/OBF.1^{-/-} Vorläufer B-Zellen deutlich erhöht war, wurden BOB.1/OBF.1- und CD22-k.o. Mäuse gekreuzt und in Zusammenarbeit mit dem Labor von T. Wirth in Ulm analysiert. Wie im Folgenden beschrieben, scheint CD22 während der B-Zellentwicklung im Knochenmark und bei der Modulation der BZR-Signalstärke in BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen eine wichtige Rolle zu übernehmen. Die Annahme, dass die Überexpression von BOB.1/OBF.1 in CD22-defizienten B-Zellen nach LPS-Stimulation der Grund für die verdoppelte Teilungsrate eben dieser Zellen sei, konnte nicht bestätigt werden.

4.3.1 Erhöhte CD22 Expression auf BOB.1/OBF.1-defizienten Vorläufer B-Zellen

Wie von Hess et al. (2001) beschrieben wurde, verursacht ein Entwicklungsblock im transitionalen B-Zellstadium im Knochenmark von BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen eine zwei- bis dreifache Reduktion reifer B-Zellen in der Milz. Dieser Entwicklungsblock sollte genauer untersucht werden, indem die Expression verschiedener Oberflächenmarker von wildtypischen und BOB.1/OBF.1-defizienten B-Zellen aus dem Knochenmark verglichen wurde.

Die Oberflächenexpression von CD25 (große prä- bis kleine prä-B-Zelle), BP-1 (späte pro- bis kleine prä-B-Zelle) und HSA (niedrige Expression: transitionale B-Zelle, mittlere Expression: frühe pro- bis späte pro-B-Zelle, hohe Expression: große prä- bis unreife B-Zelle) unterschied sich nicht zwischen B-Zellen aus dem Knochenmark von wildtypischen und BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen (**Abb.: 25 (B)**).

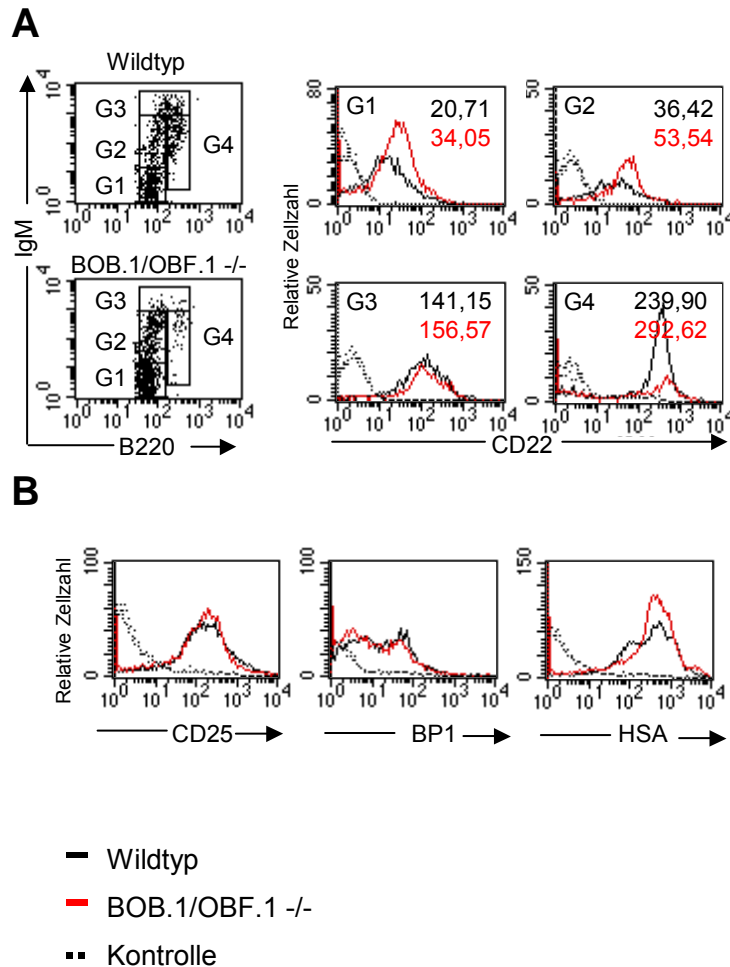


Abbildung 25: **Erhöhte Expression von CD22 auf Knochenmarkszellen von BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen**

(A) Knochenmark von wildtypischen und BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen wurde mit anti-B220-FITC, anti-CD22-PE und anti-IgM-bio Antikörpern angefärbt und im FACScan analysiert. B-Lymphozyten wurden in G1: pro- und prä-B-Zellen ($B220^{\text{niedrig}} IgM^{\text{negativ}}$), G2: unreife B-Zellen ($B220^{\text{niedrig}} IgM^{\text{niedrig-medium}}$), G3: transitionale B-Zellen ($B220^{\text{niedrig-hoch}} IgM^{\text{hoch}}$) und G4: reife, rezirkulierenden B-Zellen ($B220^{\text{hoch}} IgM^{\text{niedrig}}$) aufgetrennt. Die Histogramme zeigen die CD22 Expression der entsprechenden B-Zellpopulationen im Knochenmark wildtypischer (schwarze Linie) und BOB.1/OBF.1-defizienter Mäuse (rote Linie). Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) wurde in den jeweiligen Farben für das abgebildete, exemplarische Experiment (von fünf durchgeführten Experimenten) angegeben.

(B) Die Expressionshöhe von CD25, BP-1 und HSA wurde von $B220^+$ Knochenmarkszellen aus wildtypischen und BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen verglichen. Dazu wurden die Knochenmarkszellen aus den jeweiligen Mäusen anti-B220 zusammen mit entweder anti-CD25, anti-HSA oder anti-BP-1 Antikörpern angefärbt und im FACScan analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives von vier durchgeführten Experimenten. Die Abbildung wurde von T. Samardzic angefertigt.

Allerdings war die Menge an CD22 (exprimiert ab dem prä-B-Zellstadium und ansteigend bis zum reifen B-Zellstadium) auf der Oberfläche von BOB.1/OBF.1-defizienten B-Zellen aus dem Knochenmark deutlich erhöht (**Abb.: 25 (A)**). Um diese Beobachtung genauer definieren zu können, wurden Dreifarbenanfärbungen für FACS-Analysen von B-Zellen aus

dem Knochenmark wildtypischer und BOB.1/OBF.1-defizienter Mäuse durchgeführt. In **Abb.: 25 (A)** wurden B220⁺ gegen IgM⁺ Zellen aufgetragen. Dadurch wird die Unterscheidung der verschiedenen Entwicklungsstadien im Knochenmark möglich. Im Gate1 (G1) befinden sich pro- und prä-B-Zellen (B220^{niedrig} IgM^{negativ}), in Gate2 (G2) unreife B-Zellen (B220^{niedrig} IgM^{niedrig-medium}), in Gate3 (G3) transitionale B-Zellen (B220^{niedrig-hoch} IgM^{hoch}) und in Gate4 (G4) die reifen, rezirkulierenden B-Zellen (B220^{hoch} IgM^{niedrig}). Durch die zusätzliche Anfärbung von CD22 wurde ersichtlich, dass pro- und prä-B-Zellen (G1) und unreife B-Zellen (G2) aus BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen CD22 höher exprimierten als die entsprechenden B-Zellen aus wildtypischen Mäusen. Dagegen war das CD22-Expressionsniveau auf transitionalen (G3) und reifen, rezirkulierenden B-Zellen (G4) aus BOB.1/OBF.1-defizienten Tieren vergleichbar hoch wie auf B-Zellen aus Kontroll-Mäusen.

Die Beobachtung, dass die Expression von CD22 auf Vorläufer- und unreifen B-Zellen in BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen deutlich erhöht war, ließ eine funktionelle Abhängigkeit der beiden Moleküle vermuten. Um diese Hypothese genauer untersuchen zu können, wurden BOB.1/OBF.1-defiziente Mäuse aus der Arbeitsgruppe von T. Wirth (Universität Ulm; ursprünglich von P. Nielsen, MPI Freiburg) und CD22-defiziente Mäuse von Kerstin Müller und Tatjana Samardzic (Universität Ulm) gekreuzt. BOB.1/OBF.1xCD22-doppel-defiziente Mäuse wurden in Würzburg und in Ulm auf Unterschiede im Phänotyp zu BOB.1/OBF.1^{-/-} und CD22^{-/-} Mäusen untersucht.

4.3.2 Signifikante Steigerung der transitionellen B-Zellen in BOB.1/OBF.1x CD22-doppel-defizienten Mäusen

Die inhibitorische Wirkung von CD22 auf das BZR-Signal wurde bereits ausführlich diskutiert. Schon geringe Abweichungen im Expressionsmuster von CD22 reichen aus, eine Veränderung im Phänotyp beobachten zu können (Cornall et al., 1998). Aus diesem Grund wurde erwogen, dass die erhöhte Expression von CD22 auf den B-Vorläuferzellen einen Einfluss auf die Entwicklung der Zellen im Knochenmark von BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen habe. Um dieser Frage nachzugehen, wurden B-Zellen aus dem Knochenmark von BOB.1/OBF.1xCD22-doppel-defizienten Mäusen mit den B-Zellen aus einzel-defizienten und Kontroll-Mäusen verglichen.

Wie bereits zuvor beschrieben, entwickeln sich die B-Zellen im Knochenmark von BOB.1/OBF.1^{-/-} Mäusen im pro-, prä- und unreifen Stadium normal. Im Übergang zum transitionalen Entwicklungsstadium sterben die B-Zellen vermehrt an Apoptose (Hess et al., 2001). Daraus folgen eine zwei- bis dreifache Reduktion der B-Zellen in der Milz und eine

sehr geringe Anzahl an rezirkulierenden B-Zellen im Knochenmark. Dagegen wurde im Knochenmark von CD22-defizienten Mäusen keine Abweichung in der B-Zellentwicklung beobachtet (O'Keefe et al., 1996; Otipoby et al., 1996; Sato et al., 1996; Nitschke et al., 1997). Reife B-Zellen in der Peripherie wiesen jedoch einen voraktivierten Phänotyp auf (O'Keefe et al., 1996; Otipoby et al., 1996; Sato et al., 1996; Nitschke et al., 1997). Außerdem bedingte das Fehlen von CD22 einen Homing-Defekt, der zum Verlust der reifen, rezirkulierenden B-Zellen ins Knochenmark führt (Nitschke et al., 1999).

Knochenmarkszellen aus wildtypischen, BOB.1/OBF.1-, CD22- und doppel-defizienten Mäusen wurden anti-B220 und anti-IgM angefärbt, um in der FACS-Analyse die verschiedenen Entwicklungsstadien der B-Zellen im Knochenmark unterscheiden zu können: $B220^{\text{niedrig}} \text{IgM}^{\text{negativ}}$ Zellen entsprechen den pro- und prä-B-Zellen, $B220^{\text{niedrig}} \text{IgM}^{\text{niedrig-medium}}$ den unreifen B-Zellen, $B220^{\text{niedrig-hoch}} \text{IgM}^{\text{hoch}}$ den transitionalen und $B220^{\text{hoch}} \text{IgM}^{\text{niedrig}}$ den reifen, rezirkulierenden B-Zellen. Im Knochenmark der BOB.1/OBF.1xCD22-doppel-defizienten Mäuse konnte im Vergleich zu BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen eine signifikant erhöhte Anzahl transitionaler B-Zellen ($B220^{\text{niedrig-hoch}} \text{IgM}^{\text{hoch}}$) nachgewiesen werden. Diese war vergleichbar mit der aus Wildtypmäusen bekannten Populationsgröße (**Abb.: 26**). Dagegen konnte, wie erwartet, in den BOB.1/OBF.1xCD22^{-/-} Mäusen keine Verbesserung in der Anzahl rezirkulierender B-Zellen detektiert werden (**Abb.: 26**).

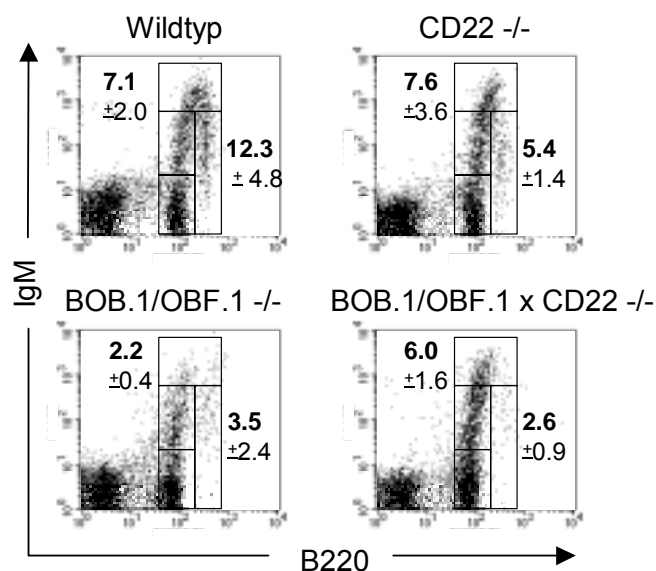


Abbildung 26: **Der Verlust von CD22 bewirkt eine verbesserte Entwicklung von BOB.1/OBF.1-defizienten B-Zellen im Knochenmark**

(A) Knochenmark von wildtypischen, BOB.1/OBF.1-, CD22- und doppel-defizienten Mäusen wurde isoliert, mit anti-B220-FITC und anti-IgM-PE Antikörpern angefärbt und im FACS analysiert. Abgebildet wurde ein repräsentatives von sechs durchgeführten Experimenten. Die durchschnittliche Fluoreszenz (mit Standardabweichung) der transitionalen und rezirkulierenden Zellen wurde angegeben. Abbildung von T. Samardzic.

Die anfangs geäußerte Hypothese, dass die erhöhte Expression von CD22 auf BOB.1/OBF.1-defizienten B-Vorläuferzellen einen Einfluss auf die B-Zellentwicklung habe, wurde durch die wiederhergestellte, transitionale B-Zellpopulation in den BOB.1/OBF.1xCD22^{-/-} Mäusen bestätigt. Über die Funktion von CD22 in diesem Entwicklungsstadium ist bisher nichts bekannt. Somit kann mit den vorliegenden Daten nicht geklärt werden, ob CD22 bereits während der B-Zellentwicklung eine inhibitorische Wirkung auf das prä-BZR-Signal ausübt, oder ob CD22 auf eine andere Weise die B-Zellentwicklung beeinflusst.

4.3.3 Gestiegene Anzahl reifer B-Zellen in BOB.1/OBF.1xCD22-doppel-defizienten Mäusen

Für BOB.1/OBF.1^{-/-} Mäuse wurde eine zwei- bis dreifache Reduktion reifer B-Zellen in der Peripherie beschrieben (Schubart et al., 1996; Nielsen et al., 1996; Hess et al., 2001). Der zusätzliche Verlust von CD22 in BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen bewirkte eine beinahe wildtypische Anzahl an transitionalen B-Zellen im Knochenmark. Daraus ergab sich die Frage, ob diese auch als reife B-Zellen in der Peripherie zirkulieren.

Um diese Frage zu beantworten, wurden Milzzellen aus wildtypischen, BOB.1/OBF.1-, CD22- und doppel-defizienten Mäusen isoliert und gegen das B-zellspezifische B220 und das TZR-Molekül CD3 angefärbt. Wie in **Abb.: 27 (A)** gezeigt, verbesserte sich das Verhältnis von B : T-Zellen zu Gunsten der B-Zellen in den doppel-defizienten Mäusen. Gewöhnlich ist das B : T-Zellverhältnis in der Milz von wildtypischen Mäusen 2:1, das auch in CD22-defizienten Mäusen vorliegt. In den Milzen von BOB.1/OBF.1^{-/-} Mäusen sank die B-Zellzahl auf rund 1:1 im Vergleich zu den T-Zellen. BOB.1/OBF.1xCD22-doppel-defiziente Mäuse hatten eine gestiegene B-Zellzahl, die wieder zu einem B : T-Zellverhältnis von etwa 2:1 führte. Um diesen Anstieg an B-Zellen genauer zu analysieren, wurden Antikörperanfärbungen gegen IgM und IgD durchgeführt. Durch diese konnten die einzelnen B-Zellpopulationen in der Milz unterschieden werden: transitionelle Typ1 (T1) B-Zellen exprimieren IgM^{hoch} IgD^{niedrig}, transitionelle Typ2 (T2) IgM^{hoch} IgD^{hoch} (Loder et al., 1996) und reife B-Zellen IgM^{niedrig} IgD^{hoch}. In der Peripherie von BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen war die Anzahl reifer B-Zellen (IgM^{niedrig} IgD^{hoch}) etwa halbiert, wohingegen in CD22-defizienten Mäusen die Anzahl reifer B-Zellen erhöht war. Dies lag an dem voraktivierten Zustand der reifen B-Zellen in CD22^{-/-} Mäusen. In der Milz von BOB.1/OBF.1xCD22-doppel-defiziente Mäuse befinden sich mehr reife B-Zellen als in BOB.1/OBF.1^{-/-} Milzen. Allerdings erreicht die B-Zellzahl nicht jene von wildtypischen Mäusen (**Abb.: 27 (B)**).

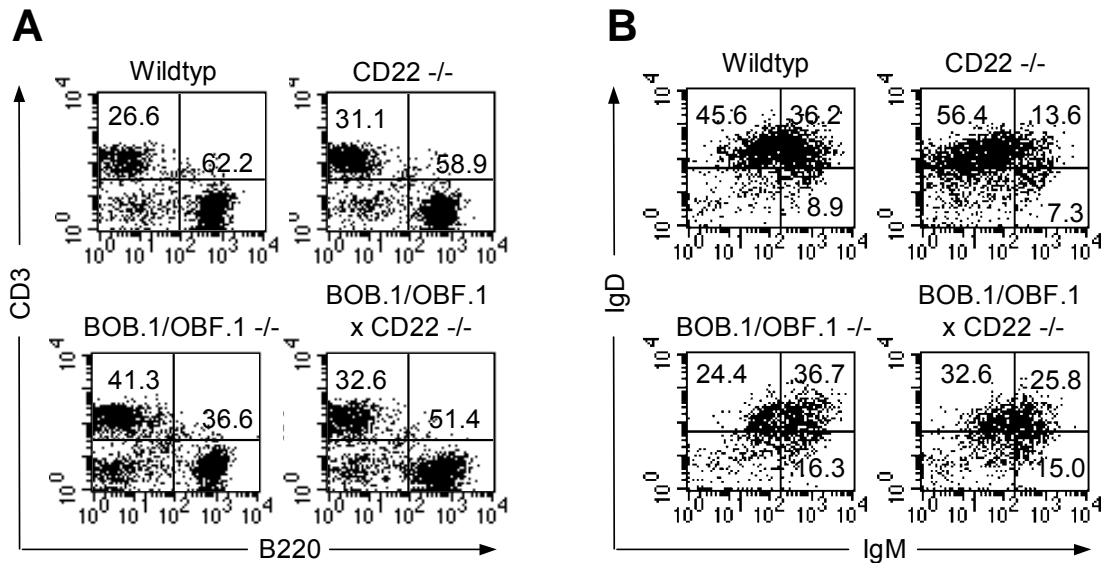


Abbildung 27: In BOB.1/OBF.1xCD22-doppel-defizienten Milzen ist das B : T-Zellverhältnis wieder hergestellt und die Anzahl reifer B-Zellen gestiegen

(A) Splenozyten wurden aus wildtypischen, BOB.1/OBF.1-, CD22- und doppel-defizienten Mäusen isoliert, mit anti-B220-FITC und anti-CD3-PE Antikörpern angefärbt und im FACS analysiert. Gezeigt wurden die relativen Prozentzahlen der B- und T-Zellen eines repräsentativen von sechs durchgeführten Experimenten.

(B) Um die B-Zellpopulationen in der Milz unterscheiden zu können, wurden im Weiteren die Splenozyten aus den jeweiligen Mäusen mit anti-B220-bio, anti-IgM-PE und anti-IgD-FITC angefärbt. B220-positive Zellen wurden auf ihre IgM und IgD Expression hin untersucht. Die relativen Prozentzahlen der T1 (IgM^{hoch} IgD^{niedrig}), T2 (IgM^{hoch} IgD^{hoch}; Loder et al., 1996) und reifen B-Zellen (IgM^{niedrig} IgD^{hoch}) wurden angegeben. Der prozentuale Anteil reifer B-Zellen von vier durchgeführten Experimenten lag in wildtypischen Mäusen bei $47,67 \pm 3,99$, in CD22-defizienten Mäusen bei $48,81 \pm 5,46$, in BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen bei $21,88 \pm 4,16$ und in CD22 x BOB.1/OBF.1- doppel-defizienten Mäusen bei $34,81 \pm 4,43$. Abbildung von T. Samardzic

4.3.4 Das Ca²⁺ - Signal in BOB.1/OBF.1 x CD22-doppel-defizienten B-Zellen ist wieder hergestellt

Die zusätzliche Deletion von CD22 in BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen führte zur Wiederherstellung der transitionellen B-Zellpopulation im Knochenmark und einer Anreicherung reifer B-Zellen in der Milz. Um eine mögliche Erklärung für die gestiegene Überlebensrate der reifen B-Zellen zu erhalten, wurde das BZR-Signal in Zellen aus BOB.1/OBF.1- und BOB.1/OBF.1xCD22-doppel-defizienten Mäusen mit Hilfe von Ca²⁺-Messungen verglichen.

Milzzellen wurden aus CD22-, BOB.1/OBF.1-, doppel-defizienten und Kontroll-Mäusen isoliert, mit Indo-1 Chelator beladen und mit Mac.1 (makrophagen-spezifisch) und Thy1.2 (T-zellspezifisch) Antikörpern angefärbt. Mac.1^{neg} und Thy1.2^{neg} B-Zellen wurden mit anti-BZR

Antikörper stimuliert und der ausgelöste Ca^{2+} -Strom im FACSsorter gemessen. Wie bereits bekannt, verlief das Ca^{2+} -Signal in $\text{CD22}^{-/-}$ B-Zellen höher und länger im Vergleich zu dem Signal in Kontroll-B-Zellen (Nitschke et al., 1997). Erstmals konnte gezeigt werden, dass in BOB.1/OBF.1-defizienten B-Zellen nach BZR-Stimulation ein kaum messbares Ca^{2+} -Signal ausgelöst wird (**Abb.: 28**). Im Vergleich dazu verlief der Ca^{2+} -Strom in BOB.1/OBF.1xCD22-doppel-defizienten B-Zellen höher als in Kontroll-B-Zellen (**Abb.: 28**). Durch die Ca^{2+} -Messungen wurde deutlich, dass das kaum messbare Ca^{2+} -Signal in BOB.1/OBF.1^{-/-} B-Zellen durch die zusätzliche Deletion von CD22 zu einem erhöhten Signal anstieg.

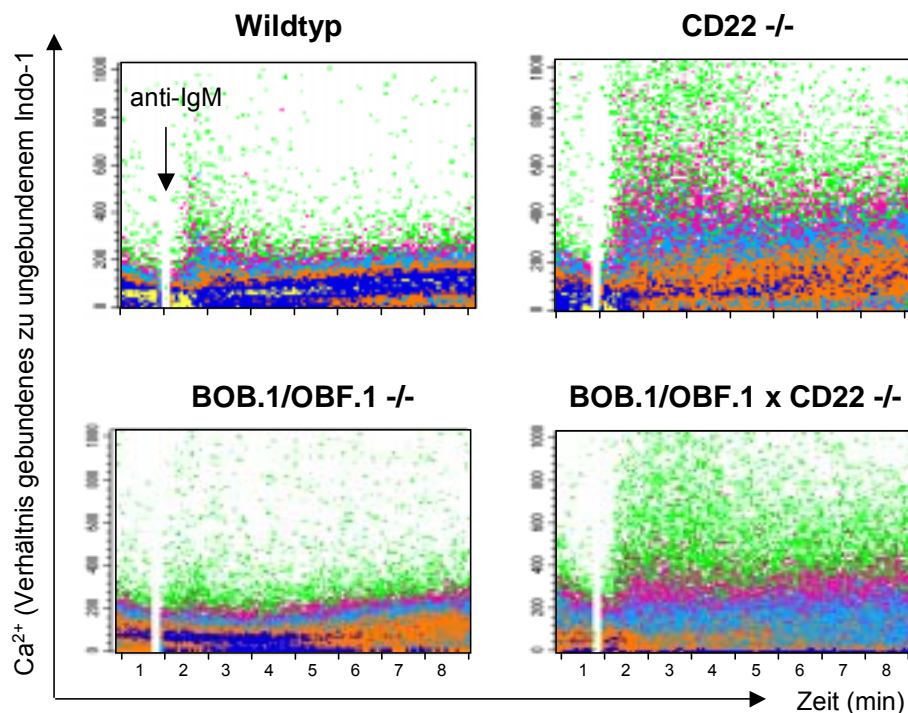


Abbildung 28: **Das Ca^{2+} -Signal in BOB.1/OBF.1 x CD22 doppel-defizienten B-Zellen erreicht mindestens die Höhe von Kontroll-B-Zellen**

Aus den Milzen von BOB.1/OBF.1^{-/-}, CD22^{-/-}, BOB.1/OBF.1xCD22-defizienten und Kontroll-Mäusen wurden Mac.1^{neg} und Thy1.2^{neg} B-Zellen mit 10 µg/ml B7-6 anti-BZR Antikörper stimuliert und der initiierte Ca^{2+} -Strom gemessen. Der Pfeil verdeutlicht den Zeitpunkt der Antikörperzugabe. Das Ca^{2+} -Signal wurde durch das Verhältnis von gebundenem zu ungebundenem Indo-1 (F15/F14) innerhalb der abgebildeten Zelle in Abhängigkeit von der Zeit berechnet. Abgebildet wurde ein repräsentatives von fünf durchgeführten Experimenten, deren Resultate identisch waren.

Auf welche Weise CD22 das BZR-Signal in BOB.1/OBF.1-defizienten B-Zellen beeinflusst, bedarf weiterer Untersuchungen. Allerdings könnte das starke Ca^{2+} -Signal in BOB.1/OBF.1xCD22-defizienten B-Zellen ein Grund für die erhöhte Überlebensrate der transitionellen B-Zelle im Knochenmark und der gestiegenen Zahl an reifen B-Zellen in der Milz sein.

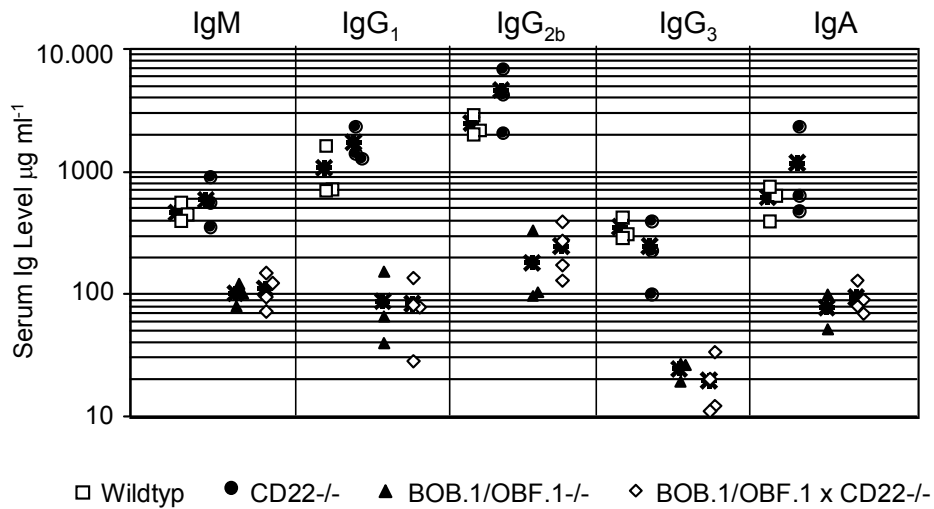
4.3.5 Unveränderte Immuninkompetenz in BOB.1/OBF.1xCD22-doppel-defizienten Mäusen

Für den Co-Aktivator BOB.1/OBF.1 wurde nicht nur während der B-Zellreifung, sondern auch während der Induktion Antigen-abhängiger Immunantworten eine essentielle Funktion beschrieben. In BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen werden keine Keimzentren gebildet, demzufolge kommt es zu keiner Thymus-abhängigen Immunantwort (Schubart et al. 1996, Nielsen et al., 1996, Kim et al., 1996). Es stellte sich die Frage, ob BOB.1/OBF.1xCD22-doppel-defiziente Mäusen in der Lage sind, eine Immunantwort zu induzieren.

Zunächst wurden die basalen Immunglobulinlevel in BOB.1/OBF.1xCD22-doppel-defizienten Mäusen im ELISA bestimmt und mit denen von BOB.1/OBF.1^{-/-}, CD22^{-/-} und Kontroll-Mäusen verglichen. Wie in **Abb.: 29 (A)** ersichtlich, waren die Immunglobulintiter in CD22-defizienten Mäusen vergleichbar mit den Titern in Kontroll-Mäusen. An der vier- bis fünffachen Reduktion der Immunglobuline in BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen war durch die zusätzliche Deletion von CD22 keine Verbesserung in den doppel-defizienten Mäusen feststellbar (**Abb.: 29 (A)**).

Des Weiteren wurde die Thymus-abhängige Immunantwort der BOB.1/OBF.1xCD22-doppel-defizienten Mäuse genauer analysiert. Hierfür wurde Mäusen des jeweiligen Phänotyps an Tag null TNP-Ovalbumin (TNP-OVA) intraperitoneal (i.p.) gespritzt und dieselben nach vierzehn Tagen erneut immunisiert (boost). Den Mäusen wurde vor der Antigeninjektion (d0), nach einer Woche (d7), vor dem Boost (d14) und an Tag 21 (d21) Blut abgenommen. Die Seren wurden auf ihren Gehalt an anti-TNP-spezifischen IgM und IgG₁ Antikörper im ELISA getestet. Die Immunisierung der CD22-defizienten und Kontroll-Mäuse bewirkte eine deutliche IgG₁ Antwort, wohingegen BOB.1/OBF.1-defiziente Mäuse keine primäre und eine schwache sekundäre Immunantwort zeigten. In BOB.1/OBF.1xCD22-doppel-defizienten Mäusen konnte kein Anstieg an anti-TNP-spezifischen IgG₁ Antikörpern gemessen werden (**Abb.: 29 (B)**). Im Gegensatz zu der defekten IgG₁-Antwort wurde in BOB.1/OBF.1- und doppel-defizienten Mäusen eine normale primäre IgM Immunantwort nach TNP-OVA Injektion nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

A



B

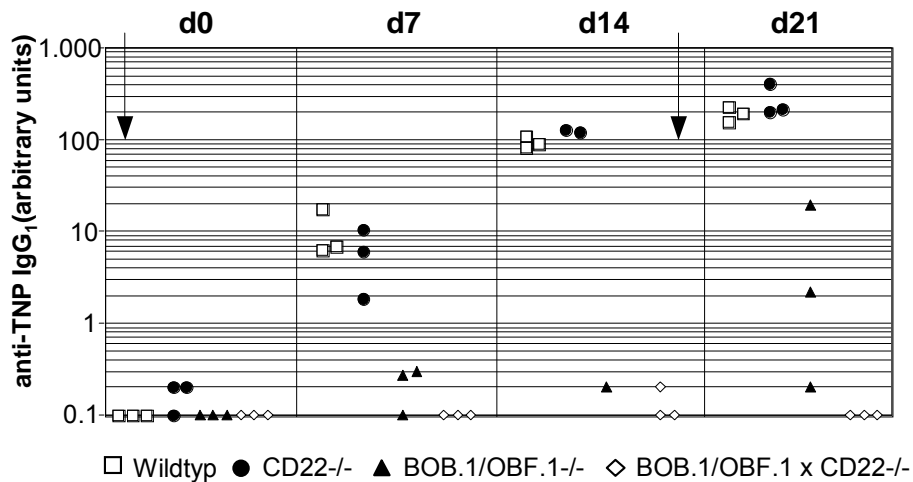
BOB.1/OBF.1^{-/-}

Abbildung 29: **Kaum messbare Immunantworten in BOB.1/OBF.1- und BOB.1/OBF.1xCD22-doppel-defizienten Mäusen**

(A) Seren aus wildtypischen, CD22^{-/-}, BOB.1/OBF.1^{-/-} und doppel-defizienten Mäusen wurden auf den Gehalt an IgM, IgG₁, IgG_{2b}, IgG₃ und IgA im ELISA untersucht. Angegeben wurden die µg isotyp-spezifischen Antikörpers pro ml Serum. Jedes abgebildete Symbol entspricht einem gebluteten Tier (3-4 Mäuse pro Isotyp in einer Genotypgruppe). Der Mittelwert des jeweiligen Isotypes wird durch den Stern verdeutlicht.

(B) Mäuse des jeweiligen Genotyps wurden i.p. mit 10 µg/ml TNP-OVA an Tag d0 und an d14 immunisiert. Geblutet wurden die Mäuse an Tag d0, d7, d14 und d21. Die Immunantwort wurde über die im Serum enthaltenen TNP-spezifischen IgG₁ Antikörper im ELISA bestimmt. Jedes abgebildete Symbol repräsentiert eine immunisierte Maus. Der Pfeil zeigt den Tag der TNP-OVA Injektion an. Für den Tag d14 waren nur die angegebenen Seren verfügbar. Gezeigt wurde ein typisches von zwei durchgeführten Experimenten.

Abschließend wurden die Milzen der mit TNP-OVA immunisierten Mäuse histologisch auf die Bildung von Keimzentren untersucht. In den Follikeln von BOB.1/OBF.1- und BOB.1/OBF.1xCD22-defizienten Mäusen wurden keine PNA-positiven Keimzentren gefunden (Bilder nicht gezeigt, Daten publiziert in Samardzic et al., 2002).

4.3.6 Nach LPS-Stimulation exprimierten CD22-defiziente B-Zellen den Co-Aktivor BOB.1/OBF.1 früher und verstärkt

CD22-defiziente B-Zellen reagieren nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) mit einer doppelt so starken proliferativen Antwort wie Kontroll-B-Zellen (Nitschke et al., 1997; Otipoby et al., 1996). Um diese Reaktion erklären zu können, wurden Transkriptionsfaktoren untersucht, die in der LPS-Signaltransduktionskaskade vorkommen. Unter diesen befand sich auch der transkriptionelle Co-Aktivor BOB.1/OBF.1.

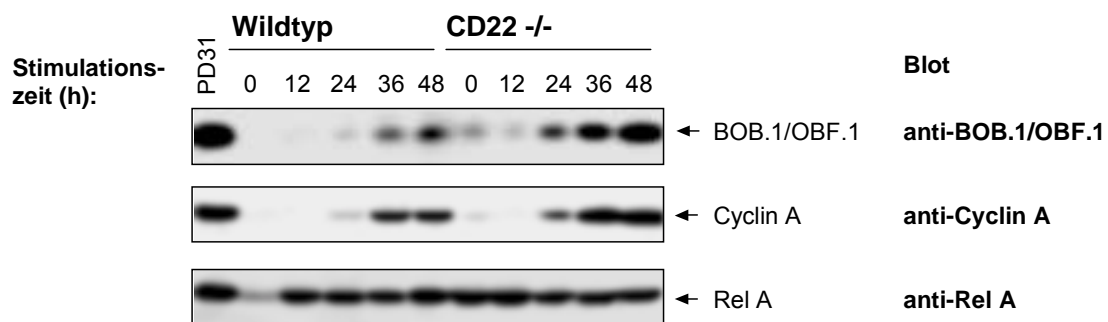


Abbildung 30: LPS-Stimulation induziert eine frühere und höhere BOB.1/OBF.1 Expression in CD22-defizienten B-Zellen

Aufgereinigte B-Zellen aus CD22-defizienten und Kontroll-Mäusen wurden mit 15µg/ml LPS stimuliert. Nach den jeweils angegebenen Zeiten wurde die Proliferation durch Lyse der Zellen beendet. Die Zellysate wurden im SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit anti-BOB.1/OBF.1 und anti-CyclinA Antikörpern (beide Arbeitskreis) angefärbt. Vergleichbare Mengen an Protein wurden geladen, wie aus der RelA Anfärbung (Ladekontrolle) desselben Blots ersichtlich ist. Als Positivkontrolle wurden unstimulierte PD31 Zellen verwendet. Experimente durchgeführt von K.Müller und J. Gerlach.

Aus CD22-defizienten und Kontroll-Mäusen wurden B-Zellen isoliert und für 12, 24, 36 oder 48 Stunden mit LPS stimuliert. Der BOB.1/OBF.1 Proteingehalt in den CD22-defizienten und wildtypischen B-Zellen wurde im Western-Blot mit Hilfe eines BOB.1/OBF.1-spezifischen Antikörpers bestimmt. Wie in **Abb.: 30** gezeigt, konnte in unstimulierten (Zeitpunkt 0h) Kontroll- und CD22^{-/-} B-Zellen eine vergleichbar niedrig Menge an BOB.1/OBF.1 nachgewiesen werden. Ab einer Stimulationszeit von 24 Stunden war in den durchgeführten

Western-Blot Analysen deutlich zu erkennen, dass in CD22-defizienten B-Zellen der Co-Aktivatoren früher und stärker exprimiert wurde als in Kontroll-B-Zellen. Ein weiterer Beweis für die stärkere Proliferation von CD22^{-/-} B-Zellen wurde durch die zusätzliche Antikörperanfärbung desselben Blots mit CyclinA erlangt, das während der Interphase des Zellzyklus eine wichtige Rolle in der Aktivierung der Replikationsmaschinerie übernimmt (**Abb.: 30**).

4.3.7 BOB.1/OBF.1xCD22-doppel-defiziente B-Zellen proliferierten nach LPS-Stimulation vergleichbar stark wie CD22-defiziente B-Zellen

Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben (Kapitel 4.3.6), wurde der Co-Aktivatoren BOB.1/OBF.1 in CD22-defizienten B-Zellen im Vergleich zu Kontroll-B-Zellen früher und höher exprimiert. Um den möglichen funktionellen Zusammenhang von CD22 und BOB.1/OBF.1 in der LPS-Signaltransduktionskaskade zu prüfen, wurde die Teilungsrate von BOB.1/OBF.1-defizienten mit BOB.1/OBF.1xCD22-doppel-defizienten B-Zellen nach LPS-Stimulation verglichen.

Aus den Splenozyten der jeweiligen Mäuse wurden die B-Zellen aufgereinigt und mit den angegebenen Konzentrationen an LPS für 24 Stunden stimuliert. BOB.1/OBF.1-defiziente B-Zellen proliferierten etwa gleich stark wie Kontroll-B-Zellen, wohingegen sich CD22^{-/-} B-Zellen etwa doppelt so schnell teilten. Unerwartet war die Proliferationsrate der BOB.1/OBF.1xCD22^{-/-} B-Zellen. Diese teilten sich so schnell wie CD22-defiziente B-Zellen nach LPS-Gabe (**Abb.: 31**).

Mit diesem Ergebnis wurde deutlich, dass die höhere Expression des Co-Aktivatoren BOB.1/OBF.1 in CD22^{-/-} B-Zellen nach LPS-Stimulation keinen Einfluss auf die Zellteilung hat.

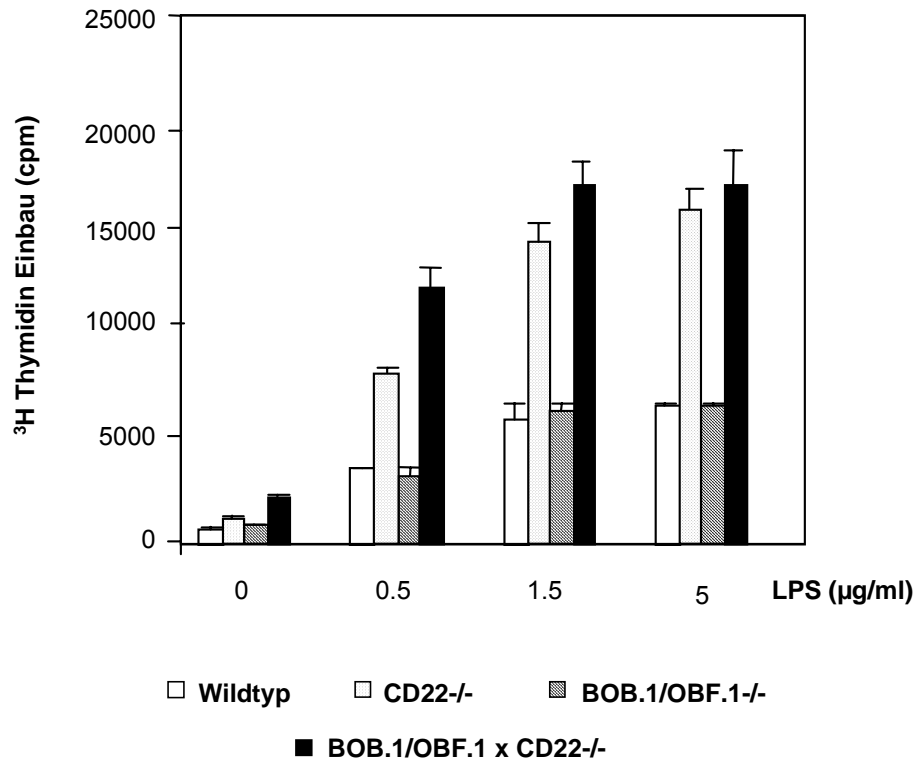


Abbildung 31: **Proliferation von BOB.1/OBF.1xCD22-doppel-defizienten B-Zellen nach LPS-Stimulation**

Nach der T-Zell-vermittelten Lyse wurden die B-Zellen aus CD22^{-/-}, BOB.1/OBF.1^{-/-}, doppel-defizienten und Kontroll-Mäusen auf 96-iger Napfplatten in Triplets verteilt und mit der angegebenen Konzentration an LPS für 24 Stunden stimuliert. Für die letzten 8 Stunden vor Ablauf der Stimulationszeit wurde jedem Napf 1µCi ³H-markiertes Thymidin zupipettiert. Am Harvester (Bio-Rad) wurde der Einbau an ³H-Thymidin gemessen. Abgebildet wurde der Mittelwert der gemessenen Triplets mit entsprechender Standardabweichung. Gezeigt ist ein exemplarisches von drei durchgeführten Experimenten.

5 Diskussion

5.1 Die cytoplasmatische Domäne von CD22

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den für die inhibitorische Wirkung von CD22 auf das BZR-Signal verantwortlichen molekularen Mechanismus zu klären. Daher wurde nach dem Substrat der an CD22 rekrutierten und aktivierten Tyrosin-Phosphatase SHP-1 gesucht. In vergleichenden Analysen von CD22-defizienten und Kontroll-B-Zellen wurde gezeigt, dass das Adapterprotein SLP-65/BLNK in CD22-defizienten B-Zellen nach BZR-Stimulation früher und stärker Tyrosin-phosphoryliert vorliegt.

Transfektionsexperimente mit der CD22-defizienten Plasmazytom-Zelllinie J558L μ m3 wurden begonnen, um den Mechanismus der inhibitorischen Wirkung der Phosphatase SHP-1 auf das Adapterprotein SLP-65/BLNK aufzuklären. Die Expression von CD22, einer dominant-negativen Variante von SHP-1 und/oder CD22-Mutanten in J558L μ m3 Zellen sollte die direkte oder indirekte dephosphorylierende Aktivität von SHP-1 aufzeigen. Während der Analyse der CD22-positiven Transfektanten wurde deutlich, dass die Adhäsionsdomäne von CD22 einen direkten Einfluss auf die inhibitorische Funktion von CD22 hat. Nach zusätzlicher Transfektion der J558L μ m3 Zellen mit dem Expressionsvektor für Sialinsäuretransferase wurde die inhibitorische Wirkung von CD22 auf das Adapterprotein bestätigt. Allerdings mussten diese Resultate auf Grund von unerwarteten Ergebnissen mit einer Negativkontrolle in Frage gestellt werden.

Um den Zusammenhang zwischen SLP-65/BLNK und CD22 zu bestätigen, wurden SLP-65- und CD22-knock out Mäuse gekreuzt. Die Charakterisierung der CD22xSLP-65-doppel-defizienten Mäuse zeigte unter anderem, dass in den doppel-defizienten B-Zellen nach BZR-Stimulation ein deutliches Ca²⁺-Signal induziert wird. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die an CD22 rekrutierte und aktivierte Phosphatase SHP-1 neben SLP-65/BLNK noch weitere Substrate in der BZR-Signalkaskade hat.

5.1.1 SLP-65/BLNK: ein Substrat der Phosphatase SHP-1

Aus CD22-defizienten B-Zellen präzipitiertes SLP-65/BLNK erreichte nach 10-30 Sekunden BZR-Stimulation die maximale Tyrosin-Phosphorylierung. Im Vergleich dazu war in Kontroll-B-Zellen das Adaptermolekül erst nach 3-5 Minuten BZR-Stimulation maximal Tyrosin-phosphoryliert.

In CD22-defizienten B-Zellen verläuft der extrazelluläre Ca^{2+} -Einstrom nach BZR-Stimulation stärker und verlängert im Vergleich zu Kontroll-B-Zellen (O'Keefe et al., 1996; Otipoby et al., 1996; Sato et al., 1996; Nitschke et al., 1997). Um diese Hyperreaktivität reifer CD22-defizienten B-Zellen erklären zu können, wurden potentielle Substrate der an CD22 rekrutierten und aktivierten Phosphatase SHP-1 in der proximalen BZR-Signalkaskade untersucht. Wir erwarteten, dass durch das Fehlen der Anlagerungsstellen von SHP-1 in CD22-defizienten B-Zellen die dephosphorylierende Aktivität der Phosphatase nicht mehr auf das BZR-Signal gerichtet sei. Daher sollte das Substrat der Phosphatase in CD22-defizienten B-Lymphozyten stärker Tyrosin-phosphoryliert sein als in Kontroll-B-Zellen. Als Substrate kommen jene Signalmoleküle in Frage, für die eine Funktion in der Ca^{2+} -Mobilisation nachgewiesen werden konnte. Durch die gezielte Inaktivierung von Genen verschiedener Signalmoleküle („knock-out“) in Mäusen oder Zelllinien ist es möglich, deren Funktion in der BZR-Signalkaskade zu charakterisieren. Beispielsweise kann in Syk- und $\text{PLC}\gamma 2$ -defizienten DT40 Hühnchen Zellen keine Ca^{2+} -Mobilisierung induziert werden (Takata et al., 1994). Auch in SLP-65/BLNK-defizienten B-Zellen wird nach BZR-Stimulation kein Ca^{2+} ausgeschüttet (Jumaa et al., 1999; Pappu et al., 1999). Dagegen führt die Deletion von Lyn und die Inaktivierung von SHP-1 zu einem verstärkten Ca^{2+} -Signal, das mit jenem in CD22-defizienten B-Zellen vergleichbar ist (Hibbs et al., 1995; Nishizumi et al., 1995; Chan VWF et al., 1997; Pani et al., 1995; Cyster et al., 1995).

Von Nitschke et al. (1997) konnte kein offensichtlicher Unterschied in der Tyrosin-Phosphorylierung eines Signalproteins nach BZR-Stimulation von CD22-defizienten und Kontroll-B-Zellen nachgewiesen werden. In vergleichenden Analysen wurde der Tyrosin-Phosphorylierungsgrad der proximalen Signalmoleküle Lyn, $\text{PLC}\gamma 2$, Btk und Vav-1 durch Immunpräzipitation aus CD22-defizienten und Kontroll-B-Zellen nach BZR-Stimulation untersucht (Diplomarbeit, Gerlach 1998). Wir konnten keinen Unterschied in der Tyrosin-Phosphorylierung der präzipitierten Signalmoleküle zwischen CD22-defizienten und Kontroll-B-Zellen nach Stimulation feststellen. Im Gegensatz dazu zeigten Sato et al. (1997) eine erhöhte Tyrosin-Phosphorylierung des Guanosin-Austauschfaktors Vav in CD22-defizienten B-Zellen nach BZR-Stimulation. Des Weiteren wiesen Fujimoto et al. (1999) eine gestiegenen Tyrosin-Phosphorylierung des aktivierenden Co-Rezeptors CD19 in CD22-defizienten B-Zellen nach. Die aktivierende Wirkung von CD19 und inhibierende Wirkung von CD22 auf das BZR Signal wurde durch die Analyse der knock-out Mäuse bestätigt (Engel et al., 1995; Rickert et al., 1995). Während CD19 nach BZR-Stimulation oder CD19-Ligation über Vav und PI3K das Ca^{2+} -Signal und die Aktivierung des MAP-Kinase Signalwegs einleitet, soll CD22, entsprechend den Daten von Sato et al. (1997) und Fujimoto et al. (1999), dies durch die dephosphorylierende Aktivität von SHP-1 an Vav oder sogar an CD19 direkt inhibieren.

Tooze et al. (1997) hatten eine inhibitorische Wirkung von CD22 auf die MAPK-Familie aufgezeigt. Angezweifelt wurden diese Resultate von Poe et al. (2000), die ausschließlich eine niedrigere Tyrosin-Phosphorylierung von JNK2 in CD22-defizienten B-Zellen nachweisen konnten. Otipoby et al. (2001) fanden eine erhöhte Phosphorylierung von ERK1/2 und JNK, wohingegen p38 in CD22-defizienten B-Zellen nach BZR-Stimulation niedriger phosphoryliert war. Zusammenfassend schlugen Otipoby et al. (2001) vor, dass CD22 keinen relevanten inhibitorischen Einfluss auf den MAP-Kinase Signalweg habe. Ob und auf welche Weise die positiv wirkenden Signalmoleküle an CD22 die Aktivierung des MAP-Kinase Signalwegs unterstützen, ist Gegenstand intensiver Forschung. Durch „substrate trapping“ Experimente fanden Blasioli et al. (1999) heraus, dass das erste Tyrosin in der cytoplasmatischen Domäne von CD22 ein Angriffspunkt der Phosphatase SHP-1 ist. So könnte die aktivierte Phosphatase die Anlagerung der positiv wirkenden Signalmoleküle beeinflussen. In unseren vergleichenden Analysen fanden wir in CD22-defizienten B-Zellen bisher ausschließlich das Adaptermolekül SLP-65 (auch BLNK oder BASH genannt) nach BZR-Stimulation früher und stärker Tyrosin-phosphoryliert als in Kontroll-B-Zellen.

SLP-65/BLNK übernimmt in der BZR-Signaltransduktionskaskade eine zentrale Rolle. Voraussetzung für die Funktion des Adaptermoleküls ist dessen Phosphorylierung nach BZR-Stimulation durch die aktivierte Kinase Syk. Daraufhin werden an die SH2-Bindungsmotive von SLP-65/BLNK die Signalmoleküle PLC γ 2, Btk, Vav und Nck rekrutiert. Das Adaptermolekül Grb2 ist konstitutiv an SLP-65/BLNK gebunden (Wienands et al., 1998; Fu et al., 1998). Wie Ishiai et al. (1999) in DT40 Zellen zeigten, ist die Voraussetzung für die Entstehung eines Ca²⁺-Signals nach BZR-Stimulation sowohl die Rekrutierung der Lipase in den BZR-Signalkomplex, als auch die Lokalisation von PLC γ 2 an die Zellmembran. Beide Aufgaben werden von SLP-65/BLNK erfüllt. Durch die direkte Assoziation von Syk, Btk und PLC γ 2 an SLP-65/BLNK wird die Phosphorylierung der Lipase ermöglicht. Fehlt die N-terminale SH2-Domäne von PLC γ 2, mit der PLC γ 2 an SLP-65/BLNK bindet, bleibt die Phosphorylierung der Lipase aus (Ishiai et al., 1999). Ob hauptsächlich Syk oder Btk für die Aktivierung von PLC γ 2 verantwortlich ist, wird in der Literatur unterschiedlich diskutiert (Rodriguez et al., 2001; Hashimoto et al., 1999). SLP-65/BLNK ist außerdem noch verantwortlich für die Lokalisation des Multiproteinkomplexes an die Zellmembran. Sowohl die Substrate der aktivierten Lipase, als auch die Interaktionspartner der assoziierten Moleküle Grb2, SoS und Vav sind in der Zellmembran eingelagert. In T-Zellen wird der Multiproteinkomplex über das T-Zelläquivalent SLP-76 an Gads und LAT (**G**rb2-related **A**daptor **D**ownstream of **S**hc und **L**inker for Activation of **T**-cells, Asada et al., 1999; Lui et al., 1999; Zhang et al., 1998; Liu et al., 1999) gebunden. Das LAT-Homolog wurde in B-Zellen von zwei Gruppen identifiziert. Allerdings binden das von Brdicka et al. (2002)

charakterisierte Molekül NTAL (**N**on **T**-cell **A**ctivation **L**inker) und das von Janssen et al (2003) beschriebene LAB (**L**inker for **A**ctivation of **B**-Cells) weder PLC γ 2, noch SLP65/BLNK. Offensichtlich unterscheidet sich an diesem Punkt die Rekrutierung der Signalmoleküle in die Mikrodomänen zwischen T- und B-Zellen. Die Ergebnisse von Engels et al. (2001) und Kabak et al. (2002) deuten auf eine mögliche Situation in B-Zellen hin. Nach BZR-Stimulation werden die Tyrosine in der cytoplasmatischen Domäne von Ig α von Src-Kinasen phosphoryliert. Syk wird durch die Bindung an die Tyrosine in dem ITAM von Ig α aktiviert. In der cytoplasmatischen Domäne von Ig α befinden sich außerhalb des ITAM zwei weitere Tyrosine. An das phosphorylierte Tyrosin204 scheint SLP-65/BLNK zu binden. Das Adaptermolekül wäre somit in der unmittelbaren Nähe von Syk, der Kinase, die SLP-65/BLNK phosphoryliert. Formierte sich der BZR-Signalkomplex tatsächlich an Ig α , wäre sowohl die Aktivierung des Signals, als auch die Lokalisation in Membrannähe gewährleistet. Als Substrate der an CD22-aktivierten Phosphatase SHP-1 kommen theoretisch Syk, SLP-65/BLNK, Btk, PLC γ 2 und auch Ig α in Frage. Von Sato et al. (1997) wurde neben der gestiegenen Tyrosin-Phosphorylierung von Vav eine reduzierte Phosphorylierung von Ig α /Ig β und PLC γ 2 in CD22-defizienten B-Zellen nach BZR-Stimulation beschrieben. Allerdings konnten wir weder die deutlich reduzierte Tyrosin-Phosphorylierung der beschriebenen Proteine in CD22-defizienten B-Zellen, noch die gestiegene Phosphorylierung von Vav nach Stimulation reproduzieren. Daher sollte die Tyrosin-Phosphorylierung von Ig α und Syk von uns abermals untersucht werden.

In CD22-defizienten B-Zellen ist SLP-65/BLNK nach BZR-Stimulation höher Tyrosin-phosphoryliert. Anhand dieses Ergebnisses kann nicht eindeutig geklärt werden, ob das Adaptermolekül ein direktes oder indirektes Substrat der Phosphatase SHP-1 ist. Von Chiu et al. (2002) wurde gezeigt, dass Tyrosin-phosphoryliertes SLP-65/BLNK drei potentielle PLC γ 2 Bindungsstellen aufweist. Die Bindung von bis zu drei PLC γ 2 Molekülen würde das initiierte BZR-Signal um ein Vielfaches amplifizieren. Der inhibitorische Einfluss von CD22 wäre daher am effektivsten, würde SHP-1 die Kinase Syk oder das Adapterprotein SLP-65/BLNK dephosphorylieren. Die Inaktivierung von Syk würde die Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK minimieren und dadurch die Interaktion mit PLC γ 2 unterbrechen. Dies würde bedeuten, dass in CD22-defizienten B-Zellen sowohl Syk als auch SLP-65/BLNK hyperphosphoryliert wären. Die direkte Dephosphorylierung von SLP-65/BLNK würde die Anlagerung von PLC γ 2 verhindern, wodurch das BZR-Signal in Kontroll-B-Zellen reguliert würde. Fällt die inhibitorische Wirkung von CD22 entsprechend der Situation in CD22-defizienten B-Zellen weg, wäre SLP-65/BLNK hyperphosphoryliert und das Ca²⁺-Signal erhöht. Nachdem wir die erhöhte Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK in CD22-defizienten B-Zellen bereits nachgewiesen haben, sollte die Phosphorylierung und Aktivität

von Syk untersucht werden. Uns standen keine funktionierenden anti-Syk Antikörper zur Verfügung, um den Aktivierungsgrad der Kinase in CD22-defizienten und Kontroll-B-Zellen zu vergleichen. Obwohl Sato et al. (1997) in CD22-defizienten B-Zellen keinen Unterschied in der Tyrosin-Phosphorylierung von Syk nachweisen konnten, sollte der Phosphorylierungsgrad der Kinase Syk in CD22-defizienten B-Zellen in unserem System überprüft werden.

Eine weitere Möglichkeit, den Zusammenhang zwischen SLP-65/BLNK und SHP-1 zu klären, wäre die genaue Analyse der potentiellen Angriffspunkte der Phosphatase an dem Adaptermolekül. Chiu et al. (2002) zeigten, dass nach BZR-Stimulation die 5 Tyrosine innerhalb der N-terminalen Domäne von SLP-65/BLNK phosphoryliert werden. Daraufhin formiert sich ein multimerer Proteinkomplex, in dem die Signalmoleküle mit enzymatischer Aktivität, wie PLC γ 2, Vav und Btk, in direkten Kontakt mit weiteren Adaptermolekülen, wie Grb2 und Nck, liegen. Jedes der interagierenden Signalmoleküle erkennt sein spezifisches Bindungsmotiv. Durch die Substitution von nur einem Tyrosin, an das eines der drei PLC γ 2 Moleküle binden kann, sinkt das Ca²⁺-Signal signifikant (Chiu et al.; 2002). Die Wirkungsweise von CD22 auf die BZR-Signalkaskade wäre eindeutig geklärt, könnten wir nachweisen, dass die Phosphatase SHP-1 spezifisch die PLC γ 2-Bindungsmotive dephosphoryliert. Dazu würden phosphospezifische anti-SLP-65/BLNK Antikörper benötigt. In vergleichenden Analysen der Ganzzelllysate aus CD22^{-/-} und Kontroll-B-Zellen könnten dann die einzelnen phosphorylierten Tyrosine von SLP-65/BLNK verglichen werden. Wäre SLP-65/BLNK ein direktes Substrat der an CD22 aktivierten Phosphatase, würden wir erwarten, dass die PLC γ 2 Bindungsmotive von SLP-65/BLNK in CD22-defizienten B-Zellen stärker Tyrosin-phosphoryliert sind.

Entscheidend für die inhibierende Wirkung von CD22 auf das BZR-Signal ist auch der Zeitpunkt, an dem SHP-1 in das BZR-Signal eingreift. Wienands et al. (1998) identifizierten SLP-65 als eines der am frühesten Tyrosin-phosphorylierten Signalmoleküle in J558L μ m3 Zellen nach Stimulation mit Per-Vanadat. Bereits nach 10 Sekunden Stimulation liegt das Adapterprotein Tyrosin-phosphoryliert vor. Mit Dauer der Stimulation steigt die Phosphorylierung von SLP-65/BLNK an und erreicht je nach verwendetem Zellsystem das Phosphorylierungsmaximum nach 3-10 Minuten BZR-Stimulation (Wienands et al., 1998; Fu et al., 1998). Die Tyrosin-Phosphorylierung von CD22 ist ebenfalls von der Kreuzvernetzung der BZRs abhängig. Bereits 10-30 Sekunden nach BZR-Stimulation ist CD22 Tyrosin-phosphoryliert und erreicht das Maximum nach etwa 3 Minuten Stimulation (eigene Daten und LePrince et al., 1993; Schulte et al., 1992; Peaker et al., 1993). Die von uns gezeigte Hyperphosphorylierung von SLP-65/BLNK in CD22-defizienten B-Zellen konnte

ausschließlich 10-30 Sekunden nach BZR-Stimulation nachgewiesen werden. Je länger die BZR-Stimulation anhält, um so mehr gleicht sich das Phosphorylierungsmuster von SLP-65/BLNK in CD22-defizienten und Kontroll-B-Zellen an. Im Laufe der BZR-Stimulation verliert CD22 seinen inhibitorischen Einfluss auf SLP-65/BLNK. Möglicherweise wird durch die inhibierende Wirkung von CD22 auf die initialen Schritte des BZR-Signals entschieden, ob die Antigen-Bindung für ein aktivierendes BZR-Signal ausreicht. Handelt es sich um ein niedrig affines und avides Antigen, wird das BZR-Signal zu diesem frühen Zeitpunkt von CD22 unterdrückt. Wohingegen die Wirkung von CD22 nach Bindung eines hoch affinen Antigens zu schwach ist. Die B-Zelle wird aktiviert.

5.1.2 Transfektionsstudien der Plasmazytom-Zelllinie J558L μ m3

In CD22-defizienten B-Zellen hatten wir nach BZR-Stimulation eine frühere und höhere Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK beobachtet. Mit den beschriebenen Ergebnissen konnte der direkte Bezug zwischen CD22, der Phosphatase SHP-1 und der Adaptermolekül SLP-65/BLNK zwar vermutet, aber nicht bewiesen werden. Um den molekulare Mechanismus zu untersuchen, der zur erhöhten Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK in CD22-defizienten B-Zellen führt, wurden Transfektionsexperimente mit der Plasmazytom-Zelllinie J558L μ m3 begonnen. In die CD22-defizienten J558L μ m3 Zellen wurden die Expressionsvektoren codierend für CD22 und/oder für eine dominant-negative Variante von SHP-1 (SHPc/s) transfiziert. Das exogene CD22 sollte die endogene Phosphatase SHP-1 rekrutieren, aktivieren und SLP-65/BLNK dephosphorylieren. Mit Hilfe der SHPc/s-CD22-Doppeltransfektanten sollte die endogene Phosphatase verdrängt und die Phosphorylierung von SLP-65/BLNK erhöht bleiben. Der direkte Bezug von CD22 und SHP-1 sollte durch die Transfektion mit der ITIM-Mutante von CD22, an die SHP-1 nicht mehr binden kann, bewiesen werden. In dieser J558L μ m3 Transfektante erwarteten wir eine höhere Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK.

In ersten Stimulationsexperimenten von CD22- und SHP-1c/s-transfizierten J558L μ m3 Zellen und primären B-Zellen war ein vergleichbares Tyrosin-Phosphorylierungsmuster der Zellen nachweisbar. Auch konnte nach Stimulation der CD22- und SHPc/s-CD22-Doppeltransfektanten SHP-1 mit CD22 co-präzipitiert werden. Entsprechend der Situation in primären B-Zellen steigt mit Dauer der Stimulation die Phosphorylierung von CD22 und die Menge an assoziiertem SHP-1 an. Nach Stimulation scheinen die transfizierten J558L μ m3 Zellen das BZR-Signal vergleichbar mit primären B-Zellen zu initiieren. Entgegen unseren

Erwartungen zeigte die Analyse der CD22-transfizierten J558L μ m3 Klone, dass SLP-65/BLNK in den CD22-positiven J558L μ m3 Zellen stärker als in untransfizierten J558L μ m3 Zellen Tyrosin-phosphoryliert ist. In den J558L μ m3 Klonen war die Expressionshöhe von CD22 nicht mit dem Phosphorylierungsgrad von SLP-65/BLNK korrelierbar. Um das Zellsystem der Situation in primären B-Zellen weiter anzupassen, wurde in die J558L μ m3 Zellen der Expressionsvektor codierende für Sialinsäuretransferase (ST6Gal1) transfiziert. In FACS-Analysen konnte der spezifische Ligand von CD22, alpha2,6-verknüpfte Sialinsäure, auf der Oberfläche nachgewiesen werden. Wie in primären B-Zellen lag CD22 auf der Oberfläche von ST6Gal1-CD22-Doppeltransfektanten maskiert vor. In 75% der stimulierten Doppeltransfektanten war SLP-65/BLNK geringer phosphoryliert, als in untransfizierten J558L μ m3 Zellen. Allerdings wurde diese Reduktion der SLP-65/BLNK Tyrosin-Phosphorylierung auch in den ST6Gal1-CD22R130E-Doppeltransfektanten nachgewiesen. Da diese R130E Mutation in der Adhäsionsdomäne von CD22 die Interaktion mit dem alpha2,6 Sialinsäure-tragenden Liganden verhindert, muss die inhibitorische Wirkung von CD22 auf SLP-65/BLNK in diesem Zellsystem in Frage gestellt werden.

Etwa zeitgleich mit unseren Transfektionsexperimenten benutzten Adachi et al. (2001) die Plasmazytom-Zelllinie J558L μ m3 zur Untersuchung der inhibitorischen Wirkung von CD72 auf das BZR-Signal. CD72 wird auf B-Zellen, Dendritischen Zellen (DZ), Makrophagen und Subpopulationen von T-Zellen exprimiert (Kumanogoh und Kikutani, 2001) und liegt als Homodimer auf der Zelloberfläche vor (Nomura et al., 1996). In der cytoplasmatischen Domäne von CD72 befinden sich zwei ITIM-Motive, deren Tyrosine nach mlg-Kreuzvernetzung phosphoryliert werden und an die daraufhin die Phosphatase SHP-1 bindet (Wu et al., 1998; Adachi et al., 1998). Der relativ milde inhibitorische Einfluss von CD72 auf das BZR-Signal wurde in B-Zellen aus CD72 knock-out Mäusen bestätigt (Pan et al., 1999). Nach Antigen-Stimulation der J558L μ m3 Zellen, die mit CD72 transfiziert worden waren, konnten Adachi et al. (2001) eine verringerte Tyrosin-Phosphorylierung von Ig α /Ig β , Syk und SLP-65/BLNK zeigen. Die Phosphorylierung der Substrate wurde durch die zusätzliche Transfektion der CD72-positiven J558L μ m3 Zellen mit der dominant-negativen Variante von SHP-1 wieder hergestellt. Auch wurde kein Unterschied in der Tyrosin-Phosphorylierung von Ig α /Ig β , Syk und SLP-65/BLNK zwischen untransfizierten und J558L μ m3 Zellen gefunden, die mit dem Expressionsvektor für die inaktive CD72-ITIM Mutante transfiziert worden waren. Wie Adachi et al. (2001) durch SHP-1 Immunpräzipitationen zeigten, war das transfizierte CD72 der einzige Interaktionspartner von endogenem und exogenem SHP-1.

Ein deutlicher Unterschied zwischen CD22 und CD72 ist die Liganden-Bindung. Der Ligand von CD72 ist CD100, ein Transmembranprotein der Semaphorin-Familie (Kumanogoh et al.,

2000). Die Interaktion beider Moleküle führt zur Dephosphorylierung von CD72 und der Dissoziation von SHP-1. Diese Daten weisen daraufhin, dass durch die Interaktion von CD72 mit CD100 die negative Wirkung von CD72 aufgehoben und dadurch die Aktivierung der B-Zelle verstärkt wird (Kumanogoh et al., 2000). Im Gegensatz dazu ist die Liganden-Bindung von CD22 Voraussetzung für die inhibitorische Wirkung von CD22 auf das BZR-Signal (Kelm et al., 2002; Jin et al., 2002). Aus diesem Grund konnte in den CD22-Einzeltransfektanten kein inhibitorischer Effekt von CD22 auf das Adaptermolekül nachgewiesen werden. Durch die zusätzliche Transfektion der J558L μ m3 Zellen mit dem Expressionsvektor für ST6Gal1 wurden die Oberflächenmoleküle mit alpha2,6 Sialinsäure modifiziert. Entsprechend der Situation in primären B-Zellen war CD22 auf der Zelloberfläche der ST6Gal1-CD22-Doppeltransfektanten maskiert. Im Gegensatz dazu konnte CD22 auf den ST6Gal1-R130E-Doppeltransfektanten weder vor noch nach Sialidase Behandlung mit der CD22-spezifischen NeuGc-PAA-Probe angefärbt werden. Wie erwartet, ist die Liganden-Bindung von CD22 durch die Substitution des Arginin130 unmöglich (van der Merwe et al., 1995). In 75% der analysierten ST6Gal1-CD22-positiven Klone konnte eine inhibierende Wirkung von CD22 auf das Adapterprotein bestätigt werden. Ein mögliche Erklärung für die nicht 100%-ige dephosphorylierende Aktivität von SHP-1 an SLP-65/BLNK könnte die niedrig Expression von CD22 auf den J558L μ m3 Zellen sein. In den vergleichenden Analysen von J558L μ m3 Transfektanten und primären B-Zellen wird deutlich, dass die Menge an CD22 auf der Oberfläche der Transfektanten um ein Vielfaches geringer ist als auf primären B-Zellen. Trotz wiederholter Transfektionen konnte die Expression von CD22 in J558L μ m3 Zellen nicht deutlich erhöht werden. Eine weiterer Grund für das Ausbleiben der dephosphorylierenden Aktivität in einzelnen ST6Gal1-CD22-positiven Klone könnte sein, dass der Sialylierungsgrad auf den Klonen zu gering ist. Zwar wurden alle Klone auf die Expression von alpha2,6 Sialinsäure auf der Oberfläche getestet, aber möglicherweise ist die nachgewiesene Menge an Sialinsäure in manchen Fällen nicht ausreichend.

Zu klären bleibt, aus welchem Grund auch in den ST6Gal1-R130E-Doppeltransfektanten die inhibitorische Wirkung von CD22 auf das Adaptermolekül nachweisbar ist. Aufgrund der R130E-Substitution kann CD22 auf der Oberfläche dieser Transfektanten nicht mit Liganden interagieren, d.h. das R130E-CD22 sollte ähnlich verteilt vorliegen wie CD22 auf den CD22-Einzeltransfektanten. Bisher konnte die Frage nach dem spezifischen Liganden von CD22 noch nicht geklärt werden. Bakker et al. (2002) zeigten, dass CD22 unabhängig vom Proteingerüst alpha2,6 Sialinsäure-tragende Liganden bindet. Um welche Liganden könnte es sich im Fall der J558L μ m3 Plasmazytom-Zellen handeln? Auf Plasmazellen wird die Expression sämtlicher Oberflächenmoleküle, wie CD19, CD20, CD45, CD72, usw. herunterreguliert. Co-Rezeptoren und „accessory molecules“, die in reifen B-Zellen das BZR-

Signal modulieren, fehlen auf den J558L μ m3 Zellen. Welche Oberflächenmoleküle auf den J558L μ m3 Zellen exprimiert werden, ist nicht bekannt. Findet in den J558L μ m3 Zellen die Sialylierung der Oberflächenmoleküle wie in primären B-Zellen statt, sind die wahrscheinlich einzigen Interaktionspartner für das transfizierte CD22 der BZR-Komplex und CD22 selber. Im Fall der ST6Gal1-CD22-Doppeltransfektanten würde dieser Umstand einen Großteil von CD22 an den BZR-Komplex rekrutieren und die Phosphatase SHP-1 in der Nähe des Substrates lokalisieren. Wohingegen auf den ST6Gal1-R130E- Doppelmutanten CD22 willkürlich verteilt sein sollte, wodurch die dephosphorylierende Wirkung von SHP-1 nicht auf das BZR-Signal gerichtet ist. Eine Erklärung für die inhibitorische Wirkung von R130E-CD22 in den Doppeltransfektanten könnte sein, dass das mutierte CD22 unabhängig von der Adhäsionsdomäne am BZR-Komplex lokalisiert ist. Ein Grund dafür wäre, dass die Interaktion mit potentiellen Liganden fehlt, die CD22 vom BZR-Komplex wegrecrutieren könnten. Mit Hilfe von Fluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen könnte die Lokalisation von CD22 auf den transfizierten J558L μ m3 Zellen bestimmt werden. Durch die Anfärbung von CD22 auf den Zellen könnte der Unterschied in der Lokalisation von wildtypischen CD22 und mutiertem CD22 unterschieden werden.

Unabhängig von CD22 wurden von einigen Gruppen Substrate von SHP-1 innerhalb der BZR-Signalkaskade beschrieben. Minzuno et al. (2000 und 2002) bestätigten das Adaptermolekül SLP-65/BLNK als Substrat von SHP-1 in „substrate trapping“ Experimenten mit der dominant-negativen Variante von SHP-1 (SHP-1c/s). In WEHI-231 B-Zellen, in denen SHP-1c/s exprimiert wird, interagiert die Phosphatase mit dem Tyrosin-phosphorylierten Adaptermolekül. Mit Hilfe von in vitro Kinase Tests konnten Minzuno et al. (2000) die Hyperphosphorylierung von SLP-65/BLNK durch eine erhöhte Lyn oder Syk Aktivität ausschließen. Allerdings wurde von Dustin et al. (1999) eine direkte Interaktion von Syk mit SHP-1 beschrieben. In Transfektionsexperimenten mit der B-Zelllinie K46, in der SHP-1c/s exprimiert wurde, war Syk hyperphosphoryliert und hyperaktiv. Aus primären B-Zellen konnte nach Per-Vanadat Stimulation Syk mit SHP-1 co-präzipitiert werden (Dustin et al., 1999). Syk übernimmt eine entscheidende Aufgabe in der Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK und der Aktivierung der Lipase PLC γ 2 (Rodriguez et al., 2001; Hashimoto et al., 1999; Chiu et al., 2002). Würde SHP-1 die Kinase Syk dephosphorylieren, wäre auch die Phosphorylierung des Adaptermoleküls unterbrochen. In CD22-defizienten B-Zellen würde dann eine stärkere Tyrosin-Phosphorylierung von Syk und auch von SLP-65/BLNK nachweisbar sein. Wie bereits erwähnt, fehlten uns bisher die spezifischen Antikörper, um den Aktivierungszustand von Syk in CD22-defizienten B-Zellen zu überprüfen. Des weiteren wurde eine direkte Interaktion von SHP-1 mit der Src-Kinase Lyn beschrieben (Somani et al.,

2001). Allerdings konnten wir in CD22-defizienten B-Zellen keine stärkere Phosphorylierung und Aktivität von Lyn nachweisen (Diplomarbeit, Gerlach 1998).

Anhand der durchgeführten Experimente und erhaltenen Daten kann noch nicht geklärt werden, ob das Adaptermolekül SLP-65/BLNK ein direktes oder indirektes Substrat der an CD22 aktivierten Phosphatase SHP-1 ist. Daher sollten die Transfektionsexperimente in einer anderen, CD22-defizienten B-Zelllinie wiederholt werden. Jin et al. (2002) etablierten die Zelllinie J2-44 aus einer CD22-defizienten Maus. Diese scheint für die Transfektionsexperimente besser geeignet zu sein, da mehr Parameter den Bedingungen in reifen B-Zellen entsprechen.

5.1.3 Charakterisierung CD22 x SLP-65- doppel-defizienter Mäuse

Nach BZR-Stimulation CD22-defizienter B-Zellen verläuft das Ca^{2+} -Signal höher und länger als in Kontroll-B-Zellen (O'Keefe et al., 1996; Otipoby et al., 1996; Sato et al., 1996; Nitschke et al., 1997). Dagegen wird in SLP-65-defizienten B-Zellen ein kaum messbarer Ca^{2+} -Strom induziert (Jumaa et al., 1999). CD22- und SLP-65-knock out Mäuse wurden gekreuzt, um die Wirkung von CD22 auf das Adaptermolekül zu überprüfen. In CD22xSLP-65-doppel-defizienten B-Zellen wird nach BZR-Stimulation ein deutliches Ca^{2+} -Signal initiiert. Um herauszufinden, in wie weit die Auswirkungen der Deletion des Aktivators SLP-65/BLNK über die zusätzliche Deletion des Inhibitors CD22 dominiert, wurden B-Zellentwicklung und Immunkompetenz in den doppel-defizienten Mäusen und abschließend die Proliferation der doppel-defizienten B-Zellen untersucht.

Die dephosphorylierende Aktivität der an CD22 rekrutierten und aktivierten Tyrosin-Phosphatase SHP-1 inhibiert das BZR-Signal (Doody et al., 1995). In CD22-defizienten B-Zellen konnte eine frühere und stärkere Tyrosin-Phosphorylierung des Adaptermoleküls SLP-65/BLNK nach BZR-Stimulation gezeigt werden (vgl. Kapitel 4.1.1). Um SLP-65/BLNK als Substrat der an CD22 aktivierten Phosphatase SHP-1 zu bestätigen, wurde die Ca^{2+} -Mobilisierung in CD22xSLP-65-doppel-defizienten B-Zellen untersucht. Wäre SLP-65/BLNK das ausschließliche Substrat des an CD22 aktivierten SHP-1, dann sollte in den doppel-defizienten B-Zellen das defekte Ca^{2+} -Signal der SLP-65-defizienten B-Zellen dominant sein. Wäre dagegen SLP-65/BLNK ein indirektes Substrat von CD22, oder würden die Signalwege von CD22 und SLP-65/BLNK unabhängig voneinander verlaufen, wäre eine deutliche Ca^{2+} -Mobilisation zu erwarten. Wie gezeigt, wird nach BZR-Stimulation der doppel-defizienten B-Zellen ein deutliches Ca^{2+} -Signal eingeleitet. Durch die zusätzliche Deletion von CD22

scheint ein Signalmolekül, das essentiell für die Initiation des Ca^{2+} -Signals ist, nicht mehr inhibiert zu werden. Diese zusätzliche Aktivität des Signalmoleküls reicht aus, um das Fehlen von SLP-65 zu kompensieren.

In CD22xSLP-65-doppel-defizienten Mäusen bleibt der Entwicklungsblock im prä-BII-Zellstadium im Knochenmark erhalten. Allerdings kann die Akkumulation von transitionellen B-Zellen im Knochenmark der SLP-65^{-/-} Mäuse in den doppel-defizienten Mäusen nicht mehr nachgewiesen werden. Die Untersuchungen der peripheren B-Zellen in der Milz von CD22xSLP-65-doppel-defizienten Mäusen ergab, dass sich die relative Anzahl reifer B-Zellen im Vergleich zu SLP-65-defizienten Mäusen verdoppelt hat. Dies ist mit einer verringerten Anzahl an T2 B-Zellen ($\text{IgM}^{\text{hoch}} \text{IgD}^{\text{hoch}}$) korrelierbar. Im transitionellen B-Zellstadium im Knochenmark und der Milz haben die SLP-65^{-/-} B-Zellen durch die zusätzliche Deletion von CD22 einen Entwicklungs- und Reifungsvorteil. Ein Grund für die verbesserte Reifung könnte das deutliche Ca^{2+} -Signal in den doppel-defizienten B-Zellen sein. In CD22-defizienten Mäusen wurde eine beschleunigte B-Zellreifung beschrieben (O'Keefe et al., 1996; Otipoby et al., 1996; Sato et al., 1996; Nitschke et al., 1997), die wahrscheinlich auf das stärkere Ca^{2+} -Signal zurückzuführen ist. B-Zellen benötigen sowohl während der Entwicklung im Knochenmark, als auch im reifen B-Zellstadium Signale vom prä-B- bzw. BZR. Möglicherweise wird durch die zusätzliche Deletion von CD22 das BZR-Signal in den SLP-65-defizienten B-Zellen so weit angehoben, dass mehr transitionelle B-Zellen in das Stadium der reifen B-Zelle übergehen. Zwar konnte diese Reifungssignal bisher noch nicht molekular definiert werden, aber die Entwicklungsschwierigkeiten von T2 B-Zellen in verschiedenen knock-out Mäusen lassen Rückschlüsse zu. Prinzipiell scheint es, als blockiere die Deletion von Signalmolekülen, die in der Signalkaskade nach $\text{Ig}\alpha/\text{Ig}\beta$ oder Syk aktiviert werden, die weitere Entwicklung der T2 B-Zellen. Beispielsweise wurde der Entwicklungsblock in Lyn-, Btk-, $\text{PLC}\gamma 2$ -, Vav1xVav2-defizienten Mäusen beschrieben (Chan et al., 1997; Meade et al., 2002; Hashimoto et al., 2000; Wang et al. 2000; Tedford et al., 2001).

Aufgrund der deutlich gestiegenen Anzahl reifer B-Zellen in der Milz von CD22xSLP-65-doppel-defizienten Mäusen wurde auch die Immunkompetenz der Tiere untersucht. Hierfür wurde zunächst die Antikörperkonzentration im Blut der doppel-defizienten Mäuse bestimmt. In den doppel-defizienten, wie auch in den SLP-65-defizienten Mäusen (Jumaa et al., 1999), fehlen die B1 Zellen im Peritoneum. Dies ist wahrscheinlich die Ursache für die drastische Reduktion der IgM und IgG₃ Immunglobulinlevel. Im Bezug auf die B1 Zellentwicklung im Peritoneum ist die Auswirkung der SLP-65 Deletion dominant über die normale B1 Entwicklung in CD22-defizienten Mäusen (Nitschke et al., 1997). Auch nach Injektion von

Thymus-unabhängigen (TI-Typ2) Antigen konnten keine Antigen-spezifischen IgM und IgG₃ Antikörper nachgewiesen werden. In der Milz von SLP-65 und CD22xSLP-65-doppel-defizienten Mäusen befindet sich eine normale MZ B-Zellpopulation. In CD22-defizienten Mäusen sind keine MZ B-Zellen nachweisbar (Samardzic et al., 2002). Entweder reichen die MZ B-Zellen in den SLP-65^{-/-} Mäusen nicht aus, um eine TI-Typ2 Immunantwort einzuleiten, oder die MZ Zellen werden durch die Kreuzvernetzung der BZRs nicht aktiviert. Die Immunkompetenz der SLP-65-defizienten Mäuse wurde durch die zusätzliche Deletion von CD22 nicht signifikant verbessert.

Durch Antigen-Bindung werden verschiedene Signalkaskaden aktiviert. Unter anderem kommt es zur Initiation des bereits mehrfach beschriebene Ca²⁺-Signals und des MAP-Kinase Signalwegs. Letzter ist hauptsächlich für die Induktion der Proliferation verantwortlich. Die Charakterisierung der SLP-65-defizienten Mäusen hatte gezeigt, dass das Adaptermolekül eine zentrale Rolle in der Aktivierung der BZR-Signaltransduktion übernimmt (Fu et al., 1998, Wienands et al., 1998). In SLP-65-defizienten B-Zellen bleibt nach BZR-Stimulation sowohl die Ca²⁺-Mobilisierung, als auch die Proliferation aus. Da in den CD22xSLP-65-doppel-defizienten B-Zellen ein Ca²⁺-Signal messbar ist, stellte sich die Frage, ob die zusätzliche Deletion von CD22 auch einen positiven Einfluss auf die Proliferation der SLP-65-defizienten B-Zellen nach BZR-Stimulation hat. Von Nitschke et al. (1997) war kein signifikanter Unterschied im ³H-Thymidin Einbau zwischen CD22^{-/-} und Kontroll-B-Zellen nach anti-IgM, anti-CD40 oder IL-4 Stimulation beschrieben worden. Im Gegensatz dazu zeigten die Proliferationsexperimente von Sato et al. (1996), dass CD22^{-/-} B-Zellen nach Stimulation mit anti-IgM und IL-4 signifikant geringer proliferierten. CD40 und CD40 plus IL-4 Behandlung dagegen führte zu einer deutlich stärkeren Proliferation der CD22-defizienten im Vergleich zu Kontroll-B-Zellen. In den von uns durchgeführten Proliferationstest wurden Mäuse aus den SLP-65xCD22-Verpaarung benutzt. Die SLP-65-defizienten B-Zellen reagierten weder auf anti-IgM, noch auf IL-4 oder CD40 Stimulation. Für die CD22-defizienten B-Zellen konnte eine Proliferation entsprechend den beschriebenen Daten von Sato et al. (1996) nachgewiesen werden. Nach anti-IgM Stimulation proliferierten die CD22-defizienten B-Zellen signifikant langsamer. Durch die Zugabe von IL-4 stieg die Proliferation an und CD40 plus IL-4 bewirkte eine Proliferationsrate, die über der von Kontroll-B-Zellen lag. Bei der Analyse der Proliferation der SLP-65xCD22-doppel-defizienten B-Zellen zeigte sich, dass nach anti-IgM, IL-4 und CD40 die SLP-65-Defizienz dominiert. Die zusätzliche Deletion von CD22 kann die Proliferation der SLP-65-defizienten B-Zellen nicht verbessern. Allerdings stieg die Proliferation der SLP-65 und doppel-defizienten B-Zellen nach Stimulation mit CD40 plus IL-4 deutlich an. Scheinbar ist das Adaptermolekül SLP-65/BLNK nicht für die Signalweiterleitung des CD40 und IL-4-Rezeptor Signalwegs

essentiell. Welchen Einfluss CD22 und SLP-65/BLNK auf den CD40 und IL-4 Signalweg haben, ist nicht bekannt. Allerdings wird auch durch diese Stimulation deutlich, dass die Signalwege von CD22 und SLP-65 parallel voneinander verlaufen. Ein Grund für die Unterschiede zwischen den CD22-defizienten Mauslinien könnte sein, dass die Kontroll-Mäuse aus den CD22xSLP-65-Verpaarungen für SLP-65 bzw. CD22 heterozygot waren (CD22^{+/-}SLP-65^{+/-}, CD22^{-/-}SLP-65^{+/-}, CD22^{+/-}SLP-65^{-/-}). Möglicherweise hat auch der gemischte C57BL/6xBALB/c Hintergrund der Mäuse einen Einfluss.

Auf die Behandlung mit dem Mitogen LPS reagierten die CD22xSLP-65-doppel-defizienten B-Zellen mit einer Proliferation, die über der Proliferationsrate von Kontroll-B-Zellen lag. Während von Jumaa et al. (1999) eine minimale Proliferation von SLP-65-defizienten B-Zellen nach LPS-Stimulation beschrieben wurde, zeigte Nitschke et al. (1997), dass CD22-defizienten B-Zellen mindestens doppelt so stark proliferieren wie Kontroll-B-Zellen. Die Aufgabe von CD22 im LPS-induzierten Signalweg konnte bisher noch nicht geklärt werden. Scheinbar kompensiert aber die zusätzliche Deletion von CD22 für das Fehlen des Adaptermoleküls. Im LPS-Signalweg ist der Phänotyp der CD22-defizienten B-Zellen dominant über die SLP-65-Defizienz. Weitere Untersuchungen sollten folgen, um die Funktion von CD22 in der TLR-Signalkaskade näher zu bestimmen.

Anhand der durchgeführten Versuche konnte ein Substrat der an CD22 rekrutierten und aktivierten Tyrosin-Phosphatase SHP-1 identifiziert werden. Das Adaptermolekül SLP-65/BLNK ist in CD22-defizienten B-Zellen nach BZR-Stimulation früher und stärker phosphoryliert. Die Rekonstitutionsexperimente in der Plasmazytom-Zelllinie J558L_μm3 bestätigten die dephosphorylierende Wirkung von SHP-1 auf SLP-65/BLNK in 75% der ST6Gal1-CD22-Doppeltransfektanten. Allerdings kann die inhibitorische Wirkung von SHP-1 in den ST6Gal1-R130E-CD22-Doppeltransfektanten noch nicht erklärt werden. Da in CD22xSLP-65-doppel-defizienten B-Zellen nach Stimulation ein deutliches Ca²⁺-Signal induziert wird, scheint die Phosphatase SHP-1 neben SLP-65/BLNK noch weitere Substrate in der BZR-Signalkaskade zu beeinflussen. In den CD22xSLP-65-doppel-defizienten Mäusen wurde der Entwicklungsblock im transitionellen B-Zellstadium behoben, wodurch sich die Anzahl reifer B-Zellen in der Peripherie verdoppelte. Allerdings verbesserten diese nicht die Immunkompetenz der CD22xSLP-65-doppel-defizienten Mäuse. Auch die Proliferation der doppel-defizienten B-Zellen nach BZR-Stimulation steigt nicht signifikant. Allerdings scheint die Deletion von CD22 die Funktion des Adaptermoleküls nach LPS-Stimulation zu kompensieren.

5.2 Die Notwendigkeit der Liganden-Bindungsdomäne von CD22 für die inhibitorische Wirkung auf das BZR-Signal

Die Lectin-Domäne der Siglecs bindet spezifisch verknüpfte Sialinsäure auf der Zelloberfläche. CD22 erkennt ausschließlich alpha2,6-verknüpfte Sialinsäure. Das neu entwickelte und hochspezifische Sialosid BPC-Neu5Ac interferiert mit der Liganden-Bindung von CD22. Die Vorbehandlung von humanen Daudi Zellen mit BPC-Neu5Ac führt zu einem deutlich höheren Ca^{2+} -Signal nach BZR-Stimulation. In Stimulationsexperimenten wurde gezeigt, dass in Anwesenheit von BPC-Neu5Ac CD22 schwächer Tyrosin-phosphoryliert vorliegt. Dadurch limitiert sich die Menge an Phosphatase SHP-1, die an CD22 rekrutiert und aktiviert wird. Der inhibitorische Einfluss von CD22 auf das BZR-Signal sinkt. Mit den beschriebenen Versuchen konnte die direkte Wirkung der Adhäsionsdomäne auf die cytoplasmatische Domäne von CD22 bewiesen werden. Ein potentieller alpha2,6 Sialinsäure-tragender Ligand für CD22 ist der BZR. Erste Stimulationsexperimente haben gezeigt, dass nach Vorbehandlung der humanen Daudi Zellen mit BPC-Neu5Ac die Menge an CD22 sinkt, die mit dem BZR co-präzipitiert werden kann.

Zunächst wurde die Spezifität von BPC-Neu5Ac für humanes CD22 (hCD22) überprüft. Hierfür wurden in zwei unabhängigen experimentellen Ansätzen die Sialoside Neu5Ac, BPC-Neu5Ac, BPAC-Neu5Ac, in ihrer Spezifität, ihrem inhibitorischen Potential und ihrer Selektivität verglichen. In dem CD22-Fc Bindungstest inhibierte das Sialosid BPC-Neu5Ac die Bindung der hCD22-Fc-Chimere an sialysierte Zielzellen (durchgeführt von S. Kelm). Im Gegensatz dazu hatten das sehr ähnliche Sialosid BPAC-Neu5Ac, oder das Sialosid Neu5Ac ein sehr geringes inhibitorisches Potential. Durch diesen Bindungstest wurde sowohl das hohe relative inhibitorische Potential von BPC-Neu5Ac für humanes CD22, als auch die Selektivität für humanes, anstelle von murinem CD22, gezeigt. Im zweiten Versuchsansatz wurde die Bindungsspezifität von BPC-Neu5Ac für zelluläres hCD22 untersucht. An humane Daudi Zellen, die mit Neuraminidase vorbehandelt und anschließend mit BPC-Neu5Ac inkubiert worden waren, konnte der synthetische Ligand von CD22, NeuGc2,6-PAA, nicht mehr binden. Im Gegensatz dazu färbte der synthetische CD22-Liganden nach Vorbehandlung mit Neuraminidase und BPAC-Neu5Ac das Oberflächen-CD22 deutlich an. Die Spezifität der NeuGc2,6-PAA Probe für CD22 wurde durch die Anfärbung primärer CD22-defizienter Neuraminidase-behandelter B-Zellen bewiesen. CD22-defiziente B-Zellen ließen sich mit der Probe nicht anfärben. Trotz der gezeigten hohen Spezifität des Sialosids BPC-Neu5Ac für humanes CD22 kann eine Interaktion mit anderen Siglecs auf der Oberfläche von humanen Daudi Zellen nicht völlig ausgeschlossen werden.

Die Spezifität des Sialosids BPC-Neu5Ac wird zusätzlich von der erst kürzlich charakterisierten Kristallstruktur von murinem Sialoadhesin (mSn) mit gebundenem BPC-Neu5Ac unterstützt (Zacchai et al., 2003). Die Kristallstruktur bestätigt die vorhergesagten Bindungseigenschaften der Siglecs. BPC-Neu5Ac interagiert mit dem hydrophoben Bereich in der Bindungstasche von mSn. Mit Hilfe der Strukturdaten von mSn kann durch Protein-Modelling die Struktur der V-set Domäne von CD22 vorhergesagt werden. In mSn haben die Aminosäuren Valin109 und Leucin107 direkten Kontakt zur Biphenyl-Gruppe des Sialosids. In hCD22 befinden sich an deren Stelle Arginin111 und Methionin109. Wahrscheinlich richtet sich BPC-Neu5Ac in der Adhäsionsdomäne von CD22 so aus, dass die Biphenyl-Gruppe genau zwischen diesen beiden Aminosäuren liegt. Dadurch ergibt sich eine energetisch günstige Aminosäurestapelung, die der Grund für die erhöhte Affinität von BPC-Neu5Ac zu hCD22 ist.

Die spezifische Wirkung des Sialosids BPC-Neu5Ac auf CD22 wird durch das gestiegene Ca^{2+} -Signal nach IgM-Stimulation in humanen B-Zellen deutlich. Während der Vorbehandlung der hDaudi Zellen mit BPC-Neu5Ac bindet der Inhibitor an die Lectin-Domäne und verdrängt dadurch den natürlichen Liganden von CD22. Dies hat zu Folge, dass der cytoplasmatische Teils von CD22 schwächer Tyrosin-phosphoryliert und weniger Phosphatase SHP-1 aktiviert wird. Der inhibitorische Einfluss von CD22 auf das BZR-Signal sinkt. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Liganden-Bindung von CD22 einen direkten Einfluss auf das intrazelluläre BZR-Signal hat. Auf der Oberfläche von B-Zellen ist die Konzentration an alpha2,6 Sialinsäure-tragenden Glykoproteinen hoch (Razi et al, 1998; Floyd et al., 2000). Daher liegt CD22 auf ruhenden B-Zellen in der Peripherie cis-maskiert vor. Werden die B-Zellen in vitro stimuliert, sinkt die Menge an alpha2,6 Sialinsäure und die Adhäsionsdomäne von CD22 wird anfärbbar (Razi et al, 1998). Wie die Expression von alpha2,6 Sialinsäure reguliert wird, ist noch nicht geklärt. Es könnte sein, dass die alpha2,6 Sialinsäuretransferase (ST6Gal1) entsprechend dem Entwicklungs- und Stimulationsstatus der B-Zelle exprimiert wird. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Sialidase die Sialinsäure auf der Oberfläche limitiert. Da die Expression der Sialinsäuretransferase in verschiedenen Zellarten genau reguliert wird (Lo et al., 1996), erscheint die erste Möglichkeit wahrscheinlich.

Das Sialosid BPC-Neu5Ac hat eine spezifisch Wirkung auf die Funktion von CD22. Wie kann die Adhäsionsdomäne von CD22 eine spezifische Wirkung auf das BZR-Signal ausüben, wenn die Liganden-Bindung von CD22 ausschließlich vom Karbohydrat-Anteil des Liganden abhängt? Sowohl die Analysen der Kristallstruktur von mSn mit gebundener Sialyllaktose (May et al., 1998), als auch Plasmon-Resonanz Analysen (Bakker et al., 2002) zeigten, dass

für die Liganden-Erkennung der Siglecs ausschließlich die Sialinsäure notwendig ist. Daher könnte theoretisch jedes alpha2,6 Sialinsäure-tragende Glykoprotein auf der Zelloberfläche ein Ligand von CD22 sein. Die beschriebenen Ca^{2+} -Daten widerlegen allerdings das Modell von Doody et al. (1996). Die Gruppe hatte postuliert, dass CD22 nach BZR-Stimulation durch die Liganden-Bindung vom BZR weggezogen wird, wodurch der inhibitorische Einfluss von CD22 auf das BZR-Signal minimiert wird. Wäre diese Überlegung richtig, erwarteten wir nach BPC-Neu5Ac Vorbehandlung ein niedrigeres Ca^{2+} -Signal. Durch den Inhibitor BPC-Neu5Ac würde die Interaktion mit dem Liganden von CD22, der für das Wegbewegen verantwortlich ist, gestört. Die Folge wäre, dass CD22 in der Nähe des BZRs lokalisiert bleibt und das Ca^{2+} -Signal weiter inhibiert. Unsere Ergebnisse zeigen aber das Gegenteil, denn durch die Behandlung mit BPC-Neu5Ac steigt das Ca^{2+} -Signal. Dies weist darauf hin, dass CD22 auch während der BZR-Stimulation einen Liganden in der Nähe des BZR-Komplexes bindet und das initiierte Ca^{2+} -Signal beeinflusst. Die Lokalisation von CD22 in der Nähe des BZRs scheint ein entscheidendes Kriterium für die inhibitorische Funktion zu sein.

Neben dem räumlichen Abstand zum BZR könnte auch der Interaktionspartner von CD22 über die Wirkung von CD22 entscheiden. Die cytoplasmatische Domäne von CD22 wird in Abhängigkeit von der Aktivierung des BZRs Tyrosin-phosphoryliert und anschließend die Phosphatase SHP-1 rekrutiert und aktiviert. Scheinbar befindet sich CD22 vor und während der BZR-Stimulation in der Nähe des BZRs. Möglicherweise interagiert CD22 mit einem positiv wirkenden Oberflächenmolekül. Wie aber kann eine spezifische Interaktion von CD22 mit einem positiv wirkenden Liganden in der Nähe des BZRs zustande kommen, wenn die Adhäsionsdomäne von CD22 ausschließlich alpha2,6 Sialinsäure erkennt? Vielleicht wird die Interaktion von CD22 mit bestimmten alpha2,6 Sialinsäure-tragenden Transmembranproteinen durch alternative Mechanismen gewährleistet. Wahrscheinlicher ist, dass CD22 mit vielen verschiedenen Glykoproteinen interagiert. Jedoch haben jene Oberflächenmoleküle einen Vorteil, die hoch exprimiert sind, deren Struktur für CD22 gut zugänglich ist und die viel alpha2,6 Sialinsäure tragen. Zwei Kandidaten wären überzeugend, nämlich der BZR selber und CD45. Von LePrince et al und Peaker et al. (beide 1993) wurde eine direkte Interaktion von CD22 mit dem mIgM bereits gezeigt. In ersten eigenen Experimenten konnte CD22 mit dem Oberflächen IgM co-präzipitiert werden. Nach Vorbehandlung der humanen Daudi Zellen mit BPC-Neu5Ac sinkt die Menge an assoziiertem CD22 in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer. Möglicherweise ist die konstitutive Bindung von mIgM und CD22 abhängig von der Interaktion der Lectin-Domäne von CD22 und der Sialinsäure am BZR. Diese Situation würde auch die direkte Nachbarschaft der beiden Moleküle während der BZR-Stimulation unterstützen. Der zweite potentielle Bindungspartner von CD22 könnte CD45 sein. CD45 ist auf B-Zellen hoch exprimiert und stark glykosyliert. In Experimenten mit

einem rekombinanten CD22-Fc Molekül wurden hauptsächlich CD45-Isoforme aus verschiedenen Zellen präzipitiert (Sgroi et al., 1995). Die Rezeptor-gebundene Phosphatase CD45 würde gut in den BZR-Signalweg passen. CD45 aktiviert die Familie der Src-Kinasen. Die Src-Kinase Lyn ist essentiell für die Tyrosin-Phosphorylierung von CD22 (Cornall et al., 1998; Smith et al., 1998; Poe et al., 2000). Allerdings müsste CD45 auch das gebundene CD22 in die Nähe des BZR bringen, falls sich CD45 nicht bereits dort befindet. Die direkte Interaktion von CD22 mit mIgM und/oder CD45 sollte in weiteren Experimenten genau untersucht werden. Dafür bietet sich neben CD22 Co-präzipitationen auch Bindungs- und Interaktionsstudien an, die mit dem Fluoreszenz-Mikroskop analysiert werden.

In einer zeitgleichen Studie haben Jin et al. (2002) eine CD22-defizienten B-Zelllinie etabliert. In diese transfizierten sie den Expressionsvektor codierend für CD22, dessen Adhäsionsdomäne mutiert oder deletiert war. Ähnlich den von uns beschriebenen Ergebnissen war das Ca^{2+} -Signal nach BZR-Stimulation in den Transfektanten ohne funktionelle Adhäsionsdomäne erhöht. Auch konnte gezeigt werden, dass nach Stimulation der B-Zellen ohne Adhäsionsdomäne CD22 schwächer Tyrosin-phosphoryliert vorliegt und entsprechend weniger SHP-1 rekrutiert wird. Die Frage nach dem Liganden von CD22 können Jin et al. (2002) ebenfalls noch nicht beantworten.

Ein weiterer zu berücksichtigender Aspekt in der Funktion von CD22 ist dessen Ausschluss aus den Mikrodomänen (rafts) und der Immunologischen Synapse (Batista et al., 2001). Hat Antigen die BZR kreuzvernetzt, bewegen sich diese in rafts. Dort befinden sich die benötigten Signalmoleküle, um das BZR-Signal zu initiieren. Nach etwa 10 Minuten Antigen-Bindung formiert sich aus den einzelnen rafts eine sogenannte Immunologische Synapse, die den direkten Kontakt zur Antigen-tragenden Zelle herstellt (Lanzavecchia et al., 1985). Im Zentrum der Synapse befinden sich die BZR-Komplexe und intrazelluläre Signalmoleküle. Um diesen Mittelpunkt formiert sich ein Ring aus Adhäsionsmolekülen, Co-Rezeptoren, CD22 und CD45. Bisher haben unsere Studien ausschließlich die Wirkung der Inhibitoren auf das proximale BZR-Signal berücksichtigt. Es sollte allerdings untersucht werden, ob CD22 auch noch Einfluss auf das in der Immunologischen Synapse erzeugte Signal hat. Möglicherweise könnte durch diese Ergebnisse auf die Dauer der Liganden-Bindung von CD22 nach Stimulation der B-Zelle rückgeschlossen werden.

Neben der cis-Maskierung von CD22 auf der Zelloberfläche (Razi et al, 1998) kann eine trans-Interaktion von CD22 mit benachbarten Zellen nicht ausgeschlossen werden. Beispielsweise ist CD22 auf B-Zellen nach in vitro Aktivierung mit anti-IgM und CD40 mit der CD22-spezifischen Probe anfärbbar (Razi et al, 1998). Daher könnte es besonders in den

dicht gepackten Follikeln zu trans-Interaktionen von CD22 mit alpha2,6-tragenden Liganden auf anderen Zellen kommen. Lanoue et al. (2002) konnten zeigen, dass B-Zellen nach Stimulation mit Antigen, das von einer alpha2,6 Sialinsäure tragenden Zielzelle dargeboten wird, nicht aktiviert werden. Im Gegensatz dazu steigt die Expression von Aktivierungsmarker auf den B-Zellen nach Stimulation mit alpha2,6 Sialinsäure-defizienten Zielzellen. Da prokaryotische Zellen keine und eukaryotische Zellen stark alpha2,6 Sialinsäure auf der Zelloberfläche exprimieren, postulieren Lanoue et al. (2002), dass CD22 eine wichtige Rolle in der Erkennung von Selbst und Fremd übernimmt. Allerdings setzte diese trans-Interaktion von CD22 mit der Zielzelle voraus, dass die cis-Maskierung nachlässt. Ob und in welchen Situationen dieses Modell in vivo zum Einsatz kommt, bedarf weiterführender Experimente.

Mit den dargelegten Ergebnissen konnte eine neue Funktion der Lectin-Domäne von CD22 aufgezeigt werden. Die cis-Bindung von CD22 an einen alpha2,6 Sialinsäure tragenden Liganden auf der Zelloberfläche ist Voraussetzung für die inhibitorische Wirkung von CD22 auf das Ca^{2+} -Signal. Es ist vorstellbar, dass die Sialoside als therapeutische Substanzen eingesetzt werden. Der Inhibitor BPC-Neu5Ac bewirkt eine verstärkte B-Zellantwort, was besonders in abwehrgeschwächten Patienten unterstützend wirken könnte. Zwar ist die Wirkung von BPC-Neu5Ac als Monomer relativ schwach, aber durch die Oligomerisierung des Sialosids sollte der Effekt durch die gestiegene Avidität verstärkt werden.

5.3 Die Rolle von CD22 in BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen

In Mäusen, in denen der transkriptionellen Co-Aktivator BOB.1/OBF.1 fehlt, ist die Anzahl an reifen B-Zellen in der Peripherie 2- bis 3-fach reduziert. Als Ursache wurde ein Entwicklungsblock im transitionellen Stadium der B-Zellen im Knochenmark einhergehend mit einer gestiegenen Apoptoserate beschrieben. Um eine mögliche Erklärung für diesen Entwicklungsblock zu finden, wurde die Expression von verschiedenen Oberflächenmolekülen auf B-Zellen aus dem Knochenmark von BOB.1/OBF.1-defizienten und Kontroll-Mäusen verglichen. Von den untersuchten Oberflächenmolekülen war ausschließlich die Expression von CD22 auf prä-B-Vorläuferzellen und unreifen B-Zelle erhöht. Um die Abhängigkeit der beiden Moleküle voneinander zu untersuchen, wurden CD22- und BOB.1/OBF.1-defizienten Mäuse gekreuzt und die doppel-defizienten Mäuse analysiert.

Im Knochenmark von CD22xBOB.1/OBF.1-doppel-defizienten Mäusen entwickeln sich die B-Vorläuferzellen normal. Die Anzahl transitioneller B-Zellen ist wieder hergestellt. Mehr B-Zellen verlassen das Knochenmark und reifen in der Milz heran. So entspricht das Verhältnis von B- zu T-Zellen in der Milz von doppel-defizienten Mäusen fast der Verteilung in Kontroll-Mäusen. Die Anzahl reifer B-Zellen in der Milz von CD22xBOB.1/OBF.1-doppel-defizienten Mäusen ist höher als in BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen, erreicht aber nicht die Anzahl in wildtypischen Mäusen. Um eine molekulare Erklärung für die verbesserte B-Zellreifung im Knochenmark von CD22xBOB.1/OBF.1-doppel-defizienten Mäusen zu finden, wurden aus den Milzen der Mäuse die reifen B-Zellen isoliert und deren Ca^{2+} -Mobilisierung nach BZR-Stimulation gemessen. Wir zeigten erstmals, dass BOB.1/OBF.1-defiziente B-Zellen nach BZR-Stimulation kein Ca^{2+} -Signal initiieren. Im Gegensatz dazu erreicht das Ca^{2+} -Signal in CD22xBOB.1/OBF.1-doppel-defizienten B-Zellen nach Stimulation mindestens die Höhe von Kontroll-B-Zellen.

In CD22xBOB.1/OBF.1-doppel-defizienten Mäusen gibt es deutlich mehr reife B-Zellen, verglichen mit BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen. Daher wurde die Immunkompetenz der doppel-defizienten Mäuse untersucht. In BOB.1/OBF.1^{-/-} Mäusen sind die Immunglobulinlevel aller Isotypen deutlich reduziert. Vergleichbar niedrig sind auch die Titer in doppel-defizienten Mäusen. Nach Immunisierung der Mäuse mit Antigen, das eine TD-Immunantwort hervorruft, waren weder antigen-spezifische IgG1-Antikörper im Blut, noch Keimzentren in der Milz nachweisbar. Die zusätzliche Deletion von CD22 verbesserte die Immunkompetenz von BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen nicht.

Von Otipoby et al. (1996) und Nitschke et al. (1997) war eine zweifach erhöhte Proliferation der CD22-defizienten B-Zellen nach LPS-Stimulation beschrieben worden. Auf der Suche nach einer Erklärung für diese stärkere Proliferation überprüften wir auch die Expression des transkriptionellen Co-Aktivators BOB.1/OBF.1 nach LPS-Stimulation. Tatsächlich war nach LPS-Stimulation der CD22^{-/-} B-Zellen BOB.1/OBF.1 früher und stärker exprimiert. Um die Rolle vom BOB.1/OBF.1 im LPS-Signalweg zu klären, wurden CD22xBOB.1/OBF.1-doppel-defizienten B-Zellen mit LPS stimuliert. Da doppel-defiziente B-Zellen mindestens so stark proliferieren wie CD22-defiziente B-Zellen, hat der transkriptionelle Co-Aktivator keine essentielle Aufgabe im LPS-induzierten Signalweg von CD22-defizienten B-Zellen.

Die Defizienz von BOB.1/OBF.1 bewirkt eine erhöhte Expression von CD22 auf den B-Vorläuferzellen im Knochenmark. Über die Aufgabe von CD22 während der frühen B-Zellentwicklung im Knochenmark ist bisher nichts bekannt. CD22 wird vom Prä-B-Zellstadium (Fraktion C') an mit steigender Intensität exprimiert (Doerken et al.,1996;

Stoddart et al.; 1997, Nitschke et al., 1997). In CD22-defizienten Mäusen konnte keine Auffälligkeit in der B-Zellentwicklung gefunden werden (O'Keefe et al., 1996; Otipoby et al., 1996; Sato et al., 1996; Nitschke et al., 1997). In reifen B-Zellen ist CD22 ein negativer Regulator des BZR-Signals (Doody et al., 1995). Möglicherweise übernimmt CD22 diese Funktion auch in B-Vorläuferzellen und moduliert das prä-BZR-Signal der prä-B-Zellen im Knochenmark. Die erhöhte Expression von CD22 auf den unreifen B-Zellen in BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen könnte den Entwicklungsblock im transitionellen Stadium verursachen. Da CD22 bereits im Prä-B-Zellstadium überexprimiert vorliegt, wäre es denkbar, dass CD22 das prä-BZR-Signal modulieren und dadurch die Entwicklung der Vorläuferzellen beeinflusst. Das prä-BZR-Signal ist entscheidend für die klonale Expansion der Zellen und die Weiterentwicklung in das Stadium der unreifen B-Zelle (Rajewsky et al., 1996). Anhand der vorliegenden Daten kann nicht auf eine definitive Rolle von CD22 in der BZR-Signalmodulation in B-Vorläuferzellen im Knochenmark geschlossen werden.

Durch die zusätzliche Deletion von CD22 in BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen ist der Entwicklungsblock im transitionellen Stadium fast vollständig behoben. Die Anzahl an transitionellen B-Zellen im Knochenmark der CD22xBOB.1/OBF.1-doppel-defizienten Mäuse erreicht beinahe den Wert von Kontroll-Mäusen. Aus diesem Grund nahmen wir an, dass mehr reife B-Zellen in der Peripherie der doppel-defizienten Mäuse zu finden sind. Tatsächlich waren deutlich mehr reife, lang-lebige B-Zellen in der Milz und das B- zu T-Zellverhältnis entsprach fast der Verteilung in Kontroll-Mäusen. Als Ursache für diese Verbesserung wurde ein stärkeres Ca^{2+} -Signal in den CD22xBOB.1/OBF.1^{-/-} B-Zellen vermutet. Das Überleben der B-Zellen ist während der Entwicklung vom positiven Signal des prä-BZRs abhängig. Auch reife, langlebige B-Zellen brauchen zum Überleben ein permanentes BZR-Signal (Lam et al., 1997). In CD22-defizienten Mäusen wurde eine beschleunigte B-Zellreifung in der Peripherie beschrieben (O'Keefe et al., 1996; Otipoby et al., 1996; Sato et al., 1996; Nitschke et al., 1997), die vermutlich auf das stärkere BZR-Signal zurückzuführen ist. Um die BZR-Signalsstärke nach IgM-Stimulation von reifen BOB.1/OBF.1- und CD22xBOB.1/OBF.1-doppel-defizienten B-Zellen vergleichen zu können, wurden Ca^{2+} -Messungen durchgeführt. Diese bestätigten, dass in den doppel-defizienten B-Zellen ein Ca^{2+} -Signal induziert wird, das mindestens die Höhe von Kontroll-B-Zellen erreicht. Im Gegensatz dazu wird in BOB.1/OBF.1-defizienten B-Zellen durch anti-IgM Stimulation keine messbare Ca^{2+} -Mobilisation initiiert. Mit diesem Resultat konnten wir erstmals zeigen, dass durch die Deletion von BOB.1/OBF.1 das BZR-Signal direkt betroffen ist. Möglicherweise reguliert der transkriptionelle Co-Aktivatoren die Expression eines bisher nicht identifizierten Signalmoleküls in der Ca^{2+} -Mobilisierung.

Die beschriebenen Versuche zeigten, dass die zusätzliche Deletion von CD22 den Defekt in der Ca^{2+} -Mobilisation von BOB.1/OBF.1-defizienten B-Zellen kompensiert. In CD22xBOB.1/OBF.1-doppel-defizienten B-Zellen wird nach BZR-Stimulation ein Ca^{2+} -Signal initiiert. Eine funktionelle Abhängigkeit der beiden Moleküle kann anhand der Ergebnisse allerdings nicht postuliert werden. Um eine Aussage über mögliche Schnittpunkte der Signalwege von CD22 und BOB.1/OBF.1 machen zu können, müssen noch weitere Untersuchungen folgen. Unabhängig vom molekularen Mechanismus, der das Ca^{2+} -Signal in CD22xBOB.1/OBF.1-doppel-defizienten B-Zellen wieder herstellt, könnte dieses Signal nicht nur für die Reifung in der Peripherie, sondern auch für die verbesserte Entwicklung im Knochenmark verantwortlich sein. Wahrscheinlich werden die „checkpoints“ in der B-Zellentwicklung, die vom BZR-Signal abhängig sind, durch das höhere Ca^{2+} -Signal in CD22xBOB.1/OBF.1-doppel-defizienten B-Zellen überwunden.

In B-Zellen, in denen der transkriptionelle Co-Aktivatoren fehlt, wird nach BZR-Stimulation kein Ca^{2+} -Signal initiiert. Des Weiteren ist die Proliferation von BOB.1/OBF.1^{-/-} B-Zellen nach anti-IgM Stimulation *in vitro* vierfach reduziert (Kim et al., 1996; Nielsen et al., 1996; Schubart et al., 1996). Möglicherweise hat die Defizienz von BOB.1/OBF.1 einen Einfluss auf ein Signalmolekül, das sowohl für die Ca^{2+} -Mobilisation, als auch für die Aktivierung des MAP-Kinase Signalwegs wichtig ist. Werden dem Stimulationsansatz von BOB.1/OBF.1-defizienten B-Zellen CD40 oder IL-4 zugefügt, was *in vivo* der Hilfe von TH2 Zellen entspricht, steigt die Proliferation der B-Zellen deutlich an (Kim et al., 1996). Die Aktivierung der B-Zellen ist zwar von der Antigen-Bindung und dem induzierten BZR-Signal abhängig, aber Zytokine wie IL-4 oder Chemokine, und die Bindung der Liganden von co-stimulatorischen Molekülen wie CD40 und B7, sind Voraussetzung für die Initiation einer T-zellabhängigen Immunantwort. Wir stellten uns daher die Frage, ob die deutlich gestiegene Anzahl an reifen B-Zellen in der Peripherie von CD22xBOB.1/OBF.1-doppel-defizienten Mäusen eine Verbesserung in der TD-Immunantwort bewirkt. Aber wie in BOB.1/OBF.1^{-/-} Mäusen waren nach Immunisierung mit TD-Antigen weder TNP-spezifische IgG1 Antikörper, noch Keimzentren detektierbar. Dieses Ergebnis war nicht unerwartet, denn CD22-defizienten Mäuse reagieren auf TD-Antigen nicht stärker als Kontroll-Mäuse. Das Oberflächenmolekül CD22 hat keinen Einfluss auf die Produktion von Antigen-spezifischen IgG1 Antikörpern. Wie in BOB.1/OBF.1-defizienten, so wurden auch in den Milzen von CD22xBOB.1/OBF.1-doppel-defizienten Mäusen nach der Immunisierung mit TD-Antigen keine Keimzentren gebildet. Dies könnte unter anderem durch einen Differenzierungs- oder Migrationsdefekt, oder durch einen Defekt im Verbleiben innerhalb der Follikel der stimulierten reifen B-Zelle verursacht werden. Eine mögliche Erklärung bietet der Chemokin-Rezeptor BLR1. Für die Bildung von Keimzentren müssen aktivierten B-Zelle in Follikel

einwandern. Mit Hilfe von BLR1-defizienten Mäusen zeigten Förster et al. (1996), dass der Chemokin-Rezeptor für das Einwandern der aktivierten B-Zelle in die Follikel notwendig ist. Im Promotor von BLR1 wurde das Octamer-Motiv identifiziert und dessen essentielle Rolle in der Transkription von BLR1 nachgewiesen (Wolf et al.; 1998). Des Weiteren ist die Expression von BLR1 in BOB.1/OBF.1-defizienten B-Zellen aus den Lymphknoten um 50% reduziert (Wolf et al.; 1998). Es bedarf weiterer intensiver Untersuchungen, um die theoretisch möglichen Ursachen für das Ausbleiben der Keimzentrenbildung in BOB.1/OBF.1^{-/-} Mäusen zu klären.

Abschließend wurde noch die Proliferation von B-Zellen aus der Milz von BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen nach LPS-Stimulation untersucht. Die BOB.1/OBF.1^{-/-} B-Zellen proliferieren nach LPS-Zugabe vergleichbar stark wie Kontroll-B-Zellen. Der transkriptionelle Co-Aktivatoren scheint keinen Einfluss auf den von LPS-aktivierten Signalweg zu haben. Im Gegensatz dazu proliferieren B-Zellen aus CD22-defizienten Mäusen nach LPS-Stimulation etwa doppelt so stark (Otipoby et al., 1996; Nitschke et al., 1997). Außerdem beginnt die Expression von BOB.1/OBF.1 in CD22^{-/-} B-Zellen früher und ist deutlich höher als in Kontroll-B-Zellen. Diese Überexpression von BOB.1/OBF.1 in CD22-defizienten B-Zellen könnte auf einen mechanistischen Zusammenhang der beiden Moleküle im LPS-Signalweg hinweisen. Allerdings proliferierten CD22xBOB.1/OBF.1-doppel-defiziente B-Zellen nach LPS-Stimulation mindestens so stark wie CD22-defiziente B-Zellen. Durch dieses Resultat musste ein Einfluss von BOB.1/OBF.1 auf den von LPS-induzierten Signalweg in CD22-defizienten B-Zellen ausgeschlossen werden. Der Grund für die deutlich stärkere Proliferation nach LPS-Stimulation in CD22-defizienten B-Zellen bleibt ungeklärt.

Zusammengefasst konnte durch die zusätzliche Deletion von CD22 die Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark von BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen wieder hergestellt werden. Dies hatte zur Folge, dass in der Peripherie deutlich mehr reife B-Zellen zu finden sind, und das B- zu T-Zellverhältnis in CD22xBOB.1/OBF.1-doppel-defizienten Mäusen beinahe dem in Kontroll-Mäusen entspricht. Der Grund für diese Verbesserungen ist wahrscheinlich das fast normale Ca²⁺-Signal in doppel-defizienten B-Zellen. Keine Veränderung war nach BZR-Stimulation in der Proliferation der doppel-defizienten B-Zellen zu beobachten. Auch war in diesen Mäusen keine TD-Immunantwort induzierbar, was dem Phänotyp der BOB.1/OBF.1-defizienten Tiere entspricht. Weiterhin konnte kein funktioneller Zusammenhang zwischen dem transkriptionellen Co-Aktivatoren und dem LPS-induzierten Signalweg in CD22-defizienten B-Zellen nachgewiesen werden.

6 Literatur

Adachi, T., Flaswinkel, H., Yakura, H., Reth, M., and Tsubata, T. (1998). The B cell surface protein CD72 recruits the tyrosine phosphatase SHP-1 upon tyrosine phosphorylation. **J Immunol** 160, 4662-4665.

Adachi, T., Wienands, J., Wakabayashi, C., Yakura, H., Reth, M., and Tsubata, T. (2001). SHP-1 requires inhibitory co-receptors to down-modulate B cell antigen receptor-mediated phosphorylation of cellular substrates. **J Biol Chem** 276, 26648-26655.

Allman, D. M., Ferguson, S. E., Lentz, V. M., and Cancro, M. P. (1993). Peripheral B cell maturation. II. Heat-stable antigen(hi) splenic B cells are an immature developmental intermediate in the production of long-lived marrow-derived B cells. **J Immunol** 151, 4431-4444.

Angata, T., Kerr, S. C., Greaves, D. R., Varki, N. M., Crocker, P. R., and Varki, A. (2002). Cloning and characterization of human Siglec-11. A recently evolved signaling that can interact with SHP-1 and SHP-2 and is expressed by tissue macrophages, including brain microglia. **J Biol Chem** 277, 24466-24474.

Asada, H., Ishii, N., Sasaki, Y., Endo, K., Kasai, H., Tanaka, N., Takeshita, T., Tsuchiya, S., Konno, T., and Sugamura, K. (1999). Grf40, A novel Grb2 family member, is involved in T cell signaling through interaction with SLP-76 and LAT. **J Exp Med** 189, 1383-1390.

Bakker, T. R., Piperi, C., Davies, E. A., and Merwe, P. A. (2002). Comparison of CD22 binding to native CD45 and synthetic oligosaccharide. **Eur J Immunol** 32, 1924-1932.

Berridge, M. J. (1993). Cell signalling. A tale of two messengers. **Nature** 365, 388-389.

Blasioli, J., Paust, S., and Thomas, M. L. (1999). Definition of the sites of interaction between the protein tyrosine phosphatase SHP-1 and CD22. **J Biol Chem** 274, 2303-2307.

Brdicka, T., Imrich, M., Angelisova, P., Brdickova, N., Horvath, O., Spicka, J., Hilgert, I., Luskova, P., Draber, P., Novak, P., Engels, N., Wienands, J., Simeoni, L., Osterreicher, J., Aguado, E., Malissen, M., Schraven, B., and Horejsi, V. (2002). Non-T cell activation linker (NTAL): a transmembrane adaptor protein involved in immunoreceptor signaling. **J Exp Med** 196, 1617-1626.

Burshtyn, D. N., Scharenberg, A. M., Wagtmann, N., Rajagopalan, S., Berrada, K., Yi, T., Kinet, J. P., and Long, E. O. (1996). Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitor receptor. **Immunity** 4, 77-85.

Campbell, M. A., and Klinman, N. R. (1995). Phosphotyrosine-dependent association between CD22 and protein tyrosine phosphatase 1C. **Eur J Immunol** 25, 1573-1579.

Carsetti, R., Kohler, G., and Lamers, M. C. (1995). Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. **J Exp Med** 181, 2129-2140.

Chan, V. W., Lowell, C. A., and DeFranco, A. L. (1998). Defective negative regulation of antigen receptor signaling in Lyn- deficient B lymphocytes. **Curr Biol** 8, 545-553.

Chan, V. W., Meng, F., Soriano, P., DeFranco, A. L., and Lowell, C. A. (1997). Characterization of the B lymphocyte populations in Lyn-deficient mice and the role of Lyn in signal initiation and down-regulation. **Immunity** 7, 69-81.

- Chen, X. P., Enioutina, E. Y., and Daynes, R. A. (1997). The control of IL-4 gene expression in activated murine T lymphocytes: a novel role for neu-1 sialidase. **J Immunol** 158, 3070-3080.
- Chiu, C. W., Dalton, M., Ishiai, M., Kurosaki, T., and Chan, A. C. (2002). BLNK: molecular scaffolding through 'cis'-mediated organization of signaling proteins. **EMBO J** 21, 6461-6472.
- Chung, J. B., Baumeister, M. A., and Monroe, J. G. (2001). Cutting edge: differential sequestration of plasma membrane-associated B cell antigen receptor in mature and immature B cells into glycosphingolipid-enriched domains. **J Immunol** 166, 736-740.
- Cong, Y. Z., Rabin, E., and Wortis, H. H. (1991). Treatment of murine CD5- B cells with anti-Ig, but not LPS, induces surface CD5: two B-cell activation pathways. **Int Immunol** 3, 467-476.
- Cornall, R. J., Cyster, J. G., Hibbs, M. L., Dunn, A. R., Otipoby, K. L., Clark, E. A., and Goodnow, C. C. (1998). Polygenic autoimmune traits: Lyn, CD22, and SHP-1 are limiting elements of a biochemical pathway regulating BCR signaling and selection. **Immunity** 8, 497-508.
- Crocker, P. R., Clark, E. A., Filbin, M., Gordon, S., Jones, Y., Kehrl, J. H., Kelm, S., Le Douarin, N., Powell, L., Roder, J., Schnaar, R. L., Sgroi, D. C., Stamenkovic, K., Schauer, R., Schachner, M., van den Berg, T. K., van der Merwe, P. A., Watt, S. M., and Varki, A. (1998). Siglecs: a family of sialic-acid binding lectins. **Glycobiology** 8, v.
- Crocker, P. R., and Gordon, S. (1986). Properties and distribution of a lectin-like hemagglutinin differentially expressed by murine stromal tissue macrophages. **J Exp Med** 164, 1862-1875.
- Crocker, P. R., and Varki, A. (2001). Siglecs, sialic acids and innate immunity. **Trends Immunol** 22, 337-342.
- 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, 1074-7613.
- Doody, G. M., Justement, L. B., Delibrias, C. C., Matthews, R. J., Lin, J., Thomas, M. L., and Fearon, D. T. (1995). A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP. **Science** 269, 242-244.
- Dorken, B., Moldenhauer, G., Pezzutto, A., Schwartz, R., Feller, A., Kiesel, S., and Nadler, L. M. (1986). HD39 (B3), a B lineage-restricted antigen whose cell surface expression is limited to resting and activated human B lymphocytes. **J Immunol** 136, 4470-4479.
- Dustin, L. B., Plas, D. R., Wong, J., Hu, Y. T., Soto, C., Chan, A. C., and Thomas, M. L. (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, 2717-2724.
- Engel, P., Wagner, N., Miller, A. S., and Tedder, T. F. (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, 1581-1586.
- Engels, N., Wollscheid, B., and Wienands, J. (2001). Association of SLP-65/BLNK with the B cell antigen receptor through a non-ITAM tyrosine of Ig-alpha. **Eur J Immunol** 31, 2126-2134.

- Falkner, F. G., and Zachau, H. G. (1984). Correct transcription of an immunoglobulin kappa gene requires an upstream fragment containing conserved sequence elements. **Nature** 310, 71-74.
- Floyd, H., Nitschke, L., and Crocker, P. R. (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, 342-347.
- Forster, R., Mattis, A. E., Kremmer, E., Wolf, E., Brem, G., and Lipp, M. (1996). A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. **Cell** 87, 1037-1047.
- Fu, C., and Chan, A. C. (1997). Identification of two tyrosine phosphoproteins, pp70 and pp68, which interact with phospholipase Cgamma, Grb2, and Vav after B cell antigen receptor activation. **J Biol Chem** 272, 27362-27368.
- Fu, C., Turck, C. W., Kurosaki, T., and Chan, A. C. (1998). BLNK: a central linker protein in B cell activation. **Immunity** 9, 93-103.
- Fujimoto, M., Bradney, A. P., Poe, J. C., Steeber, D. A., and Tedder, T. F. (1999). Modulation of B lymphocyte antigen receptor signal transduction by a CD19/CD22 regulatory loop. **Immunity** 11, 191-200.
- Gerlach (1998). Vergleichende Analyse der Signaltransduktionskaskade nach BZR-Stimulation von CD22-defizienten und Kontrollmäusen. Diplomarbeit, Universität Würzburg
- Goitsuka, R., Fujimura, Y., Mamada, H., Umeda, A., Morimura, T., Uetsuka, K., Doi, K., Tsuji, S., and Kitamura, D. (1998). BASH, a novel signaling molecule preferentially expressed in B cells of the bursa of Fabricius. **J Immunol** 161, 5804-5808.
- Greer, S. F., and Justement, L. B. (1999). CD45 regulates tyrosine phosphorylation of CD22 and its association with the protein tyrosine phosphatase SHP-1. **J Immunol** 162, 5278-5286.
- Gstaiger, M., Knoepfel, L., Georgiev, O., Schaffner, W., and Hovens, C. M. (1995). A B-cell coactivator of octamer-binding transcription factors. **Nature** 373, 360-362.
- Guo, B., Kato, R. M., Garcia-Lloret, M., Wahl, M. I., and Rawlings, D. J. (2000). Engagement of the human pre-B cell receptor generates a lipid raft-dependent calcium signaling complex. **Immunity** 13, 243-253.
- Guthridge, J. M., Kaplan, A. M., and Cohen, D. A. (1994). Regulation of B cell:T cell interactions: potential involvement of an endogenous B cell sialidase. **Immunol Invest** 23, 393-411.
- Hardy, R. R., and Hayakawa, K. (2001). B cell development pathways. **Annu Rev Immunol** 19, 595-621.
- Hardy, R. R., Li, Y. S., and Hayakawa, K. (1996). Distinctive developmental origins and specificities of the CD5+ B-cell subset. **Semin Immunol** 8, 37-44.
- Hashimoto, A., Takeda, K., Inaba, M., Sekimata, M., Kaisho, T., Ikehara, S., Homma, Y., Akira, S., and Kurosaki, T. (2000). Cutting edge: essential role of phospholipase C-gamma 2 in B cell development and function. **J Immunol** 165, 1738-1742.

- Hashimoto, S., Iwamatsu, A., Ishiai, M., Okawa, K., Yamadori, T., Matsushita, M., Baba, Y., Kishimoto, T., Kurosaki, T., and Tsukada, S. (1999). Identification of the SH2 domain binding protein of Bruton's tyrosine kinase as BLNK--functional significance of Btk-SH2 domain in B-cell antigen receptor-coupled calcium signaling. **Blood** 94, 2357-2364.
- Haughton, G., Arnold, L. W., Whitmore, A. C., and Clarke, S. H. (1993). B-1 cells are made, not born. **Immunol Today** 14, 84-87; discussion 87-91.
- Hayakawa, K., Asano, M., Shinton, S. A., Gui, M., Allman, D., Stewart, C. L., Silver, J., and Hardy, R. R. (1999). Positive selection of natural autoreactive B cells. **Science** 285, 113-116.
- Hayashi, K., Nittono, R., Okamoto, N., Tsuji, S., Hara, Y., Goitsuka, R., and Kitamura, D. (2000). The B cell-restricted adaptor BASH is required for normal development and antigen receptor-mediated activation of B cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 97, 2755-2760.
- Hempel, W. M., Leduc, I., Mathieu, N., Tripathi, R. K., and Ferrier, P. (1998). Accessibility control of V(D)J recombination: lessons from gene targeting. **Adv Immunol** 69, 309-352.
- Hennet, T., Chui, D., Paulson, J. C., and Marth, J. D. (1998). Immune regulation by the ST6Gal sialyltransferase. **Proc Natl Acad Sci U S A** 95, 4504-4509.
- Herr, W., Sturm, R. A., Clerc, R. G., Corcoran, L. M., Baltimore, D., Sharp, P. A., Ingraham, H. A., Rosenfeld, M. G., Finney, M., Ruvkun, G., and et al. (1988). The POU domain: a large conserved region in the mammalian pit-1, oct-1, oct-2, and *Caenorhabditis elegans* unc-86 gene products. **Genes Dev** 2, 1513-1516.
- Hess, J., Nielsen, P. J., Fischer, K. D., Bujard, H., and Wirth, T. (2001). The B lymphocyte-specific coactivator BOB.1/OBF.1 is required at multiple stages of B-cell development. **Mol Cell Biol** 21, 1531-1539.
- Hibbs, M. L., Tarlinton, D. M., Armes, J., Grail, D., Hodgson, G., Maglitto, R., Stacker, S. A., and Dunn, A. R. (1995). Multiple defects in the immune system of Lyn-deficient mice, culminating in autoimmune disease. **Cell** 83, 301-311.
- Hof, P., Pluskey, S., Dhe-Paganon, S., Eck, M. J., and Shoelson, S. E. (1998). Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2. **Cell** 92, 441-450.
- Hombach, J., Leclercq, L., Radbruch, A., Rajewsky, K., and Reth, M. (1988). A novel 34-kd protein co-isolated with the IgM molecule in surface IgM-expressing cells. **EMBO J** 7, 3451-3456.
- Ishiai, M., Kurosaki, M., Pappu, R., Okawa, K., Ronko, I., Fu, C., Shibata, M., Iwamatsu, A., Chan, A. C., and Kurosaki, T. (1999). BLNK required for coupling Syk to PLC gamma 2 and Rac1-JNK in B cells. **Immunity** 10, 117-125.
- Ishiai, M., Sugawara, H., Kurosaki, M., and Kurosaki, T. (1999). Cutting edge: association of phospholipase C-gamma 2 Src homology 2 domains with BLNK is critical for B cell antigen receptor signaling. **J Immunol** 163, 1746-1749.
- Janssen, E., Zhu, M., Zhang, W., and Koonpaew, S. (2003). LAB: a new membrane-associated adaptor molecule in B cell activation. **Nat Immunol** 4, 117-123.
- Jin, L., McLean, P. A., Neel, B. G., Wortis, H. H. (2002). Sialic acid binding domains of CD22 are required for negative regulation of B cell receptor signaling. **J Exp Med** 195, 1199-1205

- Jumaa, H., Wollscheid, B., Mitterer, M., Wienands, J., Reth, M. (1999). Abnormal development and function of B-lymphocytes in mice lacking the signaling adaptor protein SLP-65. **Immunity** 11, 547-554
- Justement, L. B., Campbell, K. S., Chien, N. C., and Cambier, J. C. (1991). Regulation of B cell antigen receptor signal transduction and phosphorylation by CD45. **Science** 252, 1839-1842.
- Kabak, S., Skaggs, B. J., Gold, M. R., Affolter, M., West, K. L., Foster, M. S., Siemasko, K., Chan, A. C., Aebersold, R., and Clark, M. R. (2002). The direct recruitment of BLNK to immunoglobulin alpha couples the B-cell antigen receptor to distal signaling pathways. **Mol Cell Biol** 22, 2524-2535.
- Kantor, A. B., and Herzenberg, L. A. (1993). Origin of murine B cell lineages. **Annu Rev Immunol** 11, 501-538.
- Karasuyama, H., Nakamura, T., Nagata, K., Kuramochi, T., Kitamura, F., and Kuida, K. (1997). The roles of preB cell receptor in early B cell development and its signal transduction. **Immunol Cell Biol** 75, 209-216.
- Kelm, S., Pelz, A., Schauer, R., Filbin, M. T., Tang, S., de Bellard, M. E., Schnaar, R. L., Mahoney, J. A., Hartnell, A., Bradfield, P., and et al. (1994). Sialoadhesin, myelin-associated glycoprotein and CD22 define a new family of sialic acid-dependent adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. **Curr Biol** 4, 965-972.
- 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, 1207-1390.
- Kim, U., Qin, X. F., Gong, S., Stevens, S., Luo, Y., Nussenzweig, M., and Roeder, R. G. (1996). The B-cell-specific transcription coactivator OCA-B/OBF-1/Bob-1 is essential for normal production of immunoglobulin isotypes. **Nature** 383, 542-547.
- Kimura, T., Sakamoto, H., Appella, E., Siraganian, R. P. (1996). Conformational changes induced in the protein tyrosine kinase p72^{syk} by tyrosine phosphorylation or by binding of phosphorylated immunoreceptor tyrosine-based activation motif peptides. **Mol Cell Biol** 16, 1471-1478
- Kishihara, K., Penninger, J., Wallace, V. A., Kundig, T. M., Kawai, K., Wakeham, A., Timms, E., Pfeffer, K., Ohashi, P. S., Thomas, M. L., and et al. (1993). Normal B lymphocyte development but impaired T cell maturation in CD45- exon6 protein tyrosine phosphatase-deficient mice. **Cell** 74, 143-156.
- Kitamura, D., Kudo, A., Schaal, S., Muller, W., Melchers, F., and Rajewsky, K. (1992). A critical role of lambda 5 protein in B cell development. **Cell** 69, 823-831.
- Kondo, M., Weissman, I. L., and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. **Cell** 91, 661-672.
- Kudo, A., and Melchers, F. (1987). A second gene, VpreB in the lambda 5 locus of the mouse, which appears to be selectively expressed in pre-B lymphocytes. **EMBO J** 6, 2267-2272.
- Kumanogoh, A., and Kikutani, H. (2001). The CD100-CD72 interaction: a novel mechanism of immune regulation. **Trends Immunol** 22, 670-676.

- Kumanogoh, A., Watanabe, C., Lee, I., Wang, X., Shi, W., Araki, H., Hirata, H., Iwahori, K., Uchida, J., Yasui, T., Matsumoto, M., Yoshida, K., Yakura, H., Pan, C., Parnes, J. R., and Kikutani, H. (2000). Identification of CD72 as a lymphocyte receptor for the class IV semaphorin CD100: a novel mechanism for regulating B cell signaling. **Immunity** 13, 621-631.
- Kurosaki, T. (2002). Regulation of B-cell signal transduction by adaptor proteins. **Nat Rev Immunol** 2, 354-363.
- Kurosaki, T., Johnson, S. A., Pao, L., Sada, K., Yamamura, H., and Cambier, J. C. (1995). Role of the Syk autophosphorylation site and SH2 domains in B cell antigen receptor signaling. **J Exp Med** 182, 1815-1823.
- Lam, K. P., Kuhn, R., and Rajewsky, K. (1997). In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. **Cell** 90, 1073-1083.
- Lanoue, A., Batista, F. D., Stewart, M., and Neuberger, M. S. (2002). Interaction of CD22 with alpha2,6-linked sialoglycoconjugates: innate recognition of self to dampen B cell autoreactivity? **Eur J Immunol** 32, 348-355.
- Lanzavecchia, A. (1985). Antigen-specific interaction between T and B cells. **Nature** 314, 537-539.
- Law, C. L., Aruffo, A., Chandran, K. A., Doty, R. T., and Clark, E. A. (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, 3368-3376.
- Law, C. L., Sidorenko, S. P., Chandran, K. A., Zhao, Z., Shen, S. H., Fischer, E. H., and Clark, E. A. (1996). CD22 associates with protein tyrosine phosphatase 1C, Syk, and phospholipase C-gamma(1) upon B cell activation. **J Exp Med** 183, 547-560.
- LePrince, C., Draves, K. E., Geahlen, R. L., Ledbetter, J. A., and Clark, E. A. (1993). CD22 associates with the human surface IgM-B-cell antigen receptor complex. **Proc Natl Acad Sci U S A** 90, 3236-3240.
- Liu, S. K., Fang, N., Koretzky, G. A., and McGlade, C. J. (1999). The hematopoietic-specific adaptor protein gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors. **Curr Biol** 9, 67-75.
- Loder, F., Mutschler, B., Ray, R. J., Paige, C. J., Sideras, P., Torres, R., Lamers, M. C., and Carsetti, R. (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, 75-89.
- Luo, Y., and Roeder, R. G. (1995). Cloning, functional characterization, and mechanism of action of the B-cell-specific transcriptional coactivator OCA-B. **Mol Cell Biol** 15, 4115-4124.
- Martin, F., and Kearney, J. F. (2001). B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. **Curr Opin Immunol** 13, 195-201.
- May, A. P., Robinson, R. C., Vinson, M., Crocker, P. R., and Jones, E. Y. (1998). Crystal structure of the N-terminal domain of sialoadhesin in complex with 3' sialyllactose at 1.85 Å resolution. **Mol Cell** 1, 719-728.
- Meade, J., Fernandez, C., and Turner, M. (2002). The tyrosine kinase Lyn is required for B cell development beyond the T1 stage in the spleen: rescue by over-expression of Bcl-2. **Eur J Immunol** 32, 1029-1034.

- Melchers, F., Rolink, A., Grawunder, U., Winkler, T. H., Karasuyama, H., Ghia, P., and Andersson, J. (1995). Positive and negative selection events during B lymphopoiesis. **Curr Opin Immunol** 7, 214-227.
- Mizuno, K., Tagawa, Y., Mitomo, K., Arimura, Y., Hatano, N., Katagiri, T., Ogimoto, M., and Yakura, H. (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, 1344-1351.
- Mizuno, K., Tagawa, Y., Mitomo, K., Watanabe, N., Katagiri, T., Ogimoto, M., and Yakura, H. (2002). Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1 positively regulates B cell receptor-induced apoptosis by modulating association of B cell linker protein with Nck and activation of c-Jun NH2-terminal kinase. **J Immunol** 169, 778-786.
- Muller, M. M., Ruppert, S., Schaffner, W., and Matthias, P. (1988). A cloned octamer transcription factor stimulates transcription from lymphoid-specific promoters in non-B cells. **Nature** 336, 544-551.
- Nath, D., van der Merwe, P. A., Kelm, S., Bradfield, P., and Crocker, P. R. (1995). The amino-terminal immunoglobulin-like domain of sialoadhesin contains the sialic acid binding site. Comparison with CD22. **J Biol Chem** 270, 26184-26191.
- Nielsen, P. J., Georgiev, O., Lorenz, B., and Schaffner, W. (1996). B lymphocytes are impaired in mice lacking the transcriptional co-activator Bob1/OCA-B/OBF1. **Eur J Immunol** 26, 3214-3218.
- Nishizumi, H., Horikawa, K., Mlinaric-Rascan, I., and Yamamoto, T. (1998). A double-edged kinase Lyn: a positive and negative regulator for antigen receptor-mediated signals. **J Exp Med** 187, 1343-1348.
- Nishizumi, H., Taniuchi, I., Yamanashi, Y., Kitamura, D., Ilic, D., Mori, S., Watanabe, T., and Yamamoto, T. (1995). Impaired proliferation of peripheral B cells and indication of autoimmune disease in lyn-deficient mice. **Immunity** 3, 549-560.
- Nitschke, L., Carsetti, R., Ocker, B., Kohler, G., and Lamers, M. C. (1997). CD22 is a negative regulator of B-cell receptor signalling. **Curr Biol** 7, 133-143.
- Nitschke, L., Floyd, H., and Crocker, P. R. (2001). New functions for the sialic acid-binding adhesion molecule CD22, a member of the growing family of Siglecs. **Scand J Immunol** 53, 227-234.
- Nitschke, L., Floyd, H., Ferguson, D. J., and Crocker, P. R. (1999). Identification of CD22 ligands on bone marrow sinusoidal endothelium implicated in CD22-dependent homing of recirculating B cells. **J Exp Med** 189, 1513-1518.
- Nomura, T., Han, H., Howard, M. C., Yagita, H., Yakura, H., Honjo, T., and Tsubata, T. (1996). Antigen receptor-mediated B cell death is blocked by signaling via CD72 or treatment with dextran sulfate and is defective in autoimmunity-prone mice. **Int Immunol** 8, 867-875.
- O'Keefe, T. L., Williams, G. T., Davies, S. L., and Neuberger, M. S. (1996). Hyperresponsive B cells in CD22-deficient mice. **Science** 274, 798-801.
- Oliver, A. M., Martin, F., Kearney, J. F. (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, 7198-7207

- Osmond, D. G., Rolink, A., and Melchers, F. (1998). Murine B lymphopoiesis: towards a unified model. **Immunol Today** 19, 65-68.
- Otipoby, K. L., Andersson, K. B., Draves, K. E., Klaus, S. J., Farr, A. G., Kerner, J. D., Perlmutter, R. M., Law, C. L., and Clark, E. A. (1996). CD22 regulates thymus-independent responses and the lifespan of B cells. **Nature** 384, 634-637.
- Otipoby, K. L., Draves, K. E., and Clark, E. A. (2001). CD22 regulates B cell receptor-mediated signals via two domains that independently recruit Grb2 and SHP-1. **J Biol Chem** 276, 44315-44322.
- Pan, C., Baumgarth, N., and Parnes, J. R. (1999). CD72-deficient mice reveal nonredundant roles of CD72 in B cell development and activation. **Immunity** 11, 495-506.
- Pani, G., Kozlowski, M., Cambier, J. C., Mills, G. B., and Siminovitch, K. A. (1995). Identification of the tyrosine phosphatase PTP1C as a B cell antigen receptor-associated protein involved in the regulation of B cell signaling. **J Exp Med** 181, 2077-2084.
- Pao, L. I., Bedzyk, W. D., Persin, C., and Cambier, J. C. (1997). Molecular targets of CD45 in B cell antigen receptor signal transduction. **J Immunol** 158, 1116-1124.
- Pappu, R., Cheng, A. M., Li, B., Gong, Q., Chiu, C., Griffin, N., White, M., Sleckman, B. P., and Chan, A. C. (1999). Requirement for B cell linker protein (BLNK) in B cell development. **Science** 286, 1949-1954.
- Parslow, T. G., Blair, D. L., Murphy, W. J., and Granner, D. K. (1984). Structure of the 5' ends of immunoglobulin genes: a novel conserved sequence. **Proc Natl Acad Sci U S A** 81, 2650-2654.
- Peaker, C. J., and Neuberger, M. S. (1993). Association of CD22 with the B cell antigen receptor. **Eur J Immunol** 23, 1358-1363.
- Pezzutto, A., Dorken, B., Moldenhauer, G., and Clark, E. A. (1987). Amplification of human B cell activation by a monoclonal antibody to the B cell-specific antigen CD22, Bp 130/140. **J Immunol** 138, 98-103.
- Pfisterer, P., Zwilling, S., Hess, J., and Wirth, T. (1995). Functional characterization of the murine homolog of the B cell-specific coactivator BOB.1/OBF.1. **J Biol Chem** 270, 29870-29880.
- Pierce, S. K. (2002). Lipid rafts and B-cell activation. **Nat Rev Immunol** 2, 96-105.
- Pleiman, C. M., Abrams, C., Gauen, L. T., Bedzyk, W., Jongstra, J., Shaw, A. S., and Cambier, J. C. (1994). Distinct p53/56lyn and p59fyn domains associate with nonphosphorylated and phosphorylated Ig-alpha. **Proc Natl Acad Sci U S A** 91, 4268-4272.
- Poe, J. C., Fujimoto, M., Jansen, P. J., Miller, A. S., and Tedder, T. F. (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, 17420-17427.
- Rajewsky, K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. **Nature** 381, 751-758.
- Razi, N., and Varki, A. (1999). Cryptic sialic acid binding lectins on human blood leukocytes can be unmasked by sialidase treatment or cellular activation. **Glycobiology** 9, 1225-1234.

- 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, 7469-7474.
- Reichlin, A., Hu, Y., Meffre, E., Nagaoka, H., Gong, S., Kraus, M., Rajewsky, K., and Nussenzweig, M. C. (2001). B cell development is arrested at the immature B cell stage in mice carrying a mutation in the cytoplasmic domain of immunoglobulin beta. **J Exp Med** 193, 13-23.
- Reth, M. (2001). Oligomeric antigen receptors: a new view on signaling for the selection of lymphocytes. **Trends Immunol** 22, 356-360.
- Rodriguez, R., Matsuda, M., Perisic, O., Bravo, J., Paul, A., Jones, N. P., Light, Y., Swann, K., Williams, R. L., and Katan, M. (2001). Tyrosine residues in phospholipase Cgamma 2 essential for the enzyme function in B-cell signaling. **J Biol Chem** 276, 47982-47992.
- Rolli, V., Gallwitz, M., Wossning, T., Flemming, A., Schamel, W. W., Zurn, C., and Reth, M. (2002). Amplification of B cell antigen receptor signaling by a Syk/ITAM positive feedback loop. **Mol Cell** 10, 1057-1069.
- Rosenfeld, M. G. (1991). POU-domain transcription factors: pou-er-ful developmental regulators. **Genes Dev** 5, 897-907.
- Samardzic, T., Gerlach, J., Muller, K., Marinkovic, D., Hess, J., Nitschke, L., and Wirth, T. (2002). CD22 regulates early B cell development in BOB.1/OBF.1-deficient mice. **Eur J Immunol** 32, 2481-2489.
- Samardzic, T., Marinkovic, D., Danzer, C. P., Gerlach, J., Nitschke, L., and Wirth, T. (2002). Reduction of marginal zone B cells in CD22-deficient mice. **Eur J Immunol** 32, 561-567.
- Sato, S., Jansen, P. J., and Tedder, T. F. (1997). CD19 and CD22 expression reciprocally regulates tyrosine phosphorylation of Vav protein during B lymphocyte signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A** 94, 13158-13162.
- Sato, S., Miller, A. S., Inaoki, M., Bock, C. B., Jansen, P. J., Tang, M. L., and Tedder, T. F. (1996). CD22 is both a positive and negative regulator of B lymphocyte antigen receptor signal transduction: altered signaling in CD22-deficient mice. **Immunity** 5, 551-562.
- Schaffner, W. (1989). How do different transcription factors binding the same DNA sequence sort out their jobs? **Trends Genet** 5, 37-39.
- Schamel, W. W., and Reth, M. (2000). Monomeric and oligomeric complexes of the B cell antigen receptor. **Immunity** 13, 5-14.
- Scheidereit, C., Cromlish, J. A., Gerster, T., Kawakami, K., Balmaceda, C. G., Currie, R. A., and Roeder, R. G. (1988). A human lymphoid-specific transcription factor that activates immunoglobulin genes is a homoeobox protein. **Nature** 336, 551-557.
- Schubart, D. B., Sauter, P., Massa, S., Friedl, E. M., Schwarzenbach, H., and Matthias, P. (1996). Gene structure and characterization of the murine homologue of the B cell-specific transcriptional coactivator OBF-1. **Nucleic Acids Res** 24, 1913-1920.
- Sgroi, D., Varki, A., Braesch-Andersen, S., and Stamenkovic, I. (1993). CD22, a B cell-specific immunoglobulin superfamily member, is a sialic acid-binding lectin. **J Biol Chem** 268, 7011-7018.

- Simmons, D., and Seed, B. (1988). Isolation of a cDNA encoding CD33, a differentiation antigen of myeloid progenitor cells. **J Immunol** 141, 2797-2800.
- Smith, K. G. C., Tarlinton, D. M., Doody, G. M., Hibbs, M. L., and Fearon, D. T. (1998). Inhibition of the B cell by CD22: a requirement for Lyn. **J Exp Med** 187, 807-811.
- Somani, A. K., Yuen, K., Xu, F., Zhang, J., Branch, D. R., and Siminovitch, K. A. (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, 1938-1944.
- Sproul, T. W., Malapati, S., Kim, J., and Pierce, S. K. (2000). Cutting edge: B cell antigen receptor signaling occurs outside lipid rafts in immature B cells. **J Immunol** 165, 6020-6023.
- Stamenkovic, I., and Seed, B. (1990). The B-cell antigen CD22 mediates monocyte and erythrocyte adhesion. **Nature** 345, 74-77.
- Stamenkovic, I., Sgroi, D., and Aruffo, A. (1992). CD22 binds to alpha-2,6-sialyltransferase-dependent epitopes on COS cells. **Cell** 68, 1003-1004.
- Staudt, L. M., and Lenardo, M. J. (1991). Immunoglobulin gene transcription. **Annu Rev Immunol** 9, 373-398.
- Staudt, L. M., Singh, H., Sen, R., Wirth, T., Sharp, P. A., and Baltimore, D. (1986). A lymphoid-specific protein binding to the octamer motif of immunoglobulin genes. **Nature** 323, 640-643.
- Stoddart, A., Ray, R. J., and Paige, C. J. (1997). Analysis of murine CD22 during B cell development: CD22 is expressed on B cell progenitors prior to IgM. **Int Immunol** 9, 1571-1579.
- Strubin, M., Newell, J. W., and Matthias, P. (1995). OBF-1, a novel B cell-specific coactivator that stimulates immunoglobulin promoter activity through association with octamer-binding proteins. **Cell** 80, 497-506.
- Sturm, R. A., Das, G., and Herr, W. (1988). The ubiquitous octamer-binding protein Oct-1 contains a POU domain with a homeo box subdomain. **Genes Dev** 2, 1582-1599.
- Sturm, R. A., and Herr, W. (1988). The POU domain is a bipartite DNA-binding structure. **Nature** 336, 601-604.
- 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, 31-40.
- Takata, M., Sabe, H., Hata, A., Inazu, T., Homma, Y., Nukada, T., Yamamura, H., and Kurosaki, T. (1994). Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor-coupled Ca²⁺ mobilization through distinct pathways. **EMBO J** 13, 1341-1349.
- Tedford, K., Nitschke, L., Girkontaite, I., Charlesworth, A., Chan, G., Sakk, V., Barbacid, M., and Fischer, K. D. (2001). Compensation between Vav-1 and Vav-2 in B cell development and antigen receptor signaling. **Nat Immunol** 2, 548-555.
- Thomas, M. L., and Brown, E. J. (1999). Positive and negative regulation of Src-family membrane kinases by CD45. **Immunol Today** 20, 406-411.

- Tiegs, S. L., Russell, D. M., and Nemazee, D. (1993). Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. **J Exp Med** 177, 1009-1020.
- Tooze, R. M., Doody, G. M., and Fearon, D. T. (1997). Counterregulation by the coreceptors CD19 and CD22 of MAP kinase activation by membrane immunoglobulin. **Immunity** 7, 59-67.
- Torres, R. M., Flaswinkel, H., Reth, M., and Rajewsky, K. (1996). Aberrant B cell development and immune response in mice with a compromised BCR complex. **Science** 272, 1804-1808.
- Tuscano, J., Engel, P., Tedder, T. F., and Kehrl, J. H. (1996). Engagement of the adhesion receptor CD22 triggers a potent stimulatory signal for B cells and blocking CD22/CD22L interactions impairs T-cell proliferation. **Blood** 87, 4723-4730.
- Tuscano, J. M., Engel, P., Tedder, T. F., Agarwal, A., and Kehrl, J. H. (1996). Involvement of p72syk kinase, p53/56lyn kinase and phosphatidylinositol-3 kinase in signal transduction via the human B lymphocyte antigen CD22. **Eur J Immunol** 26, 1246-1252.
- van der Merwe, P. A., Crocker, P. R., Vinson, M., Barclay, A. N., Schauer, R., and Kelm, S. (1996). Localization of the putative sialic acid-binding site on the immunoglobulin superfamily cell-surface molecule CD22. **J Biol Chem** 271, 9273-9280.
- Vivier, E., and Daeron, M. (1997). Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. **Immunol Today** 18, 286-291.
- Wang, D., Feng, J., Wen, R., Marine, J. C., Sangster, M. Y., Parganas, E., Hoffmeyer, A., Jackson, C. W., Cleveland, J. L., Murray, P. J., and Ihle, J. N. (2000). Phospholipase Cgamma2 is essential in the functions of B cell and several Fc receptors. **Immunity** 13, 25-35.
- Weinstein, J., Lee, E. U., McEntee, K., Lai, P. H., and Paulson, J. C. (1987). Primary structure of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase. Conversion of membrane-bound enzyme to soluble forms by cleavage of the NH2-terminal signal anchor. **J Biol Chem** 262, 17735-17743.
- Wienands, J., Larbolette, O., and Reth, M. (1996). Evidence for a preformed transducer complex organized by the B cell antigen receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A** 93, 7865-7870.
- Wienands, J., Schweikert, J., Wollscheid, B., Jumaa, H., Nielsen, P. J., and Reth, M. (1998). SLP-65: a new signaling component in B lymphocytes which requires expression of the antigen receptor for phosphorylation. **J Exp Med** 188, 791-795.
- Wilson, G. L., Fox, C. H., Fauci, A. S., and Kehrl, J. H. (1991). cDNA cloning of the B cell membrane protein CD22: a mediator of B-B cell interactions. **J Exp Med** 173, 137-146.
- Wolf, I., Pevzner, V., Kaiser, E., Bernhardt, G., Claudio, E., Siebenlist, U., Forster, R., and Lipp, M. (1998). Downstream activation of a TATA-less promoter by Oct-2, Bob1, and NF-kappaB directs expression of the homing receptor BLR1 to mature B cells. **J Biol Chem** 273, 28831-28836.
- Wu, Y., Nadler, M. J., Brennan, L. A., Gish, G. D., Timms, J. F., Fusaki, N., Jongstra Bilen, J., Tada, N., Pawson, T., Wither, J., Neel, B. G., and Hozumi, N. (1998). The B-cell transmembrane protein CD72 binds to and is an in vivo substrate of the protein tyrosine phosphatase SHP-1. **Curr Biol** 8, 1009-1017.

Yohannan, J., Wienands, J., Coggeshall, K. M., and Justement, L. B. (1999). Analysis of tyrosine phosphorylation-dependent interactions between stimulatory effector proteins and the B cell co-receptor CD22. **J Biol Chem** 274, 18769-18776.

Zacchai, N., Maenaka, K., Maenaka, T., Crocker, P., Brossmer, R., Kelm, S., and Jones, Y. (2003). Structure-based design of Siglec Inhibitors and crystallographic analysis in complex with sialoadhesin. **Structure**, in press.

Zhang, W., Tribble, R. P., and Samelson, L. E. (1998). LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. **Immunity** 9, 239-246.

Zwilling, S., Annweiler, A., and Wirth, T. (1994). The POU domains of the Oct1 and Oct2 transcription factors mediate specific interaction with TBP. **Nucleic Acids Res** 22, 1655-1662.

Zwilling, S., Konig, H., and Wirth, T. (1995). High mobility group protein 2 functionally interacts with the POU domains of octamer transcription factors **EMBO J** 14, 1198-1208.

J

7 Zusammenfassung

CD22 ist ein B-zellspezifisches Transmembranprotein der Immunglobulin (Ig)-Superfamilie. Es übernimmt zwei unterschiedliche Aufgaben. Zum einen hat CD22 eine inhibitorische Wirkung auf das BZR-Signal. Nach BZR-Ligation lagert sich die Tyrosin-Phosphatase SHP-1 an die cytoplasmatische Domäne von CD22 an, wodurch SHP-1 aktiviert wird. Durch die dephosphorylierende Aktivität der Phosphatase moduliert sie das BZR-Signal. Zum anderen ist CD22 ein Adhäsionsmolekül, das in die Gruppe der Siglecs (Sialic acid-binding Ig-like lectin) gehört. Die N-terminale Ig-Domäne von CD22 weist die Bindungseigenschaften eines Lectins auf und bindet spezifisch α 2,6-gekoppelte Sialinsäure. Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, die inhibitorische Wirkung von CD22 auf das BZR-Signal molekular zu definieren. Daher wurde das Substrat der an CD22 rekrutierten und aktivierten Phosphatase SHP-1 in vergleichenden Analysen von CD22-defizienten und Kontroll-B-Zellen nach BZR-Stimulation gesucht. Wir konnten zeigen, dass in CD22-defizienten B-Zellen nach BZR-Stimulation das Adaptermolekül SLP-65, auch BLNK oder BASH genannt, früher und stärker Tyrosin-phosphoryliert vorliegt, als in Kontroll-B-Zellen.

Transfektionsexperimente mit der CD22-defizienten Plasmazytom-Zelllinie J558L μ m3 wurden begonnen, um den molekularen Zusammenhang zwischen CD22, SHP-1 und SLP-65/BLNK zu bestätigen. Das in J558L μ m3 Zellen ektopisch exprimierte CD22 wurde Tyrosin-phosphoryliert, und SHP-1 konnte mit CD22 co-präzipitiert werden. Jedoch war in den CD22-Transfektanten keine Reduktion der Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK nach BZR-Stimulation im Vergleich zu untransfizierten Zellen nachweisbar. Da in unabhängigen Experimenten die Liganden-Bindung von CD22 als Voraussetzung für die inhibitorische Wirkung von CD22 deutlich wurde, etablierten wir α 2,6 Sialinsäure- und CD22-positive J558L μ m3 Doppeltransfektanten. Auf diesen konnte die cis-Maskierung von CD22 nachgewiesen werden. In Stimulationsexperimenten der Doppeltransfektanten wurde die reduzierte Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK in Abhängigkeit von CD22 in der Mehrzahl der Klone bestätigt. Allerdings mussten die Resultate in Frage gestellt werden, als in den meisten Klonen einer Kontrolltransfektion ebenfalls eine Reduktion der Tyrosin-Phosphorylierung von SLP-65/BLNK festgestellt wurde.

Um den Einfluss von CD22 und SLP-65 auf das BZR-Signal zu klären, wurden CD22- und SLP-65-defiziente Mäuse gekreuzt. Durch die zusätzliche Deletion von CD22 in SLP-65^{-/-} Mäusen konnte das Ca²⁺-Signal nach BZR-Stimulation wieder hergestellt werden. Jedoch zeigte die weitere Analyse der doppel-defizienten Mäuse, dass in der Regel der Phänotyp der SLP-65-defizienten Mäuse dominiert. Diese Ergebnisse verdeutlichten, dass das

Adaptermolekül SLP-65/BLNK zwar ein Substrat des CD22/SHP-1 Signalweges ist, aber keine essentielle Rolle in der inhibitorischen Wirkung von CD22 übernimmt.

Weiterhin wurde der Einfluss der Ligandenbindung von CD22 auf dessen intrazelluläre, inhibitorische Wirkung auf das BZR-Signal untersucht. Ein synthetisches Sialoside stand zur Verfügung, das hochspezifisch die Interaktion von CD22 mit dessen Liganden stört. Wurden die Zellen einer humanen B-Zelllinie in Gegenwart des Sialosids über den BZR stimuliert, konnte ein erhöhtes Ca^{2+} -Signal gemessen werden. Dieses Resultat erinnerte an die stärkere Ca^{2+} -Mobilisierung in CD22-defizienten B-Zellen. Entsprechend war die Tyrosin-Phosphorylierung von CD22 nach Vorbehandlung mit dem Sialosid in den humanen B-Zellen verringert, und weniger SHP-1 konnte mit CD22 co-präzipitiert werden. Mit diesen Ergebnissen wurde deutlich, dass die Adhäsionsdomäne von CD22 einen direkten, positiven Einfluss auf die intrazelluläre, inhibitorische Domäne von CD22 hat.

Als Nebenprojekt wurde die Rolle von CD22 in knock-out Mäusen des transkriptionellen Co-Aktivators BOB.1/OBF.1 untersucht. Ein Entwicklungsblock im transitionalen B-Zellstadium im Knochenmark der BOB.1/OBF.1-defizienten Mäuse verursacht eine deutliche Reduktion reifer B-Zellen in der Milz. Die Analyse des Knochenmarks der BOB.1/OBF.1-defizienten Mäuse zeigte, dass ausschließlich die Expression von CD22 auf den B-Vorläufer Zellen erhöht war. Nach zusätzlicher Deletion von CD22 in BOB.1/OBF.1^{-/-} Mäusen war nach BZR-Stimulation ein deutliches Ca^{2+} -Signal in den doppel-defizienten B-Zellen messbar. Dieses könnte die normalisierte Anzahl transistionaler B-Zellen im Knochenmark und die gestiegene Anzahl reifer B-Zellen in der Milz der doppel-defizienten Mäuse bewirken. Allerdings waren die doppel-defizienten Mäuse, entsprechend den BOB.1/OBF.1^{-/-} Mäusen, nicht in der Lage, eine humorale Immunantwort einzuleiten oder Keimzentren zu bilden. Die Proliferation von CD22-defizienten B-Zellen nach LPS-Stimulation verlief unabhängig von der An- oder Abwesenheit von BOB.1/OBF.1. Mit den Untersuchungen konnten wir zeigen, dass die Differenzierungsschwierigkeiten der BOB.1/OBF.1-defizienten B-Zellen vom BZR-Signal abhängen. Allerdings muss das Ausbleiben der Keimzentrenbildung auf einen anderen Mechanismus zurückgeführt werden.

8 Summary

CD22 is a B cell-specific transmembran protein of the Immunoglobulin (Ig) superfamily, which has two distinct functions. On the one hand, CD22 acts as a negative regulator of the BCR-signal. Upon BCR-ligation the tyrosine phosphatase SHP-1 associates with the cytoplasmatic tail of CD22 leading to the activation of SHP-1. The activated tyrosine phosphatase dephosphorylates signaling molecules within the BCR-signaling cascade, thereby inhibiting the BCR-signal. On the other hand, CD22 is an adhesion molecule belonging to the Siglec family (Sialic acid-binding Ig-like lectin). The N-terminal Ig-domain confers lectin function by specifically binding to α 2,6-linked sialic acid. The main focus of this thesis was to molecularly define the inhibitory role of CD22 on the BCR-signal. Therefore, we looked for possible substrates of the tyrosine phosphatase SHP-1 by comparing the tyrosine phosphorylation level of proximal signaling molecules upon BCR-stimulation in CD22-deficient and control-B-cells. The adaptor protein SLP-65, also called BLNK or BASH, was earlier and stronger tyrosine-phosphorylated in CD22-deficient B-cells, compared to control-B-cells upon BCR-stimulation.

Reconstitution experiments were started with the CD22-deficient plasmacytoma cell-line J558L μ m3 to demonstrate the molecular correlation between CD22, SHP-1, and SLP-65/BLNK. Ectopically expressed CD22 was tyrosine-phosphorylated in transfected J558L μ m3 cells and SHP-1 could be co-precipitated with CD22. However, the tyrosine-phosphorylation level of SLP-65/BLNK was unaffected or even increased in CD22-positive J558L μ m3 transfectants upon stimulation. In the meantime we were able to show that the adhesion domain of CD22 has a direct influence on the inhibitory role of CD22. Therefore, plasmacytoma cells were established stably expressing α 2,6 sialic acid and CD22. On those cis-masking of CD22 could be detected. The tyrosine-phosphorylation level of the adaptor molecule SLP-65/BLNK was decreased in most of the double-transfected J558L μ m3 clones depending on the expression of CD22. But the obtained results had to be questioned when the tyrosine-phosphorylation of SLP-65/BLNK was also decreased in most of the clones of a control-transfection.

To further analyze the mechanism of BCR-signal regulation by CD22 and SLP-65, CD22- and SLP-65-deficient mice were crossed. The additional deletion of CD22 in SLP-65^{-/-} mice restored the Ca²⁺-signal in double-deficient B-cells upon BCR-stimulation. Further analysis of SLP-65xCD22-double-deficient mice revealed that the phenotype of the SLP-65^{-/-} mice was dominant in most of the explored aspects. Therefore, we concluded that the adaptor protein

SLP-65/BLNK is a substrate of the CD22/SHP-1 pathway but not crucial for mediating the inhibitory function of CD22.

So far it was not known whether the ligand-binding of CD22 influences its intracellular signaling domain. To investigate this question we used a synthetic sialoside, which specifically binds to the lectin domain of CD22 and thereby interferes with the ligand-binding. When cells of a human B cell-line were stimulated with anti-IgM in the presence of this sialoside, a higher Ca^{2+} -signal was observed, similar to the one measured in CD22-deficient B-cells. Accordingly, a lower tyrosine-phosphorylation of CD22 and less SHP-1 recruitment was demonstrated in the presence of this sialoside in those human B-cells. Thus, by interfering with the ligand binding of CD22 on the B-cell surface, we have shown that the lectin domain of CD22 has a direct, positive influence on its intracellular inhibitory domain.

As a side project we investigated the role of CD22 in mice lacking the transcriptional co-activator BOB.1/OBF.1. A developmental block at the transitional B cell stage in the bone marrow of BOB.1/OBF.1-deficient mice causes a reduced number of splenic B cells. By analyzing the bone marrow of BOB.1/OBF.1^{-/-} mice, we found that the expression of CD22 is selectively increased on B-lineage cells. Furthermore, the Ca^{2+} -signal in BOB.1/OBF.1-deficient B-cells was restored upon BCR-stimulation, when CD22 was additionally deleted. The increased Ca^{2+} -signal could cause the normal number of transitional B cells in the bone marrow and the increased number of mature B-cells in the spleen of BOB.1/OBF.1xCD22-double-deficient mice. Nevertheless, double-deficient animals were unable to mount humoral immune response and to form germinal centers as has been described for BOB.1/OBF.1-deficient mice. Finally, CD22-deficient B-cells proliferate independently of BOB.1/OBF.1 upon stimulation with LPS. These studies suggest that the differentiation defect of B-cells observed in BOB.1/OBF.1^{-/-} mice is BCR-signal dependent. However, the impairment of BOB.1/OBF.1^{-/-} B-cells to form germinal centers is caused by a different mechanism.

9 Erklärung

Erklärung gemäß § 4 Absatz 3 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg vom 15. März 1999.

1. Ich erkläre ehrenwörtlich, die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt zu haben und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben.
2. Ich erkläre des weiteren, dass die vorliegende Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.
3. Ich erkläre weiterhin, dass ich früher keine akademischen Grade erworben habe oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, den 21. April 2003

Judith Gerlach

10 Publikationsliste

10.1 Originalarbeiten aus dieser Doktorarbeit

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, 1207-1390.

Samardzic*, T., **Gerlach***, J., Müller, K., Marinkovic, D., Hess, J., Nitschke, L., and Wirth, T. (2002). CD22 regulates early B cell development in BOB.1/OBF.1-deficient mice. **Eur J Immunol** 32, 2481-2489.

Samardzic, T., Marinkovic, D., Danzer, C. P., **Gerlach, J.**, Nitschke, L., and Wirth, T. (2002). Reduction of marginal zone B cells in CD22-deficient mice. **Eur J Immunol** 32, 561-567.

Gerlach, J., Jumaa, H., Wienands, J., Reth Nitschke, L. SLP-65/BLNK is a substrate of the CD22/SHP-1 pathway but not crucial for mediating the inhibitory function of CD22 (manuscript in preparation)

*authors contributed equally to this work

10.2 Publikationen auf Kongressen/Tagungen

XXX. Tagung der Gesellschaft für Immunologie (1999), Hannover: **Gerlach, J.**, Carsetti, R., Nitschke, L. Modulation of the B cell receptor signalling by CD22. **Immunobiology** 200 314-315, Posterpräsentation und Vortrag

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

6th Joint Meeting Signal Transduction Society (STS) "Signal Transduction: Receptors, Mediators and Genes", Weimar: **Gerlach, J.**, Kelm, S., Brossmer, R., Danzer, C.-P., Nitschke, L. Sialic-acid binding of CD22 is required for inhibition of the BCR signal, Posterpräsentation

11 Curriculum Vitae

Judith Gerlach

20.12.1972 in Langen (Hessen) geboren

Schul- und Hochschulbildung

- 1979 - 1983 **Josef-von-Eichendorff-Schule in Obertshausen**
- Besuch der Grundschule
- 1983 - 1992 **Marienschule der Ursulinen, Offenbach**
- Besuch des Gymnasiums
- 1992 – 1998 **Julius-Maximilians-Universität, Würzburg**
- Immatrikulation zum Studium der Biologie
 - 1994 Vordiplom
 - 1997 Diplomprüfung in Genetik, Immunologie/Virologie, Tierphysiologie
- 1997 - 1998 **Diplomarbeit am Institut für Virologie und Immunbiologie, Universität Würzburg**
- Thema: "Vergleichende Analyse der Signaltransduktionskaskade nach BZR-Stimulation von CD22-defizienten und Kontrollmäusen"
 - Betreuung durch Prof. Dr. A. Schimpl und PD Dr. L. Nitschke
- 1995 - 1996 **University of Texas at Austin**
- Exchange Student Scholarship
 - 6 Monate Labortätigkeit bei Prof. P. Tucker
- Seit 1999 **Dissertation am Institut für Virologie und Immunbiologie, Universität Würzburg**
- Thema: "Modulation des B-Zellrezeptorsignals durch CD22 nach Stimulation der B-Zelle"
 - Betreuung durch PD Dr. L. Nitschke und Prof. Dr. A. Schimpl

12 Danksagung

Aus dem „aufgezwungenen“ Immuno-Praktikum (DANKE Prof. Hünig!) während des Hauptstudiums wurden einige Jahre in den unergründlichen Mauern des Institutes für Virologie und Immunbiologie, die gefüllt mit viel Arbeit, viel Gelächter und auch mit vielen Freunden wie im Flug vergingen.

BEDANKEN MÖCHTE ICH MICH IM BESONDEREN

bei Lars Nitschke für die unterstützende Betreuung, die interessanten Gespräche und das Vertrauen in meine Fähigkeiten. Auch wenn es mir manchmal schwerfiel, die optimistischen Ergebnisinterpretationen von Lars anzunehmen, so hatte er glücklicherweise am Ende doch meistens Recht.

bei Frau Prof. Dr. A. Schimpl und Prof. Dr. T. Hünig für ihr Interesse und ihre Motivation. Wann auch immer ein scheinbar auswegloser Punkt erreicht war, Frau Prof. Schimpl hatte eine erfolgsversprechende Idee parat.

bei Prof. Dr. E. Buchner, der ohne zu zögern die Betreuung meiner Doktorarbeit im Fachbereich der Biologie übernahm.

bei „meinem Labor 212“ - besonders Yvonne, deren ruhige und geduldige Art mich oft wieder auf den Boden zurückholte, und wir Freundinnen wurden. Auch bei Claus, Jörg, Alexa, Astrid und Carolin bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit.

bei ALLEN, die die Atmosphäre in der „Immo“ so freundlich machen. Vermissen werde ich den Kaffee bei „den Berberichs“ - Andrea, Chris, Marco und Claudia sei für ihre liebe Freundschaft gedankt und Beate für ihre leuchtenden Augen, wenn ihr etwas auf der Zunge brannte. Dem Western-Blot-Spezialisten Kevin danke ich für seine endlosen Tipps. Auch werde ich nie „die alte Garde“ vergessen – besonders vermisse ich Nora, die immer Rat wusste. Bedanken möchte ich mich auch bei Frank, Astrid, Marta und Sabine.

Bei meinen Freunden ausserhalb der „Immo“ – den Wecks für ihre Herzlichkeit, Kerstin für ihre Freundschaft, Tina für ihre Perspektiven, Matze für seine liebe Art, Otti für ihre Treue, Vera für ihre „magic hands“, Sabse für ihre Meinung, Klaus für seinen Witz und Kerstin Müller für den Satz: „Durchhalten, es kann nur besser werden....“

13 Anhang

13.1 Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
APZ	Antigen präsentierende Zelle
bio	biotinyliert
BOB.1	B-cell Specific Octamer-Motife Binding Protein
bp	Basenpaare
BZR	B-Zellrezeptor
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Cluster of differentiation; Oberflächenantigen
cDNA	complementary DNA
Ci	Curie
CO ₂	Kohlendioxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECL	Enhanced-Chemiluminescence-System
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym-linked-immunosorbent Assay
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	Fluorescens Associated Cell Sorting
FCS	fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
°C	Grad Celsius
g	gramm
h	hour
hAk	humaner Antikörper
hi	high
H ₂ O	Wasser
HSA	Heat Stable Antigen
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif
k.o.	knock-out
l	Liter
LB	L-Broth Medium
lo	low
LPS	Lipopolysaccharid
m	milli
M	Molarität
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
mAk	muriner Antikörper
MHC	Major-Histokompatibility-Complex

mlg	membranständiges Immunglobulin
MZ	Marginalzone
Neu5Ac	NeuAc α 2,6 lacNAc
Neu5Gc	NeuGc α 2,6 lacNAc
OBF.1	Octamer-Binding Factor.1
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PALS	periarteriolare lymphatische Scheide
PBS	Phosphat gepufferte Salzsäure
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PH	Peckstrin-Homologie Domäne
PIP	Phosphatidyl-Inositol-Phosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute
RPMI	RPMI 1640 (Roswell Parker Memorial Institute), Kulturmedium
RPMI ⁻	RPMI ohne Supplement Complete
RPMI ⁺	RPMI mit Supplement Complete und 5% FCS
RT	Raumtemperatur
PTK	Protein-Tyrosin-Kinase
SC	Supplement Complete
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde
SH	src-Homologie Domäne
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TD	thymus-abhängig
TH	T-Helfer Zelle
TI	thymus-unabhängig
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
TZR	T-Zellrezeptor
NP40	Nonidet-40
U	Units (Einheit für Enzymaktivität)