



**Bayerische Julius - Maximilians-
Universität**

Fakultät für Biologie

Institut für Virologie und Immunbiologie

Verwendung von Gene Targeting Techniken zur Etablierung neuer Mauslinien mit Mutationen in B Zell Signalwegen

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

vorgelegt von

Jörg Klein

aus Bretten/Karlsruhe

Würzburg, Februar 2005

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

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

Gutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. Erich Buchner

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, daß ich die Dissertation „Verwendung von Gene Targeting Techniken zur Etablierung neuer Mauslinien mit Mutationen in B Zell Signalwegen“ selbstständig angefertigt, und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom März 1998 bis zum Juli 2003 am Institut für Virologie und Immunbiologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Anleitung von Dr. rer. nat. habil. Lars Nitschke angefertigt.

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

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

Würzburg, den

Jörg Klein

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt...

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Lars Nitschke für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die ausgezeichnete Betreuung, stete Zugänglichkeit für Themen jeder Art.

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

Herrn Prof. Dr. Thomas Hünig für die Bereitstellung eines ausgezeichneten Arbeitsumfeldes und der Möglichkeit am Institut für Virologie und Immunbiologie diese Dissertation anfertigen zu können.

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

allen jetzigen und früheren Mitarbeitern im Institut für Virologie und Immunologie für eine Zusammenarbeit in einem angenehmen und freundlichen Umfeld.

Herrn Dr. Burkhard Kneitz für die vielen investierten Stunden bei allen durchgeführten Injektionsexperimenten, steter Hilfsbereitschaft und gleichbleibender freundlicher Gelassenheit.

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

Ganz besonderer nicht in Worte zu fassender Dank gilt Carolin, die immer für mich da war und mir all ihre menschenmögliche Unterstützung zukommen ließ und läßt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Kurzer Überblick über das Immunsystem.....	1
1.2 B-Zellrezeptor, Entwicklung und Funktion von B Lymphozyten.....	2
1.3 Der B-Zell Rezeptor und dessen Signalleitung.....	4
1.4 CD22 (Siglec2) Struktur und Funktion.....	8
1.5 Intrazelluläre Signaltransduktion durch CD22.....	9
1.6 Die extrazelluläre CD22 Domäne.....	12
1.7 Sialinsäurebindende immunoglobulinähnliche Lectine.....	14
1.8 hSiglec 10 bzw. mSiglec G, ein neues Mitglied der Siglec Proteinfamilie.....	16
1.9 Generierung einer B-Zell spezifischen SMAD2-defizienten Maus.....	18
1.10 Transforming growth factor- β (TGF- β) und SMAD Transkriptionsfaktoren.....	19
1.11 Zielsetzung der Doktorarbeit.....	22
2. Material und Methoden	24
2.1 Bezugsquellen für Chemikalien und Enzyme.....	24
2.2 Synthetische Nucleinsäuren.....	24
2.3 Bakterienstämme.....	24
2.4 Medien für Bakterienkulturen.....	25
2.5 Die DNA-Arbeitsmethodik.....	25
2.5.1 Restriktionsenzyme und Gelelektrophorese.....	25
2.5.2 DNA-Gelelektion.....	26
2.5.3 UV-Spektrometrie.....	27
2.5.4 Ligation von DNA-Fragmenten.....	27
2.5.5 Ligation eines DNA-Fragments mit einem Vektor.....	28
2.5.6 Transformation der rekombinanten DNA in kompetente Bakterienzellen.....	28
2.5.7 Transformationsvorgang.....	29
2.5.8 Alkalische Isolation von Plasmiden aus Bakterienkulturen.....	30
2.5.9 Isolation genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen.....	31
2.5.10 Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol Reinigung und Fällung.....	31
2.5.11 Polymerase Chain Reaction.....	32
2.5.12 Southern Blot.....	33
2.5.13 Screenen von DNA-Fragmenten durch radioaktive Hybridisierung.....	34
2.5.14 Herstellung radioaktiver Sonden.....	34
2.5.15 Reinigung der Sonden, Hybridisierung und Autoradiographie.....	35
2.5.16 Sequenzierung von Plasmiden und genomischer DNA.....	36
2.6 ES-Zellarbeitsmethodik.....	37
2.6.1 Zellkulturmaterialien und grundlegende Arbeitstechniken.....	37
2.6.2 Gewinnung und Testen von LIF.....	38
2.6.3 Testen von neuen FCS-Chargen.....	39
2.6.4 Herkunft, Gewinnung und Kultivierung von ES-Zellen.....	39

2.6.5 Isolation von primären embryonalen Fibroblasten	39
2.6.6 Verwendung und Behandlung von EMFIS.....	40
2.6.7 Propagieren von EMFIS und ES-Zellen.....	40
2.6.8 Transfektion von ES-Zellen	40
2.6.9 Selektion und Kultivierung resistenter ES-Zellklone	41
2.6.10 Cre-Transfektion von homolog rekombinierten ES-Zellklonen	42
2.6.11 Vorbereitung von ES-Zellen für das Injizieren	43
2.6.12 Blastozystengewinnung, Mikroinjektion von ES-Zellen und Reimplantation	43
2.7 Immunologische und Proteinchemische Methoden	44
2.7.1 ELISA.....	44
2.7.2 ELISPOT-assay	44
2.7.3 Durchflußcytometrie/FACS	45
2.8 Präparation von Organen, Seren und Immunisierungen	46
2.8.1 Präparation von Milzzellen.....	46
2.8.2 Präparation von Knochenmarkzellen.....	47
2.8.3 Präparation von peritonealen Zellen.....	47
2.8.4 Immunisierungsprotokoll und Präparation von Seren	47
3. Ergebnisse	48
3.1 Generierung einer CD22R130E knock in Maus	48
3.1.1 Etablierung einer Screening-Target-PCR	55
3.1.2 Übersicht über die verwendeten ES-Zelllinien.....	58
3.1.3 Gene Targeting Experimente mit der C57BL/6-III ES-Zelllinie	59
3.1.4 Bestätigung der Target-PCR positiven ES-Zellklone mittels Southern-blot.....	61
3.1.5 Wahl und Isolation einer radioaktiven DNA-Sonde.....	62
3.1.6 Southern-blot Ergebnisse von C57BL/6-III ES-Zellklonen.....	63
3.1.7 Bestätigung von Southern-blot positiven ES-Zellklonen mittels spezifischer Mutations-PCR und Sequenzierung	67
3.1.8 Cre-Transfektion von C57BL/6-III ES-Zellklonen zur in vitro Deletion der Selektionskassette	70
3.1.9 Blastocysteninjektion mit der C57BL/6-III ES-Zelllinie.....	72
3.1.10 Targetvektorveränderungen im Hinblick auf Infertilität bei Männchen durch das HSV-Tk Gen.....	74
3.1.11 Veränderungen der ES-Zell Kulturbedingungen.....	75
3.1.12 Gene Targeting mit der BALB/c-I ES-Zelllinie	75
3.1.13 Gene Targeting Experimente mit der E14Tg2a ES-Zelllinie.....	76
3.1.14 Southern-blot Ergebnisse von E14Tg2a ES-Zellklonen	77
3.1.15 Blastocysteninjektionsexperimente mit der E14Tg2a ES-Zelllinie.....	79
3.2 Generierung einer Siglec G knock out Maus	82
3.2.1 Gene Targeting Experimente mit der BalbI ES-Zelllinie	86
3.2.2 Bestätigung der Target-PCR positiven ES-Zellklone mittels Southern-blot.....	89
3.2.3 Überblick über Blastocysteninjektionsexperimente und Experimente	91

3.3 Generierung einer B-Zell spezifischen SMAD2 k.o. Maus	93
3.3.1 Gene Targeting- und Southern-blotstrategie	93
3.3.2 Proliferationsassays.....	96
3.3.3 FACS-Analyse von B-Zellpopulationen	97
3.3.4 B1-Zellen des Peritoneums	99
3.3.5 B-Zellen der Milz und B-Zellreifung	100
3.3.6 Totaler Serum Ig-Basislevel.....	101
3.3.7 Immunantwort auf TNP-Ovalbumin	102
3.3.8 IgA Produzenten in den Peyer's Patches	104
3.3.9 Analyse des Klassenwechsels zu IgA	106
4. Diskussion	109
4.1 Generierung einer CD22R130E Knock in Maus	109
4.1.1 Konstruktion des Targetvektors	109
4.1.2 Einschleusen des Targetvektors.....	112
4.1.3 Interpretation von PCR und Southern-blotergebnissen	113
4.1.4 Zur Verwendung der verschiedenen ES-Zelllinien	115
4.1.5 Neuere Ergebnisse über die Funktion der Ligandenbindung von CD22	121
4.2 Generierung einer SiglecG knock out Maus	122
4.3 Generierung einer B-Zell spezifischen Smad2 knock out Maus	124
5. Zusammenfassung	128
6. Summary	129
7. Literatur	132
7.1 Originalarbeiten	132
7.2 Publikationsliste	146
7.2.1 Originalarbeiten aus dieser Doktorarbeit.....	146
7.2.2 Publikationen auf Kongressen/Tagungen	146
8. Anhang	147
8.1 Verwendete Abkürzungen	147
9. Curriculum Vitae	150

1. Einleitung

1.1 Kurzüberblick über das Immunsystem

Der menschliche Organismus ist permanent von infektiösen Mikroorganismen umgeben, wie z.B. Viren, Bakterien, pathogenen Pilzen und eukaryotischen Parasiten, die alle verschiedene Krankheiten auslösen können. Kommt es zu einer Infektion schützt das Immunsystem den Organismus, hierbei unterscheidet man die unspezifische, angeborene Immunität und die spezifische, erworbene (adaptive) Immunität.

Alle die Immunität erzeugenden Leukozyten stammen von Vorläuferzellen im Knochenmark ab, sowohl die polymorphkernigen Leukozyten und Makrophagen der angeborenen Immunität, als auch die B- und T-Lymphozyten des adaptiven Immunsystems. Lymphozyten zirkulieren permanent im Blutgefäßsystem und im Lymphgefäßsystem, z.B. zu den peripheren lymphatischen Organen, wie Milz, Lymphknoten und darmassoziierten lymphatischen Gewebe (GALT; gut-associated lymphoid tissue), in denen Antigenkontakt stattfindet. Zudem existieren unstrukturierte lymphatische Gewebe, die zu den mucosaassoziierten Geweben zusammengefaßt werden. Die angeborene Immunität beruht auf einer Reaktion gegen allgemein vorkommende Merkmale von Krankheitserregern. Hier stehen vor allem Lysozym, Komplementfaktoren, Interleukine und aggressive chemische Verbindungen im Vordergrund. Involviert sind hierbei neutrophile Granulozyten und Monozyten bzw. Makrophagen. Der wichtigste Mechanismus ist wohl die Phagozytose, wobei die in das Phagosom aufgenommenen Mikroorganismen mit dem Lysosom verschmelzen und so eliminiert werden (durch Lysosomenzyme, H_2O_2 , O_2^- und 1O_2).

Die neutrophilen Granulozyten haben nur eine kurze Lebensdauer (1d), daher spielen in späteren Infektionsstadien die Monozyten/Makrophagen die entscheidende Rolle. Die Monozyten besitzen zwar eine niedrige Migrationsgeschwindigkeit, aber sind langlebiger als Makrophagen und haben eine länger andauernde Synthese von Lysosomenenzymen und Sekretion von Komplementfaktoren. Phagozyten zeigen im Allgemeinen eine Chemotaxis zu opsonierten (durch Komplementfaktoren und/oder Immunglobulinen markierten Mikroorganismen) Krankheitserregern. Zudem werden zur angeborenen Immunität lokal wandernde und endothelständige Makrophagen, sowie NK-Zellen, die bei der Elimination von virusbefallenen Zellen eine Rolle spielen, gerechnet.

Eine Art Brückenschlag zwischen angeborener und erworbener Immunität schlägt das Immunsystem durch Lymphozyten mit einem eingeschränkten Rezeptorrepertoire. Zu diesen gehören die NK T-Zellen, die $\gamma:\delta$ T-Zellen und B-Zellsubpopulationen, wie B1-Zellen und Marginalzonen B-Zellen (MZ; marginal zone B-cells). All diese Zellen bieten einen frühen, aber nicht dauerhaften Schutz vor Erregern.

Gegen alle Arten von Krankheitserregern und bei der Bildung eines immunologischen Gedächtnisses sind die Abwehrmechanismen des erworbenen, adaptiven Immunsystems die Frontlinie. Das Repertoire von Lymphozyten entsteht durch die sogenannte klonale Selektion. Hierdurch wird es möglich, daß praktisch

jedes Antigen erkannt werden kann, und die spezifischen Lymphozyten dann proliferieren und sich schließlich zu Effektorzellen entwickeln können, wenn sie auf körperfremde Antigene treffen. Die Effektorzellen tragen dann zur Elimination des Erregers bei, wobei ein Teil der Lymphozyten zu Gedächtniszellen differenziert, die sofort auf eine abermalige Infektion mit demselben Erreger reagieren können.

B-Zellen, die über ihren Antigenrezeptor und T-Helferzellen aktiviert werden, sezernieren Immunglobuline, die extrazelluläre Krankheitserreger opsonieren und durch ihren konstanten F_C -Teil die Bindung an verschiedene Effektorzellen vermitteln können (die sogenannte humorale Immunantwort). T-Zellen erkennen Haupt-histokompatibilitätskomplexe (MHC I und MHC II), bei MHC I-Komplexen werden cytosolische Peptidfragmente viraler Proteine präsentiert, wohingegen bei MHC II-Komplexen Peptidfragmente intrazellulärer Krankheitserreger (auf professionell antigenpräsentierenden Zellen) präsentiert werden. Angesprochen werden hierbei cytotoxische T-Zellen (T-Zell-Korezeptor CD8), die infizierte Zellen abtöten, und T-Helferzellen (T_H1 und T_H2 ; T-Zell-Korezeptor CD4), wobei T_H1 -Zellen Makrophagen direkt aktivieren (nachfolgend schütten diese Cytokine aus) und T_H2 B-Zellen aktivieren (sogenannte thymusabhängige Immunreaktion). Somit sind die verschiedenen T-Zellpopulationen für die zelluläre und humorale adaptive Immunantwort von Bedeutung. Durch die aufgezählten Mechanismen verfügt das Immunsystem über unterschiedliche Erkennungssysteme und ein breites Spektrum an Effektorreaktionen, um Krankheitserreger im Körper zu detektieren und zu eliminieren. (Silbernagl und Despopoulos 1991; Janeway et al. 1999)

Da sich unsere Arbeitsgruppe zu einem Großteil mit der B-Zellbiologie beschäftigt und sich das Hauptprojekt dieser Doktorarbeit auch auf ein für B-Zellen spezifisches Oberflächenprotein (CD22) bezieht, möchte ich hier kurz die Entwicklung und Funktion von B-Lymphozyten beschreiben.

1.2 B-Zellrezeptor, Entwicklung und Funktion von B Lymphozyten

Der wesentliche Beitrag der B-Zellen zur adaptiven Immunantwort ist, wie bereits oben erwähnt, die Produktion von antigenspezifischen Antikörpern (AK). Prinzipiell ist ein typisches AK-Molekül aus vier Polypeptidketten aufgebaut, je zwei identischen leichten und schweren Ketten. Die vier aminoterminalen Enden bilden hierbei die zwei sogenannten variablen Antigenbindungsstellen, und die carboxyterminalen Enden der schweren Ketten die sogenannte konstante Region, die für die Effektorfunktion der AK die entscheidende Rolle spielt. Die leichten Ketten sind über Disulfidbrücken an die schweren Ketten gekoppelt, sowie diese wiederum durch Disulfidbrücken aneinander gekoppelt sind. Durch diese Struktur ist es möglich, daß AK Antigene kreuzvernetzen können. Zusätzlich ergibt sich ein hoher Grad an Flexibilität durch die Gelenkregionen der schweren Ketten, die sich, wie auch die carboxyterminalen Enden bei den verschiedenen AK-Isotypen, unterscheiden und somit jeweils andere funktionelle Eigenschaften besitzen. Röntgenstrukturanalysen haben ergeben, daß die Spezifität und Affinität der AK-Antigenbindung durch die hypervariablen Schleifen der variablen Regionen zustande kommen, hierbei spielen

alle Arten von Wechselwirkungen (Wasserstoffbrücken, van-der-Waals-Kräfte und elektrostatische Wechselwirkungen) eine Rolle (Janeway et al. 1999).

Das große Repertoire von Antikörpern ergibt sich aus folgenden Mechanismen: Erstens sind eine gewisse Anzahl von Genen für die variable Region im Genom eines Organismus vorhanden, die die Grundlage für die Variabilität darstellen. Letztere wird abermals dadurch erhöht, daß separate V-, D- und J-Gensegmente zufällig rekombiniert werden können, und zudem deren Verknüpfungsstellen durch das Einfügen von einer zufälligen Anzahl von Nukleotiden variieren können. Schließlich wird die Diversität durch die Zusammenlagerung unterschiedlicher variabler Regionen der jeweiligen leichten und schweren Kette erhöht. Außerdem können die variablen Regionen bei einer Antigenstimulierung des exprimierten Rezeptors durch somatische Hypermutationen modifiziert werden. Durch diese Mechanismen ist es dem Organismus möglich, ein riesiges Repertoire an verschiedenen Antikörperspezifitäten zu erzeugen. Die konstanten Regionen der schweren Ketten legen den Isotyp des Immunglobulins fest. Ein produktiv umgelagerter variabler Genabschnitt wird zuerst mit den schweren μ - und δ -Ketten exprimiert. Durch den sogenannten Klassenwechsel bei spezifisch aktivierten B-Zellen kann es dann zu einer Umlagerung zu anderen Isotypen (IgG, IgA, IgE) kommen, die nun wiederum deren immunologische Funktion bestimmen. Immunglobuline kommen membranständig und in sezernierter Form vor, der Unterschied liegt hierbei lediglich in der Transkription und der darauffolgenden RNA-Prozessierung. Damit ein membranständiges Immunglobulin Signale in das Zellinnere weitergeben kann, muß es mit den Membranproteinen $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ einen Membrankomplex formen (Janeway et al. 1999).

Die B-Zellentwicklung beginnt im speziellen Mikromilieu des Knochenmarks, ausgehend von einer hämatopoetischen Stammzelle. Die Immunglobulingenombildung startet mit den VDJ-Gensegmenten der schweren Kette, in diesem Stadium spricht man von einer Pro-B-Zelle. Auf der nun folgenden Prä-B-Zelle wird diese schwere Kette zusammen mit einer sogenannten Ersatz-L-Kette (bestehend aus V_{preB} und $\lambda 5$) und $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ exprimiert. Über die kleine Prä-B-Zelle ohne Rezeptor an der Oberfläche entsteht nach Umordnung der leichten Kette VJ-Gensegmente die unreife B-Zelle mit dem B-Zellrezeptor IgM auf der Oberfläche. Ab diesem Stadium tritt die klonale Deletion in Kraft, um autoreaktive B-Zellen zu eliminieren. Bindung des entsprechenden Autoantigens führt entweder zum Zelltod, oder dem Zustand der Anergie. Nach dem Durchlaufen dieser negativen Selektion im Knochenmark entwickeln sich die B-Zellen zu sogenannten Transitionellen B-Zellen Typ1 (IgM^{hi} , IgD^{lo}) und wandern nun in die Milz. Auch hier sind die B-Zellen weiterhin der negativen Selektion unterworfen und entwickeln sich über verschiedene Stadien zu Transitionellen B-Zellen Typ2 (IgM^{hi} , IgD^{hi}). Von diesem Stadium an wird eine Entwicklung von B-Zellen in bestimmte Subkompartimente durch eine bisher unzureichend verstandene positive Selektion in Gang gesetzt. Somit entstehen aus dem Transitionellen B-Zellpool Typ2 vermutlich auch reife B-Zellen (B2: IgM^{lo} , IgD^{hi}). Zudem wird postuliert, daß Marginalzonen B-Zellen (MZ) und B1-Zellen, die hauptsächlich in der Peritonealhöhle angesiedelt sind, aus dem B-Zellpool Typ2 hervorgehen (Janeway et al. 1999).

Die B-Zellaktivierung, besonders durch monomere Proteine, erfordert die Bindung des Antigens durch den B-Zellrezeptor und zusätzlich die Wechselwirkung mit einer antigenspezifischen T-Helferzelle (T_H2 ; die bestimmte Cytokine ausschüttet und kostimulatorische Signale gibt). Durch die nun folgende klonale Expansion differenzieren die naiven B-Zellen zu antikörpersezernierenden Plasmazellen oder zu B-Gedächtniszellen. Es können in dieser Phase Veränderungen der Immunglobulinrezeptoren auftreten, die den Isotypen betreffen und andere Isotypen als IgM und IgD hervorbringen und zudem eine Affinitätsreifung durch somatische Hypermutation, somit findet eine selektive Expansion von hochaffinen Antikörpern statt. Diese Vorgänge finden in den Keimzentren statt, die ein spezielles Mikromilieu bieten, in denen Antigene durch folliculäre dendritische Zellen präsentiert werden (Janeway et al. 1999).

Es gibt auch Thymusunabhängige Antigene Typ2 (TI2-Antigene), die hauptsächlich B1- und Marginalzonen B-Zellen aktivieren können. Diese Antigene sind zumeist hochrepetitive Strukturen, wie zum Beispiel Zellwandpolysaccharide von Bakterien. Die Immunantwort tritt hierbei sehr schnell ein und ist auf die Isotypen IgM, IgG1 und IgG3 beschränkt (Janeway et al. 1999).

1.3 Der B-Zell Rezeptor (BCR) und dessen Signalleitung

Wie schon oben erwähnt, wird für die Erkennung pathogener Organismen und für die Initiation der humoralen Immunantwort ein antigenspezifischer Rezeptor auf B-Zellen benötigt. Dieser B-Zellrezeptor (BCR) wird auf reifen ruhenden B-Zellen exprimiert. Das Ansprechen des BCR löst den Übergang der B-Zellen vom G_0 in die G_1 Phase des Zellzykluses aus. Daraufhin wird der BCR endozytiert, prozessiert und Peptidfragmente des Antigens werden auf der B-Zelloberfläche zusammen mit dem MHC Klasse-II Protein präsentiert. Dadurch wird es der B-Zelle möglich, mit antigenspezifischen T Lymphozyten zu interagieren. Somit werden diese beiden Zelltypen mit den entsprechenden Proliferations- und Differentiationssignalen versorgt. Die nun aktivierte B-Zelle kann zu einer Plasmazelle differenzieren, die große Mengen löslicher, antigenspezifischer Immunglobuline sezernieren kann.

Die den Liganden-bindende Struktur und die signalweiterleitende Struktur sind auf unterschiedlichen Polypeptiden lokalisiert, die nicht-kovalent miteinander assoziiert sind. Der BCR selbst besitzt keine eigene enzymatische Aktivität, diese ist auf den signalweiterleitenden Elementen durch ITAMs (engl. Immunoreceptor tyrosine-based activation motif) repräsentiert. Durch diesen Mechanismus wird es möglich, die Ligandenbindung mit den cytoplasmatischen Effektormolekülen zu koppeln. Die Signalleitung des BCR wird durch die Transmembranproteine Ig- α und Ig- β vermittelt, die durch Disulfidbrücken verbundene Heterodimere formen (Campbell und Cambier 1990; Hombach et al. 1990a; Wienands et al. 1990; Venkitaraman et al. 1991). Ig- α und Ig- β werden von den Genen *mb-1* und *B29* kodiert (Hombach et al. 1990b; Campbell et al. 1991) die auf B-Zellen und einigen T-Zellvorläufern exprimiert werden. Beide Proteine bestehen aus einer extrazellulären Domäne, einer membrandurchspannenden α -Helix und einer intrazellulären Domäne von 61 und 48 Aminosäuren. Diese B-Zellkomponenten werden in der Regel nur gemeinsam auf der Zelloberfläche exprimiert.

Die meisten Daten zur Funktion dieses Komplexes resultieren aus Versuchen mit Zellen und Zelllinien, die durch Ansprechen des BCR aktiviert wurden. Die Konklusion aus diesen Erkenntnissen ist, daß der BCR nicht alleine dazu dient eine antigenspezifische B-Zelle zu selektieren. Er dient auch als Kontrollpunkt für die Entwicklung und das Überleben der Lymphozyten, die einen funktionalen Rezeptor besitzen und gleichzeitig dazu diejenigen zu eliminieren, die keinen kompletten Rezeptor besitzen, oder aber gegen Autoantigene spezifisch sind. Für die Kommunikation mit den intrazellulären Effektorproteinen besitzen Ig- α und Ig- β eines der besagten ITAM Motive. Der Aminosäuren (AA) Buchstabencode für ein ITAM lautet D/Ex₇D/EExxYxxI/Lx₇YxxI/L (wobei X jede beliebige AA sein kann). Daß das ITAM das Signalmodul des BCR ist wurde durch die Analyse chimärer Transmembranproteine demonstriert, die die cytoplasmatische Domäne von Ig- α und Ig- β beinhalten (Kim et al. 1993; Sanchez et al. 1994). Die Aggregation von ITAM-beinhaltenen Chimären zeigte dasselbe Bild wie es bei der Antigenstimulierung von wildtypischen Antigenrezeptoren beobachtet wurde. Hierbei sind die Aktivierung von Proteintyrosinkinasen (PTK), die Hydrolyse von Phosphoinositiden, Mobilisierung von Calcium-Ionen, die Aktivierung des Ras/Mitogen-aktivierten Protein (MAP) Signalweges und die Aktivierung der Phosphatidyl 3-OH-Kinase beinhaltet (Campbell und Sefton 1990; Gold et al. 1991).

Phosphorylierte ITAMs bieten dann eine Bindungsmöglichkeit für Src Homologie 2 Domänen (SH2) beinhaltende Signalproteine. Die oben angesprochene Aktivierung von Proteintyrosinkinasen bezieht sich auf drei verschiedene Klassen dieser Proteine: die Src Familienmitglieder Lyn, Blk, Fyn, Lck und Fgr; die PTK Syk und das Tec Familienmitglied BTK.

Src-verwandte PTKs bestehen aus einer N-terminalen Domäne, einer SH3, einer SH2 und der Kinase-Domäne (SH1). Die Kinasen dieser Familie sind durch Myristylierung und Palmytylierung konstitutiv an den inneren Teil der Plasmamembran gebunden. Lyn, Blk, Fyn und Lck sind zum Teil mit dem nicht stimulierten BCR assoziiert, und werden durch BCR Ligation aktiviert (Burkhardt et al. 1991; Yamanashi et al. 1991; Campbell und Sefton 1992; Clark et al. 1992). Die Src-Kinasen werden durch Phosphorylierung in einem inaktiven Zustand gehalten, dies geschieht durch eine Konformationsänderung, die keine Substratbindung zuläßt (Sicheri et al. 1997; Xu et al. 1997). Durch Dephosphorylierung des C-Terminus werden sie aktiviert. Diese Reaktion wird vermutlich durch die Transmembranphosphatase CD45 katalysiert (Yanagi et al. 1996).

Syk besteht unter anderem aus zwei N-terminalen SH2 Domänen und einer C-terminalen katalytischen Domäne. Die SH2 Tandemdomänen von Syk binden spezifisch an doppelphosphorylierte ITAMs von Ig- α und Ig- β (Wienands et al. 1995). Somit ist ein mögliches Szenario, daß durch Phosphorylierung von Ig- α und/oder Ig- β durch Src PTKs und auch Syk eine konzertierte Aktion der verschiedenen PTK Familienmitglieder weitere Signalkomponenten der BCR Signalleitung aktiviert.

Das Tec PTK Familienmitglied **BTK** (engl. Bruton's tyrosine kinase) spielt eine weitere wichtige Rolle bei der BCR Signalleitung. BTK besteht aus einer N-terminalen Pleckstrin Homologie Domäne, einer Tec Homologie Region, einer SH3 Domäne, einer SH2 Domäne und einer C-terminalen katalytischen Domäne. Die BTK Pleckstrin Domäne bindet an Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphat (PIP3), welches ein Produkt aktivierter PI3K ist (Salim et al. 1996; Toker und Cantley 1997). Somit ist

die BTK auf eine stimulationsabhängige Art und Weise mit der Plasmamembran assoziiert.

Wie nun findet die Kommunikation zwischen den PTKs und ihren Substratproteinen statt, und um welche Substrate handelt es sich hierbei? Zur Klärung dieser Frage trug vor allem die Identifikation der Proteinadaptorfamilie SLP (engl. SH2-containing Leukocyte Protein; Wienands et al. 1996) bei. Wienands et al. isolierten 1998 ein B-Zell spezifisches Protein, das BLNK/SLP-65 genannt wurde. Der N-terminale Bereich beinhaltet sieben Tyrosin Phosphorylierungsstellen, gefolgt von einem Prolin-reichen Teil mit einigen SH3 Bindungsmotiven und einer C-terminalen SH2 Domäne. **SLP-65** oder auch BLNK wird durch Syk (weder durch Lyn, noch Btk) phosphoryliert (Fu et al. 1998, Engels et al. 2001; Kabak et al. 2002). Für die Phosphorylierung von SLP65 wird offensichtlich Grb2 (engl. Growth receptor-binding protein 2), das schon im unstimulierten Zustand der B-Zelle mit SLP-65 assoziiert ist (Fu et al. 1998; Wienands et al. 1998), benötigt. Somit existiert ein vorgeformter Signalleitungskomplex, der die schnelle Phosphorylierung von SLP-65 und die spezifische „downstream“ Signalweiterleitung nach BCR Stimulierung erklärt (Wienands et al. 1996).

SLP-65, als eine der offensichtlich wichtigsten Komponenten der BCR Signalweiterleitung, ist konstitutiv mit dem Adaptorprotein **Grb2** assoziiert. Diese wird durch die Rezeptoraktivierung noch erhöht (Fu et al. 1998; Wienands et al. 1998). Hierbei bindet bei unstimulierten Zellen die N-terminale Domäne an SLP-65, während bei Zellstimulation die SH2-Domäne benötigt wird (Wienands et al. 1998). Es scheint ein trimolekularer Komplex von SLP-65, Grb2 und SOS vorzuliegen (Fu et al. 1998), somit wird auch der Ras Signalweg angesprochen.

Ein weiterer Mechanismus, der den Ras Signalweg anspricht, scheint über das Adaptorprotein **SHC** zu funktionieren. Nach BCR Stimulation wird dieses phosphoryliert und es bildet sich ein Komplex aus SHC, Grb2 und SOS (Lankester et al. 1994; Saxton et al. 1994; Smit et al. 1994). Die SH2 Domäne von SHC bindet, zumindest in vitro, an tyrosinphosphoryliertes Ig- α und Ig- β (Baumann et al. 1994). Auf diese Arten kann somit der ras/Raf/MAPK Signalweg angesprochen werden.

Ein weiteres konstitutiv mit SLP-65 assoziiertes Signalprotein ist **Vav** (Fu et al. 1998; Wienands et al. 1998). Vav interagiert über seine SH2-Domäne mit phosphoryliertem Syk, und wird vermutlich von dieser PTK phosphoryliert, und damit aktiviert (Deckert et al. 1996). Tyrosin phosphoryliertes Vav ist ein Guanin Nukleotid Austauschfaktor für die Rho Familie von G-Proteinen (Crespo et al. 1997) und spielt eine Rolle bei Reorganisation des Cytoskelettes. Zudem spielt Rho eine Rolle bei der Aktivierung der JNK und p38 MAP-Kinasen, die wiederum die Jun und Atf2 Transkriptionsfaktoren regulieren (Su and Karin 1996).

SLP-65 spielt auch eine zentrale Rolle bei der Initiierung der **Ca²⁺-Mobilisierung** durch den B-Zell Rezeptor. Nach Stimulation des B-Zell Rezeptors wird SLP-65 von Syk phosphoryliert, und assoziiert mit Ig α / β (Engels et al. 2001; Kabak et al. 2002). SLP-65 in seiner phosphorylierten Form interagiert dort mit Btk und mit PLC γ 2. PLC γ 2 wird dann durch Btk und Syk phosphoryliert, und dadurch aktiviert (Takata and Kurosaki 1996). Aktive PLC γ hydrolysiert membranständiges Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zu Diacylglycerol (DAG), das in der Membran verbleibt, und Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP₃), das ins Cytoplasma diffundiert (Carter et al. 1991). DAG aktiviert die Protein Kinase C (PKC), während IP₃ die transiente

Freisetzung von Ca^{2+} aus speziellen Speichern im ER, gefolgt von lange anhaltendem Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum, bewirkt. Ein wichtiger Effekt des Ca^{2+} -Signals in B-Zellen ist z.B. die Aktivierung der cytosolischen Phosphatase Calcineurin, und daraus resultierend die nukleäre Lokalisation der cytosolischen Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF-AT. Im Zellkern bindet NF-AT an die nukleäre Komponente des NF-AT, AP-1, und reguliert so die Transkription einer Reihe von Genen (Rao et al. 1997).

Die nun folgende Abbildung soll einen schematischen Überblick über die wichtigsten Proteine, die in die BCR Signalweiterleitung involviert sind, geben:

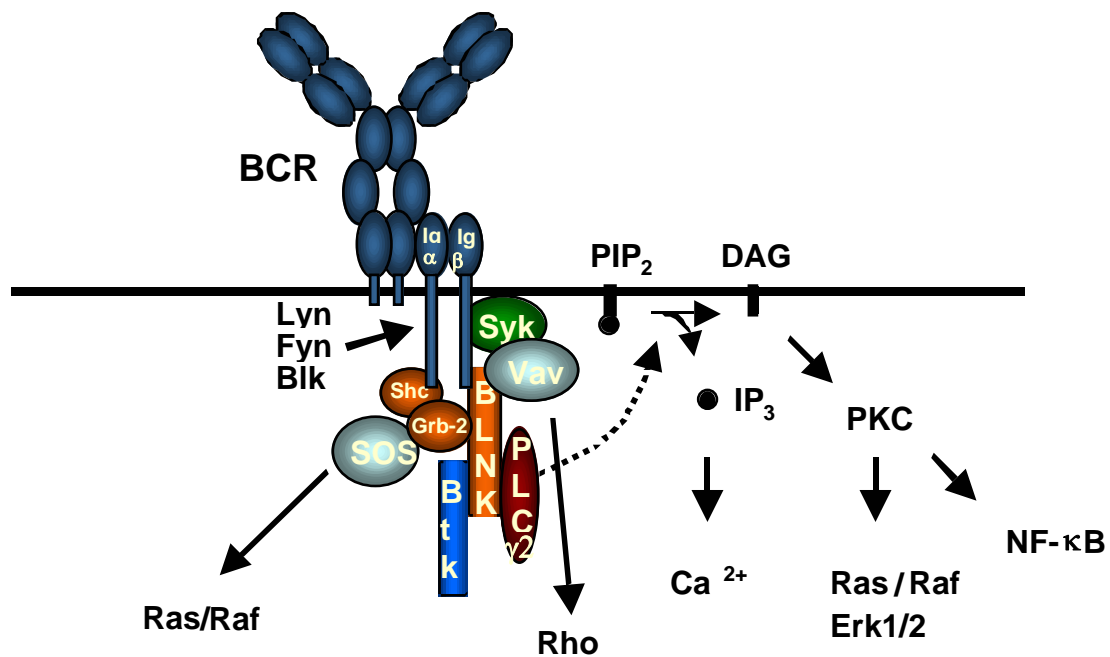


Abb. 1: Schematische Darstellung der wichtigsten Ereignisse der BCR Signalleitung. Früh treten Aktionen verschiedener Proteintyrosinkinasen auf (Src-verwandte PTKs, Syk). An das phosphorylierte Adapterprotein SLP-65 können PLC- γ 2, Btk, Grb2, Vav und Nck binden. Durch eine konzertierte Aktion all dieser Proteine werden Calcium Mobilisierung, der Ras/Raf /MAPK Signalweg und der Rho Signalweg angesprochen. Für nähere Details siehe Erläuterungen im Text.

Eines der ursprünglichen Mitglieder der Siglec-Proteinfamilie, CD22, stand von Beginn dieser Doktorarbeit an im Fokus. Aus diesem Grund möchte ich an dieser Stelle näher auf dieses Siglec eingehen und mit der Erläuterung dessen Struktur und Funktion beginnen.

1.4 CD22 (Siglec2) Struktur und Funktion

CD22 ist ein Klasse-I Transmembranprotein, dessen humanes Gen 1990 kloniert wurde (Stamenkovic 1990, Wilson et al. 1991). Es wird ausschließlich auf B-Zellen exprimiert. 1992 wurde das murine Homolog (mCD22) charakterisiert (Torres 1992), das insgesamt eine 62 %ige Übereinstimmung mit dem humanen Protein aufweist. Das mCD22 Gen besteht aus 15 Exons und wurde auf der proximalen Region des murinen Chromosom 7 lokalisiert (Law et al. 1993). CD22 hat sieben extrazelluläre Immunglobulin-domänen, von denen eine eine sogenannte V-set Domäne und sechs C2-set Domänen sind. Dann folgt eine Transmembrandomäne und eine cytoplasmatische Domäne mit sechs potentiellen Tyrosin Phosphorylierungsstellen, von denen drei eine ITIM-Sequenz (engl. immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) aufweisen.

Ursprünglich war die Annahme, daß CD22 ein das BCR-Signal positiv regulierender Korezeptor ist, da nach Behandlung von B-Zellen mit anti-CD22 eine B-Zellproliferation beobachtet wurde (Pezzuto et al. 1987; Pezutto et al. 1988; Tuscano et al. 1996). Zudem ließ sich nachweisen, daß ein Teil der CD22 Moleküle mit dem BCR kopräzipitiert werden konnte (LePrince et al. 1993; Peaker und Neuberger 1993) und CD22 nach Antigen-Rezeptor Aktivierung sofort stark Tyrosin-phosphoryliert wurde (Schulte et al. 1992; LePrince et al. 1993; Peaker und Neuberger 1993; Williams et al. 1994). Erste Anzeichen dafür, daß CD22 eher ein negativer Regulator des BCR-Signals sein könnte, zeigten sich dadurch, daß CD22 nach BCR-Stimulierung in starkem Maße mit der negativ regulierenden (Cyster and Goodnow 1995) Tyrosinphosphatase SHP-1 assoziiert (Campbell and Klinman 1995; Doody et al. 1995; Law et al. 1996). Schließlich wurde die Frage anhand von CD22 defizienten Mäusen (O'Keefe et al. 1996; Otipoby et al. 1996; Sato et al. 1996; Nitschke et al. 1997) geklärt. Hierbei zeigte sich nach Kreuzvernetzung der Antigenrezeptoren (Kreuzvernetzung von mIgM und IgD) auf den CD22 defizienten B-Zellen ein erhöhter und länger andauernder intrazellulärer Calciumeinstrom als bei wildtypischen B-Zellen. Es zeigte sich zudem in vitro, daß CD22 defiziente Zellen eine erhöhte Apoptoserate nach Anti-IgM Behandlung zeigen, zudem ist beschrieben, daß die Apoptoserate mit dem Calciumeinstrom korreliert (Cyster und Goodnow 1995). Somit wäre in vivo ein verkleinertes B-Zellkompartiment, oder aber ein schneller Ersatz von B-Zellen zu erwarten, wenn die Apoptoserate tatsächlich höher wäre. Es zeigte sich, daß die Lebensspanne von B-Zellen in der Milz und den Lymphknoten tatsächlich kürzer ist (Nitschke et al. 1997). Zudem haben B-Zellen der CD22-defizienten Mäuse einen reiferen (IgM^{lo}, IgD^{hi}) Phänotyp in der Peripherie. Dies könnte aufgrund einer basalen Aktivierung auftreten, die sonst durch CD22 abgeschwächt wird (Nitschke et al. 1997).

Letztendlich zeigten die verschiedenen Studien mittels CD22 defizienten Mäusen eindeutig, daß das Siglec CD22 ein negativer Regulator des BCR-Signals ist.

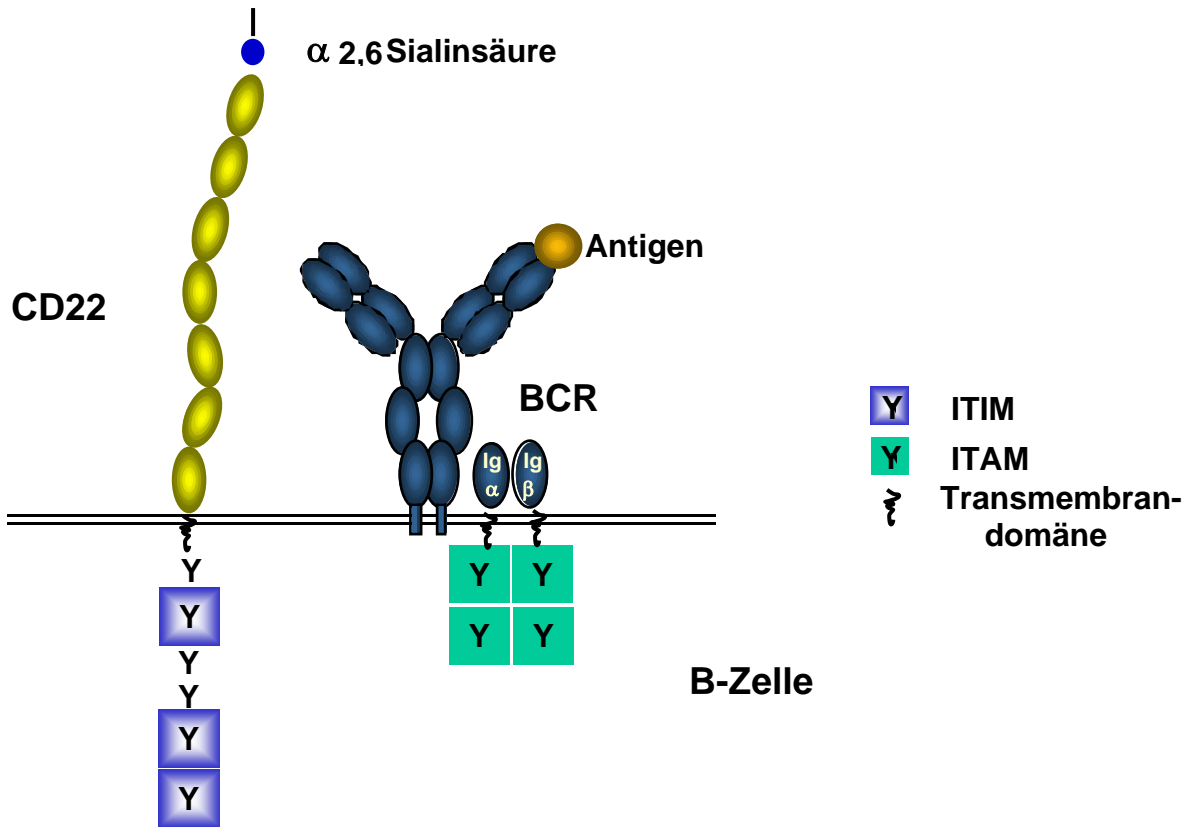


Abb. 3: CD22 ist ein Mitglied der Siglec-Familie (Sialinsäure bindende Ig-ähnliche Lectine). Die Tyrosine, die zu ITIM oder ITAM Sequenzen gehören, sind in der cytoplasmatischen Region markiert. Mit der äußersten Ig-Domäne bindet CD22 α 2,6-Sialinsäure (blauer Kreis).

1.5 Intrazelluläre Signaltransduktion durch CD22

Das Transmembranprotein CD22 ist einer der inhibitorischen Rezeptoren auf der B-Zelloberfläche, die das B-Zell Antigen Rezeptor (BCR) Signal modulieren. CD22 reguliert das BCR vermittelte B-Zellsignal im Zusammenspiel mit den kostimulatorischen Molekülen CD19/CD21 und CD81 (Fujimoto et al. 1999).

Durch Immunpräzipitationen konnte gezeigt werden, daß ein geringer Prozentsatz der CD22 Moleküle konstitutiv mit mIgM assoziiert ist (Leprince et al. 1993; Peaker und Neuberger 1993). Nach BCR Stimulierung wird CD22 am cytoplasmatischen Schwanz durch die Src-ähnliche Kinase Lyn an den Tyrosinen phosphoryliert (Doody et al. 1995; Smith et al. 1998). Dies nun führt zur Rekrutierung der Phosphatase SHP-1, die an die drei ITIMs (eng. immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif) des CD22 Schwanzes bindet und daraufhin aktiviert wird (Doody et al. 1995). Auch andere Signalmoleküle, wie zum Beispiel Syk, PLC γ 2, PI3K, Grb-2 und Shc können am phosphorylierten cytoplasmatischen Teil von CD22 binden (Law et al. 1996; Yohannan et al. 1999; Poe et al. 2000). Die Bindungsstellen für diese Moleküle unterscheiden sich teils von denen für SHP-1 und sind teils überlappend. Desweiteren zeigte sich, daß für die Phosphorylierung von bestimmten Tyrosinen

(z.B. Y4) andere Faktoren verantwortlich zu sein scheinen, wie zum Beispiel Syk (Otipoby et al. 2001).

Später zeigte es sich, daß der an den cytoplasmatischen Teil von CD22 gebundene Proteinkomplex noch komplizierter zusammengesetzt ist. Es konnte nachgewiesen werden, daß sich ein quaternärer Komplex der Lipidphosphatase SHIP, Grb-2 und Shc bilden kann (Poe et al. 2000). Somit bietet CD22 eine multiple Plattform für die Bindung verschiedener negativer Regulatoren der Signalleitung, wie zum Beispiel SHP-1 und SHIP, aber auch diverser positiver Regulatoren.

Wie oben bereits erwähnt konnte jedoch in Studien mit CD22 defizienten Mäusen klar die inhibitorische Funktion von CD22 auf das BCR Signal nachgewiesen werden (O'Keefe et al. 1996; Otipoby et al. 1996; Sato et al. 1996; Nitschke et al. 1997). Vorallem das Calciumsignal von CD22 defizienten B-Zellen war stark erhöht und zudem länger andauernd nach BCR Stimulierung, im Vergleich zu wildtypischen B-Zellen. In Übereinstimmung damit zeigten B-Zellen von CD22 defizienten Mäusen einen leicht aktivierten Phänotyp: einen höheren Anteil von reifen IgD^{hi}IgM^{lo} Zellen, eine zweifach höhere Expression des MHC (engl. Major histocompatibility complex) Klasse II Moleküls, eine um das zweifache Erhöhte Sekretion von IgM, eine erhöhte Antwort auf LPS (Lipopolysaccharid) Stimulation und schließlich die Entwicklung von Autoantikörpern bei älteren Tieren (O'Keefe et al. 1999).

Somit scheint CD22 für die Kontrolle einer Signalschwelle, vorallem bei der frühen B-Zellaktivierung, von Bedeutung zu sein. Dies könnte wiederum bedeuten, daß CD22 direkt Prozesse wie Apoptoseinduktion und negative Selektion beeinflusst (Nitschke et al. 1997; Cornall et al. 1998). Wenn hingegen T-Zell- und Kostimulation vorhanden ist, ist die CD22^{-/-} B-Zellantwort normal, was durch normale thymus-abhängige Immunantworten, Keimzentrumsformation und Verteilung von Immunglobulinen aller Isotypen bei CD22 defizienten Mäusen gezeigt werden konnte (O'Keefe et al. 1996; Otipoby et al. 1996; Sato et al. 1996; Nitschke et al. 1997).

Die inhibitorische Funktion von CD22 konnte bei CD22 defizienten Mäusen klar nachgewiesen werden, während die Rolle der anderen Moleküle (meist als positiv regulierend eingestuft), die an den cytoplasmatischen Teil von CD22 binden, bisher nicht klar bestimmt werden konnte. Wie jedoch ist die negative Regulation des Calciumsignals durch CD22 gesteuert? Bisher sind zwei eindeutig negative Regulatoren im Zusammenhang mit CD22 identifiziert: SHP-1 und SHIP. Die Phosphatase SHIP ist die entscheidende Phosphatase des Fc γ RII Signalweges bei B-Zellen. Doch zeigen B-Zellen SHIP defizienter Mäuse kein höheres Calciumsignal, nach alleiniger Stimulation von IgM (Brauweiler et al. 2000). Im Gegensatz dazu zeigten „motheaten“ Mäuse, die eine spontane SHP-1 Mutation tragen, ein höheres Calciumsignal nach IgM Stimulierung (Cyster und Goodnow 1995). Dieses Ergebnis wird untermauert durch eine konditionale B-Zell spezifische SHP-1 knock out Maus. Die B1 Zellen dieser Tiere, die dem Phänotyp der „motheaten“ Mäuse gleichen, zeigen nach IgM Stimulation ebenfalls ein erhöhtes Calciumsignal (Pao et al. unveröffentlicht). Zudem zeigte sich ein erhöhter Phosphorylierungsgrad von Vav-1 (Sato et al. 1997), CD19 (Fujimoto et al. 1999) und SLP65 (Gerlach und Nitschke unveröffentlicht) in CD22 defizienten Mäusen, was eine erniedrigte Tyrosinphosphataseaktivität impliziert. Diese Moleküle sind alle als positive Regulatoren bekannt. All diese Daten zusammen weisen darauf hin, daß SHP-1 die ausschlaggebende Phosphatase der CD22 Signalleitung zu sein scheint.

Wie genau die Wechselwirkungen zwischen dem BCR und dem inhibierenden CD22 funktionieren und welche Rolle die V-set Lektindomäne von CD22 spielt, ist bis jetzt noch nicht geklärt. In einer Studie von Tooze et al. (Tooze et al. 1997) wurden drei mögliche Zustände zur Klärung dieser Frage untersucht, wobei die Aktivierung des MAP-Kinase Signalweges betrachtet wurden: eine Koligation von CD22 und dem BCR, was das niedrigste Signal zur Wirkung hatte; eine Stimulation einzig des BCR, was eine intermediäre Aktivierung der MAP-Kinase nach sich zog; und schließlich eine Entfernung von CD22 vom BCR mittels anti-CD22 beschichteter Kügelchen, was die höchste MAP-Kinase Stimulierung bewirkte.

Diese Ergebnisse implizieren, daß das Wechselspiel zwischen dem BCR und CD22 ein regulierter Prozeß sein könnte, dem zum Beispiel die Adhäsionseigenschaft der Lektindomäne zu Grunde liegen könnte.

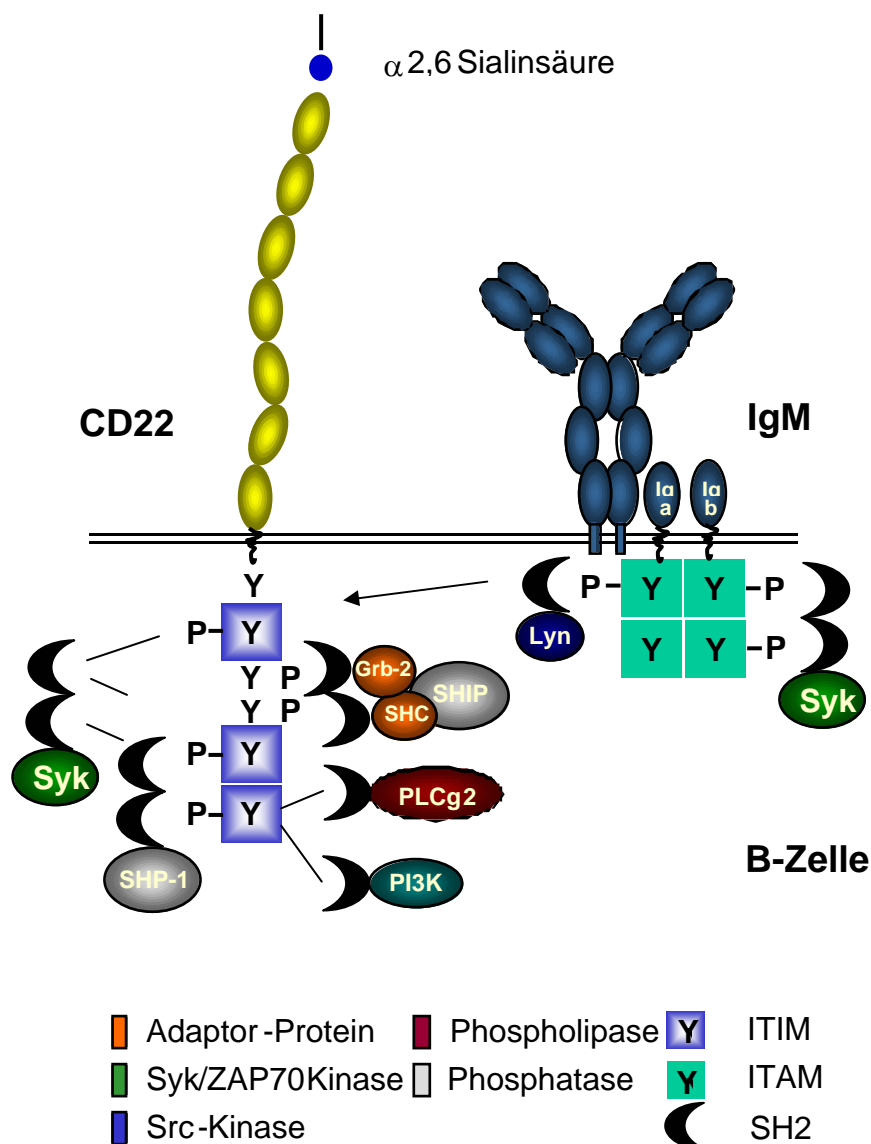


Abb. 4: Darstellung der intrazellulären Signalleitung von CD22. Alle intrazellulären Bindungspartner von CD22 sind hier dargestellt. Die Tyrosine, die als Bindungsstellen identifiziert wurden sind in der cytoplasmatischen Region markiert.

Nur für die Phosphatase SHP-1 konnte eine klare Funktion ermittelt werden, und zwar als der Faktor, der am wahrscheinlichsten für die CD22 vermittelte Inhibition verantwortlich ist.

Auf die bis jetzt bekannten Daten und Theorien, die die Lektindomäne von CD22 betreffen, möchte ich nun in einem Unterkapitel näher eingehen.

1.6 Die extrazelluläre CD22 Domäne

Das Siglec CD22 (Siglec2) hat eine hohe Spezifität für α 2-6 gebundene Sialinsäure (Kelm et al. 1994; Powell et al. 1995), eine weit verbreitete Struktur auf N-gebundenen Zuckern, welche auf einer Vielzahl von Zellen, auch hämatopoetischen Ursprungs, exprimiert wird. Beispiele hierfür sind Zytokin-aktivierte Endothelzellen, Erythrozyten und Lymphozyten (Engel et al. 1993; Hanasaki et al. 1995). Die äußerste V-set Domäne von CD22 vermittelt die Sialinsäurebindung des Moleküls (van der Merwe et al. 1996).

Die molekulare Grundlage der Bindung von Sialinsäure wurde anhand einer Kristallstruktur von an der V-set Domäne von Sialoadhesin gebundenen 3`-Sialyllactose aufgeklärt (May et al. 1998). Das Muster dieser Bindung scheint auf alle Siglecs anwendbar zu sein. Hierbei spielt ein konserviertes Arginin auf der F β -Faltblattstruktur, welches eine Salzbrücke mit der Carboxylgruppe der Sialinsäure bildet, eine entscheidende Rolle. Durch molekulares Modellieren und Mutageneseversuche wurde für CD22 ein ähnliches Zuckerbindungsmuster wie für Sialoadhesin ermittelt. Hierbei spielt bei CD22 ein Arginin (bei der Maus das Arg130) bei der Bindung zu α 2-6 gebundener Sialinsäure die entscheidende Rolle. Diese Daten wurden in der Arbeitsgruppe von Anton van der Merwe aus „Biacore assays“ gewonnen: hierbei konnte gezeigt werden, daß durch die Einführung der Mutationen R130E und R130A die Sialinsäurebindung von murinem CD22 unterbunden wird. Die Spezifität für die verschiedenen Bindungen der Sialinsäure an die weiteren Zuckerstrukturen scheint durch die variablen Bereiche zwischen den β -Faltblättern gewährleistet zu sein.

CD22 kann an eine Reihe von sialysierten Proteinen auf der Plasmamembran binden, wie zum Beispiel CD45 (SgROI et al. 1995). Es wurde jedoch durch Plasmaresonanzstudien gezeigt, daß die Affinität der CD22 extrazellulären Region ähnlich ist für CD45 und für synthetische α 2-6 Sialinsäure tragende Zuckerkonjugate (Bakker 2002). Dies deutet darauf hin, daß allein die Anwesenheit und Dichte der α 2-6 gebundenen Sialinsäuren für die Bindung von CD22 an diese wichtig ist. Somit ist wiederum der Grad der Sialysierung auf der Plasmamembran wahrscheinlich ausschlaggebend für das Mikromilieu, wobei die Frage ist in wie weit sich ein unterschiedlicher Grad der Sialysierung auswirkt.

Ein Ansatz für die Klärung dieser Frage war die Generierung einer ST (Sialyltransferase) 6Gall defizienten Maus, bei der keine 2,6 gebundene Sialinsäure auf der Plasmamembran der defizienten B-Zellen existiert. Durch diesen Ansatz wurde die Frage allerdings nichtkomplett geklärt, da diese Mäuse eine bei weitem stärkere Immundefizienz als die CD22 defizienten Mäuse aufwiesen. Dieser Befund

läßt darauf schließen, daß die ST6Gall eine weitreichendere Funktion bei der Regulierung der B-Zellantwort spielt (Hennet et al. 1998). Desweiteren könnten Liganden für CD22 auf anderen Zellen die Lokalisation des CD22 Moleküls auf der Plasmamembran beeinflussen. Wie ist nun die Kopplung zwischen den inhibitorischen Eigenschaften von CD22 und dessen Bindungsfähigkeit an α 2,6 gebundene Sialinsäuren? Bisher ist klar bewiesen, daß CD22 bei der Mehrzahl von B-Zellen auf der eigenen Plasmamembran (Cis-Bindung) an unbestimmte Liganden gebunden ist (Floyd et al. 2000; Razi und Varki 1998). Dies wurde mittels Färbungen von B-Zellen mit einem PAA (Poly-acryl-amid) basierenden α 2,6 Sialinsäurezuckerkonjugat ermittelt. Dieses Konjugat konnte die meisten B-Zellen nicht binden, solange sie nicht durch Behandlung mit Sialidase nicht mehr in cis maskiert waren.

Es wurden jedoch B-Zellsubpopulationen identifiziert, die nicht in cis maskiert waren (Floyd et al. 2000). Die Expression von α 2,6 Sialinsäure auf der Plasmamembran wird von der α 2-6 Sialintransferase und Sialidasen kontrolliert. Somit würde für die Bindung von CD22 ein Wettbewerb zwischen eventuellen Liganden in trans (auf anderen Zellen oder Strukturen) und den Liganden in cis (auf der eigenen Zelloberfläche) entstehen. Tatsächlich wurde ein konkreter Fall einer Zell-Zellinteraktion von CD22 im Knochenmark entdeckt. Sinusoidales Endothel des Knochenmarks exprimiert konstitutiv α 2,6 Sialinsäure auf der Oberfläche (Nitschke et al. 1999). Schon bei ersten Analysen der CD22 defizienten Mäuse war die spezifische Reduktion von reifen B-Zellen (IgD^{hi}) im Knochenmark dieser Tiere ein bis dahin unerwartetes Ergebnis, obgleich die Zellzahl in den anderen peripheren lymphatischen Organen normal war. Die reifen B-Zellen entstehen nach der finalen B-Zellreifung in der Milz, von dort rezirkulieren sie im Blut und wandern zurück zu verschiedenen Geweben, wie auch dem Knochenmark. Die ersten konkreten Hinweise darauf, daß die fehlende B-Zellpopulation im Knochenmark von CD22 defizienten Mäusen tatsächlich auf einen „homing“ Effekt zurückzuführen ist (und nicht auf andere Mechanismen, wie z.B. eine reduzierte Lebensspanne CD22 defizienter B-Zellen) resultierte aus adoptiven Transferstudien. Das Knochenmark von RAG2 defizienten Mäusen wurde nach Injektion von wildtypischen B-Zellen im Vergleich zu CD22 defizienten B-Zellen von ersteren zweifach höher wiederbesiedelt (Nitschke et al. 1997).

Falls nun CD22 direkt mit dem „homing“ in das Knochenmark zu tun hätte, war der Rückschluß, daß im Knochenmark Liganden für CD22 exprimiert sein müßten. Dies wurde erstmals mit rekombinantem CD22-Fc Protein durch das Färben von Gewebeschnitten gezeigt. Hierbei zeigte es sich, daß sialysierte Liganden auf Endothelzellen sinusoider Strukturen des Knochenmarks, aber nicht auf den Endothelzellen anderer Gewebe zu finden waren (Nitschke et al. 1999). In dieser Studie konnte auch durch in vivo Injektion des CD22-Fc Proteins folgendes gezeigt werden: das Knochenmark wurde nach 24h um 50% weniger von reifen B-Zellen besiedelt, während diese B-Zellzahlen in der Milz nicht verändert waren (Nitschke et al. 1999). Diese Daten weisen darauf hin, daß CD22 an einem „homing“ in das Knochenmark beteiligt sein könnte, indem es den B-Zellen ermöglicht mit CD22 Liganden auf Endothelzellen des Knochenmarks zu interagieren. Dieser „homing“ Effekt mag aufgrund einer Population von unmaskierten CD22 B-Zellen, die im Knochenmark angereichert sind, möglich sein (Floyd et al. 2000).

Das B-Zell spezifische Oberflächenmolekül CD22 (welches in dieser Arbeit mittels Gene Targeting verändert werden sollte) wird der Proteinfamilie der Siglecs (engl. sialic acid-binding Ig-like lectins; Sialinsäurebindende immunoglobulinähnliche Lektine) zugerechnet. Aus diesem Grund möchte ich im nächsten Abschnitt einen kurzen Überblick über diese Proteinfamilie vermitteln.

1.7 Sialinsäurebindende immunoglobulinähnliche Lectine, Sialinsäuren und ihre Rolle im Immunsystem

Siglecs (sialic acid-binding Ig-like lectins) sind Mitglieder der Immunoglobulin-Superfamilie, die Sialinsäure als Ligand binden, und hauptsächlich auf Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert werden. Es ist schon länger bekannt, daß Sialinsäure als Wirtsligand für Pathogenrezeptoren dient, jedoch erst seit wenigen Jahren, daß es auch endogene Rezeptoren gibt, die sialinsäurebindende Präferenz besitzen: die sogenannten Siglecs. Die Siglec-Proteinfamilie wurde zuerst durch Sialoadhesin (ein Macrophagen lectinähnliches Adhensionsmolekül) und CD22 definiert, die beide Zell-Zell-Interaktion durch das Binden von Sialinsäure bewirken können. Im Zuge der Klonierung von Sialoadhesin und strukturellen Vergleichen mit CD22 konnten der Siglecfamilie noch MAG (myelin-associated glycoprotein) und CD33 zugeordnet werden.

In den letzten Jahren vergrößerte sich die Siglecfamilie fortwährend. Durch genomische und funktionelle Analysen konnten eine Reihe von Proteinen eingereiht werden, die aufgrund der Struktur und evolutiven Aspekten in eine Subgruppe (CD33-related siglecs) eingeordnet wurden. Diese Subgruppe hat die Charakteristika von inhibitorischen Rezeptoren (alle besitzen mindestens ein ITIM Motiv; immunoreceptor tyrosin-based inhibition motif; und zudem ein Tyrosin basierendes Motiv, welches allerdings nicht die ITIM-Sequenz besitzt).

Die allgemeinen Merkmale der Siglecs sind eine N-terminale V-set Ig Domäne, die die Sialinsäurebindung vermittelt, gefolgt von 1 (CD33) bis 16 (Sialoadhesin) C2-set Ig-Domänen und, abgesehen von Sialoadhesin, enthalten alle Siglecs potentielle tyrosinbasierende Signalmotive. Eine auffällige Eigenschaft der CD33-verwandten Siglecs ist spezifisches Expressionsmuster innerhalb des hämatopoetischen Systems. Durch diese Tatsache kombiniert mit der Existenz von ITIM- und ITIM-ähnlichen Motiven werden die CD33-verwandten Siglecs zu Kandidatenproteinen für eine wichtige Rolle bei der Zellinhibition des Immunsystems. Die molekularen Grundlagen der Bindung von Sialinsäure wurden anhand einer Kristallstruktur von an der V-set Domäne von Sialoadhesin gebundenen 3`-Siallyllactose aufgeklärt (May et al. 1998). Das Muster dieser Bindung scheint auf alle Siglecs anwendbar zu sein. Hierbei spielt ein konserviertes Arginin auf der F β -Faltblattstruktur, welches eine Salzbrücke mit der Carboxylgruppe der Sialinsäure bildet, eine entscheidende Rolle. Die Spezifität für die verschiedenen Bindungen der Sialinsäure an die weiteren Zuckerstrukturen scheint durch die variablen Bereiche zwischen den β -Faltblättern gewährleistet zu sein (Crocker 2002).

Die Liganden, die von den Siglecs gebunden werden können, sind in Säugerorganismen ubiquitär exprimiert. Es existieren verschiedene Sialinsäuren, die

wiederrum verschiedene glykosidische Bindungen eingehen können, wobei sie typischerweise am nicht-reduzierenden Ende einer Oligosaccharidkette lokalisiert sind. Diese Oligosaccharidkette kann sich wiederum auf den verschiedensten Proteinen oder Lipiden befinden. Dies bedeutet, daß Sialinsäuren dazu prädestiniert sind bei Zell-Zellinteraktionen eine Rolle zu spielen (Kelm und Schauer 1997; Schauer und Kamerling 1997; Varki et al. 1999). Durch ihr ubiquitäres Expressionsmuster sind Sialinsäuren, als potentielle Bindungspartner für Siglecs, in der Regel auch auf derselben Zelloberfläche wie die Siglecs vorhanden. Durch diese Tatsache kommt es zu einem Effekt, der Cis-Interaktion genannt wurde. Dies führt zu einer Maskierung der Siglecs durch die auf derselben Plasmamembran vorkommenden Sialinsäuren (Razi und Varki 1998; 1999; Floyd et al. 2000).

Verschiedene Studien zeigten, obgleich die meisten Siglecs maskiert zu sein scheinen, daß dieser Zustand durch Aktivierung der Zelle aufgehoben werden kann (z.B. Razi und Varki 1998). Die biologische Relevanz dieses Mechanismus wird mittels verschiedener Theorien zu erklären versucht: (1) Cis-Interaktionen der Siglecs mit Sialinsäuren könnten Zell-Zellinteraktionen verhindern bis sie benötigt werden; (2) diese Interaktionen könnten jedoch auch Kontakte zwischen verschiedenen Proteinen auf der eigenen Plasmamembran ermöglichen; oder aber (3) genau den gegenteiligen Effekt bewirken, bestimmte Protein-Proteininteraktionen verhindern, indem Siglecs andere sialysierte Proteine von bestimmten Szenarien fernhalten.

In den letzten Jahren wurden durch genomische und funktionale Analysen eine Reihe von Siglecs beim Menschen, Affen und der Maus identifiziert. Die Nomenklatur der menschlichen Siglecs ist numerisch (z.B. hSiglec-5), während sie bei murinen Siglecs alphabetisch ist (z.B. mSiglec-E). Die menschlichen Siglec Gene sind auf den chromosomalen Regionen 20p (Sialoadhesin), bzw. 19q (alle anderen Siglecs) lokalisiert. Bei den Maus Orthologen liegen die entsprechenden Regionen auf dem Chromosom 2, bzw. Chromosom 7. Die nun folgende Tabelle gibt einen Überblick über die menschlichen Siglecs und deren murinen Orthologen, die bis zum Jahr 2002 identifiziert wurden, und deren Eigenschaften:

Human siglecs	Mouse siglecs	Number of Ig domains	Number of cytoplasmic tyrosine motifs	Sialic-acid-binding specificity*	Expression
Sialoadhesin/hSiglec-1	Sialoadhesin/mSiglec-1	17	0	2,3>2,6>2,8	Mac
CD22/hSiglec-2	CD22/mSiglec-2	7	6	2,6	B
CD33/hSiglec-3	CD33/mSiglec-3 ^f	2	2 or 0 ^f	2,6>2,3	My-pro, Mon
MAG/hSiglec-4	MAG/mSiglec-4	5	1	2,3>>2,6	Oligo, Schwann
hSiglec-5	mSiglec-F ^f	4	2	2,3=2,6>2,8	Mon, N, B
hSiglec-6		3	2	STn	B, Plac
hSiglec-7		3	2	2,8>>2,6>2,3	Mon, NK
hSiglec-8		3	2	2,3>2,6	Eos, Baso, Mast
hSiglec-9	mSiglec-E ^{ff}	3	2	2,3=2,6	Mon, N, NK, B
hSiglec-10	mSiglec-G ^{ff}	5	3	2,3=2,6	Mon, NK
hSiglec-11		5	2	2,8	Mac
	mSiglec-H ^{ff}	2	0	ND	ND

Abb. 2: Tabellarische Auflistung der humanen und murinen Siglecs (Stand 2002) unter Angabe der Ig-Domänen, der cytoplasmatischen Tyrosinmotive, der Sialinsäurespezifitäten und ihres Expressionsmusters. B, B-Zellen; Baso, Basophile; NK, Natürliche Killerzellen; Oligo, Oligodendrozyten; Plac, Trophoplasten der Plazenta; Schwann, Schwansche Zellen (Crocker 2002).

Das menschliche Genom enthält acht CD33-verwandte Siglecs, ein Siglec ähnliches Gen und ungefähr sechzehn Siglec Pseudogene. Das Mausgenom hingegen beinhaltet nur fünf CD33-verwandte Siglecs und zwei Siglec Pseudogene. Die Sequenzähnlichkeit der CD33-verwandten Siglecs im Menschen und in der Maus (ca. 50–80%) macht eine Korrelation der Orthologen zwischen diesen beiden schwierig. Im Kontrast dazu ist die Identifikation von Sialoadhesin, CD22 und MAG-Homologen in allen anderen Spezies eindeutig, da diese Siglecs untereinander nur eine Sequenzähnlichkeit von 25-30% aufweisen. Aufgrund der Genstruktur, Sequenzanalysen, relative chromosomaler Lokalisation und vorhandener funktionaler Eigenschaften wurde folgende Zuordnung vorgeschlagen: mCD33, mSiglec-E und mSiglec-F entsprechen jeweils hCD33, hSiglec-9 und hSiglec-5 (Angata et al. 2001). Die Zuordnung des hSiglec10 hingegen ist klar und entspricht dem mSiglec-G. Diese beiden Orthologen haben eine 60%ige Sequenzidentität (Angata et al. 2001). Aufgrund dieser Tatsache wird sogar diskutiert, ob die CD33-verwandte Subgruppe der Siglecs auf einen Siglec10-ähnlichen Vorläufer zurückgeht. (Crocker 2002, Crocker und Varki 2001).

Ein weiteres Mitglied der Siglecproteinfamilie, das Siglec G, wurde in dieser Arbeit behandelt. In Zusammenarbeit mit dem Labor von Dr. Paul Crocker und vor allem seiner Mitarbeiterin Sheena Kerr war die Idee, dieses neue Siglec in vivo durch Generation einer knock out Maus zu untersuchen. Daher an dieser Stelle ein kurzer Überblick über die Identifikation und Charakteristika von Siglec 10 (murin: Siglec G).

1.8 hSiglec 10 bzw. mSiglec G, ein neues Mitglied der Siglec Proteinfamilie

Bei einer Homologiesuche in einer „EST-Datenbank“ nach einem neuen Mitglied der Siglec- (sialic acid-binding Immunglobulin-like lectin) Familie mit Hilfe der Aminosäuresequenz von CD33 wurden im Labor von Dr. Paul Crocker (University of Dundee, Scotland) 21 ESTs (engl. expressed sequence tags) aus acht verschiedenen menschlichen cDNA Bibliotheken identifiziert, die dasselbe Protein abdecken.

Letztendlich wurde ein Klon aus einer menschlichen Milz cDNA Bibliothek isoliert, der die gesamte Sequenz des neuen Siglecs abdeckte. Aufgrund von Sequenzvergleichen mit schon bekannten Mitgliedern dieser Familie und der Fähigkeit Sialinsäure zu binden wurde dieses Protein als Siglec 10 (Genbank™ accession number: AF310233) in die Familie eingegliedert (Munday et al. 2001). Auch sind andere charakteristische Merkmale der Siglec-Familie vorhanden, wie zum Beispiel das essentielle in der Siglecfamilie konservierte Arginin, hier an Position 120, von dem gezeigt wurde (May et al. 1998), daß es im Fall von Sialoadhesin die Carboxylgruppe der Sialinsäure über Wasserstoffbrücken bindet. Zudem besitzt Siglec 10 zwei aromatische Aminosäuren, Phenylalanin²⁶ und Tyrosin¹³⁴, innerhalb der V-set Domäne, die nach Strukturvorhersagen den hydrophoben Aminosäuren Tryptophan 2 und 106 bei Sialoadhesin entsprechen.

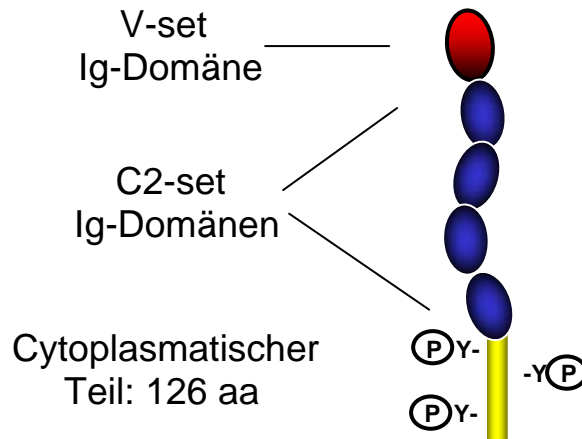


Abb. 5: Schematische Darstellung des Siglec 10 Proteins.

Das membranständige Siglec 10 besitzt einen extrazellulären Bereich mit einem hydrophoben Signalpeptid, einer N-terminalen V-set Ig-Domäne und vier C2-set Ig-Domänen. Es gibt innerhalb dieser C2-set Domänen fünf potentielle N-gebundene Glykosilierungsstellen. Dann folgt die Transmembrandomäne und schließlich der 126 Aminosäuren lange cytoplasmatische Teil. Hier gibt es auch drei potentielle Tyrosin-basierende Motive und somit ist die Möglichkeit gegeben, daß Siglec 10 eine Rolle bei der Signalleitung spielt. Das membranproximale dieser Motive, Y⁵⁹⁷INV, gleicht dem Motiv bei Tyrosin phosphorylierten Rezeptoren, die die SH2 Domäne von Grb2 binden können (Skolnik et al. 1993; Ogura et al. 1999; Rahuel et al. 1996). Ein ähnliches Motiv in der Siglecfamilie ist bisher nur bei CD22 gefunden worden (Y⁸²⁸ENV). Auch hier kann das Adaptorprotein Grb2 nach Tyrosinphosphorylierung mit CD22 interagieren (Yohannan et al. 1999).

Die beiden anderen Tyrosin basierenden Motive sind typischer für die CD33 verwandte Siglecsubfamilie. Das Motiv LHY⁶⁶⁷ATL ist eine ITIM (L/I/V/S XYXX L/V) Konsensussequenz, und ähnelt der entsprechenden Sequenz von CD33, für welche SHP-1 und SHP-2 Rekrutierung nachgewiesen werden konnte (Taylor et al. 1999; Ulyanova et al. 1999; Paul et al. 2000). Das distale Tyrosin Motiv, ADY⁶⁹¹AEV, ähnelt auch dem von anderen CD33-verwandten Siglecs, dieses zeigt keine Übereinstimmung mit der ITIM Konsensussequenz, jedoch mit einer Bindungssequenz für SAP (engl. SLAM-associated protein). Diese Sequenz taucht auch bei anderen CD33-verwandten Siglecs auf (Patel et al. 1999; Angata und Varki 2000), obgleich noch keine Evidenz für die tatsächliche Bindung von SAP gefunden wurde.

Bei verschiedenen Bindungstests von RBCs (engl. red blood cells) mit Siglec 10 transfizierten COS- und CHO (chinese hamster ovary K1)-Zellen zeigte sich, daß Siglec 10 RBC Sialinsäure-abhängig bindet. Desweiteren wurden Bindungsassays mit PAA (Polyacrylamid)-Konjugaten durchgeführt, um die Bindungsspezifität zu ermitteln. Hierbei zeigte es sich, daß Siglec 10 sowohl an α 2,3, als auch an α 2,6 gekoppelte Sialinsäure bindet.

Durch *in situ*-Hybridisierung wurde die chromosomale Lokalisation des Siglec 10 Gens auf dem langen Arm des menschlichen Chromosom 19 kartiert, auf der 19q13.3 Bande, und liegt somit nahe bei anderen CD33-verwandten Siglecs (Cornish et al. 1998; Patel et al. 1999 ; Nicoll et al. 1999 ; Floyd et al. 2000 ; Angata 2000 ; Peiper et al. 1988). Auch Northern-blot Analysen von Siglec 10 zeigten die Verwandtschaft zu anderen CD33-verwandten Siglecs, da es hauptsächlich in Zellen hämatopoetischen Ursprungs exprimiert wird, wie in der Milz, den Lymphknoten, Blutleukozyten (Eosinophile Zellen, Monozyten und B-Zellen) und außerdem Blinddarmgewebe. Bei Sequenzvergleichen mit anderen CD33-verwandten Siglecs (Siglecs 3, 5, 6, 7, 8 und 9) zeigte sich eine hohe Sequenzähnlichkeit mit diesen, obgleich Siglec 10 das Siglec dieser Gruppe ist, das die geringste Übereinstimmung aufweist. Bei dieser Datenbanksuche wurde auch ein humaner Chromosom 19 Bereich (Klon CTD-2616J11) identifiziert, der das gesamte Siglec 10 Gen enthält. Somit konnte im Labor von Dr. Paul Crocker die korrekte genomische Struktur mit Exon/Introngrenzen bestimmt werden. Die molekularen Eigenschaften zusammen mit dem Expressionsmuster lassen vermuten, daß Siglec 10, wie die anderen Mitglieder der CD33-verwandten Siglecs, die Funktion eines inhibitorischen Rezeptors des angeborenen Immunsystems hat.

Es wurde auch das orthologe Maus Protein zu Siglec 10 im Labor von Dr. Paul Crocker kloniert, welches als Siglec G bezeichnet wurde. Die dazu verwendete cDNA kodiert dieselbe Anzahl an Ig-Domänen und besitzt auch die drei charakteristischen Tyrosin basierenden Motive des humanen Siglec 10. Die Aminosäurehomologie zwischen Siglec G und Siglec 10 beträgt fast 70%. Somit scheint diese murine cDNA das korrekte homologe Ortholog zum humanen Siglec10 zu sein. Zwei weitere Arbeiten erwähnen die Identifikation eines murinen Orthologes zu humanem Siglec10 mittels Datenbanksuche mit der hSiglec10 cDNA: Angata et al. 2001 und Aizawa et al. 2003.

Um die Rolle von Siglec G *in vivo* zu untersuchen, lag es nahe, eine Siglec G-defiziente Maus zu generieren. In Zusammenarbeit mit dem Labor von Dr. Paul Crocker (University of Dundee, Scotland) und seiner Mitarbeiterin Sheena Kerr wurde dieses Projekt geplant. Hierbei wurden die grundlegenden DNA-Arbeiten, wie die Klonierung eines Kontroll- und Targetvektors für die Gene Targeting Experimente im Labor von Dr. Paul Crocker durchgeführt, da bei diesem alle nötigen Sequenzdaten und grundlegenden Siglec G Vektoren vorhanden waren.

1.9 Generierung einer B-Zell spezifischen SMAD2-defizienten Maus

Einem weiteren Projekt dieser Doktorarbeit lag eine Idee von Dr. Burkhard Kneitz zugrunde. Seine Intention war es, die Rolle des TGF- β Signalmediators SMAD2 auf B-Zellebene näher zu untersuchen. Da Dr. Burkhard Kneitz Zugang zu einer durch Gene Targeting generierten Smad2 Exon2 geflochtenen Maus (Leihgabe von Erwin Böttinger, Raju Kucherlappati) und zu einer CD19-Cre Maus (Rickert et al. 1997) hatte, besaß er die Möglichkeit eine B-Zell spezifische SMAD2-defiziente Maus (bSmad2^{-/-}) zu generieren. Da es sich bei diesen Experimenten um einen komplett

anderen Themenkomplex handelt, sei an dieser Stelle ein etwas ausführlicherer Überblick über TGF- β und seine wichtigsten Signalmediatoren gegeben.

1.10 Transforming growth factor- β (TGF- β) und SMAD Transkriptionsfaktoren

Die Mitglieder der TGF- β Cytokinfamilie, wie zum Beispiel TGF- β , regulieren unter anderem die Entwicklung und Funktion von Immunzellen. Das Cytokin TGF- β bewirkt die Zusammenlagerung von jeweils zwei TGF- β -Rezeptortypen (Typ I und Typ II). Beide Rezeptortypen besitzen eine Serin/Threonin Proteinkinasedomäne in der cytoplasmatischen Region. In der unaktivierten Form ist der TGF- β -Typ I-Rezeptor inaktiv, da eine GS-Domäne das aktive Zentrum blockiert. In dem durch den Liganden induzierten Rezeptorkomplex phosphoryliert der Typ II-Rezeptor die GS-Domäne und aktiviert somit den Typ I-Rezeptor. Dieser kann nun wiederum die sogenannten R-SMADs (Rezeptor-regulierten SMADs; zB. SMAD2 oder 3) phosphorylieren. Dadurch wird deren Affinität für bestimmte „Ankerproteine“ (zB. im Fall von SMAD2 SARA: SMAD anchor for receptor activation), die die R-SMADs im Zytoplasma der Zelle festhalten, herabgesetzt. Außerdem wird die Affinität für das sogenannten Co-SMAD SMAD4 erhöht. Der so gebildete SMAD-Heterooligomerkomplex kann sich nun in den Nukleus fortbewegen und dort mit transkriptionellen Coaktivatoren oder Corepressoren interagieren (Massagué 2000).

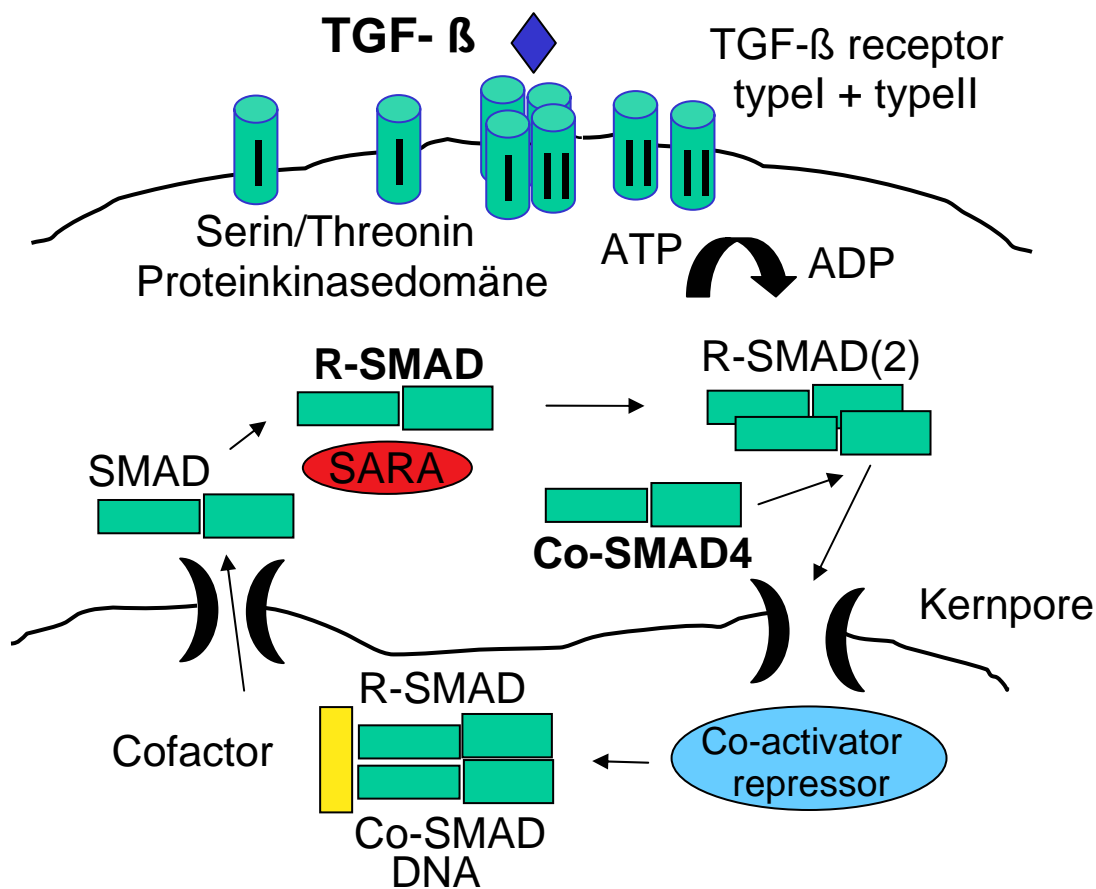


Abb. 6: Schematische Darstellung der TGF- β /SMAD Signalleitung (Massagué 2000).

Die SMAD-Familienmitglieder erfüllen die Rolle der Signalmediatoren für TGF- β in Organismen von Würmern bis hin zum Menschen (Massagué, 1998; Whitman 1998; Raftery und Sutherland 1999). In Vertebraten sind zwei Hauptzweige der SMAD-Signalleitung durch TGF- β bekannt. Zum einen die Typl-Rezeptoren für BMPs (bone morphogenetic proteins), GDFs (growth and differentiation factors) und AMH (anti-Müllerian hormone), die über SMAD1 oder die nahe verwandten SMAD5 und SMAD8 Signale in die Zellen weiterleiten. Zum anderen die Typl-Rezeptoren für TGF- β , Activin und Nodal, die über SMAD2 und SMAD3 wirken.

Einmal im Nukleus angekommen, braucht ein R-SMAD/SMAD4 Heterooligomer spezifische DNA-bindende Cofaktoren, um eine zellspezifische Antwort zu erzielen (Massagué 2000). Diese Cofaktoren, die sowohl an SMAD, als auch an DNA binden müssen, sind zudem spezifisch für eine der erwähnten Gruppen von SMAD-Proteinen (Chen et al. 1998; Hata et al. 2000). Durch die Fähigkeit Cofaktoren zu binden, und zudem die Smad-Zielsequenz: CAGAC-Sequenzen zu erkennen, sind die verschiedenen SMAD-Proteine in der Lage Zielgene selektiv anzusteuern (Yeo et al. 1999; Hua et al. 1999). Es gibt auch reine DNA-bindende Cofaktoren, die keine eigene transkriptionale Aktivität besitzen, wie z.B. FAST (forkhead activin signal transducer; Chen et al 1996) und Mixer (Germain et al. 2000) für SMAD2. Desweiteren existieren Cofaktoren, die selbst Transkriptionsfaktoren sind und zudem wiederum Cofaktoren binden können, wodurch eine exakte Feinregulierung auf dieser Ebene erfolgen kann. Als Beispiel sei hier nur die Familie der CBFAs (core binding factors A) genannt, im Fall von SMAD3 z.B. CBFA3, der für einen IgA-Klassenwechsel mitverantwortlich ist (Pardali et al. 2000; Hanai et al. 1999).

Zudem kann der aktivierte SMAD-Komplex Co-Aktivatoren oder Co-Repressoren binden. Beispiele für Aktivatoren sind p300 und CBP (Massagué 2000), für Repressoren TGIF (TG3-interacting factor; Wotton et al. 1999), SKI (Sloan-Kettering institute proto-oncogene; Sun et al. 1999) und SnoN (Ski-related novel gene N; Sun et al. 1999).

Eine weitere wichtige Erkenntnis ist die Einbindung der TGF- β /SMAD-Signalleitung in ein ganzes Netzwerk von Signalpfaden. Hierbei spielt vorallem der MAPK (mitogen-activated protein kinase)-Signalweg eine wichtige Rolle. Die Versuche auf diesem Gebiet wurden allerdings nur in vitro mit z.B. Milzepithel- (Hanafusa et al. 1999; Sano et al. 1999), und Fibrosarcoma-Zelllinien (Hocevar et al. 1999) durchgeführt. Außerdem wurde eine Verbindung zum Ras-MEK-ERK-Pfad hergestellt, z.B. die ERK vermittelte Phosphorylierung der SMAD-Proteine (Kretzschmar et al. 1997; 1999).

Es wurden bereits eine Reihe von Kontrollmechanismen der TGF- β /SMAD-Signalleitung auf verschiedenen Ebenen gefunden. Schon bevor ein TGF- β -Rezeptor durch ein entsprechendes Cytokin angesprochen wird, können diese durch Proteine wie z.B. Follistatin, Noggin, Chordin, Gremlin und andere gebunden werden (erörtert bei Massagué 2000). Auch auf Rezeptorebene wurde solch ein Mechanismus gefunden. Der BMP-Zweig der TGF- β -Signalleitung kann durch BAMBI (BMP and Activin membrane bound inhibitor), ein verkürzter Typl-Rezeptor, der mit BMP-Rezeptoren interagiert, negativ rückgekoppelt werden.

Zudem wurden SMAD6 (Hata et al.1998; Yamada et al.1999; Zhao et al. 2000; Galvin et al. 2000) und SMAD7 (Nakao et al. 1997; Tsuneizumi 1997) als antagonistische SMAD-Proteine identifiziert, die an andere SMAD-Proteine binden und so eine negative Rückkopplung auslösen.

Desweiteren wurden Mechanismen entdeckt, bei denen selbst-modifizierende Signale eine Rolle spielen. Dies sei anhand des CBFA3 (core binding factors A3) erläutert. Der CBFA3 assoziiert mit einem aktivierten SMAD-Protein-Komplex, der nun in der Lage ist den IgC α (Immunglobulin- α constant region)-Promoter zu erkennen und einen Klassenwechsel nach IgA in B-Zellen zu induzieren (Shi und Stavnezer 1998). Gleichzeitig ist bekannt, daß TGF- β die Expression von CBFA3 in B-Zellen der Milz erhöht und somit das Umfeld für einen SMAD-CBFA3-Komplex selbst variiert (Hanai et al. 1999).

Es existieren bereits eine Anzahl von Mausmodellen, die den TGF- β /SMAD Signalweg untersuchen. Das erste TGF- β Familienmitglied, von dem eine knock out Maus hergestellt wurde, war TGF- β 1 (Shull et al. 1992; Kulkarni et al. 1993), wobei diese Tiere innerhalb von vier Wochen sterben. Von den bekannten SMAD-Proteinen wurden bisher SMAD2 (Weinstein et al. 1998; Nomura und Lee 1998), SMAD3 (Datto et al. 1999; Yang et al. 1999; Zhu et al. 1998), SMAD4 (Sirard et al. 1998) und SMAD5 (Yang et al. 1999) in der Maus erfolgreich durch Gene Targeting ausgeschaltet. Während die SMAD2-, SMAD4- und SMAD5-defizienten Mäuse schon im embryonalen Entwicklungsstadium sterben, überleben die SMAD3 defizienten Tiere abhängig vom Mausstamm und der Ausprägung von Immunkrankheiten. Obgleich SMAD2 Mäuse im Embryonalstadium sterben, gelang es drei unabhängigen Gruppen mit verschiedenen Gene Target Strategien knockout Tiere zu generieren, die verschiedene phänotypische Ausprägungen zeigten (Weinstein et al. 1998; Nomura et al. 1998; Waldrip et al. 1998).

Eine weitere wichtige Arbeit auf dem Gebiet der TGF- β -Signalleitung wurde in der Gruppe um Jürgen Roes angefertigt (Cazac und Roes 2000). Hier wurde eine konditionelle knock out Maus für den TGF- β -Rezeptor TypII in B-Zellen generiert. Durch Gene Targeting wurde der TGF- β -Rezeptor TypII Locus gefloxt (Cre/loxP; Sauer und Henderson 1988; Rajewsky et al. 1996), und dann der Locus durch kreuzen mit einer CD19-Cre Maus (Rickert et al. 1997) in B-Zellen deletiert. Zuvor wurde schon der Versuch unternommen, eine TGF- β -Rezeptor TypII knock out Maus zu generieren, die sich jedoch schon im Embryonalstadium als lethal erwies (Oshima et al. 1996). Sowohl die B-Zellentwicklung, als auch periphere B-Zellpopulationen in der konditionellen knock out Maus für den TGF- β -Rezeptor TypII waren kaum betroffen. Im Gegensatz dazu war eine deutliche Erhöhung des B-1 Zellpools in peritonealen Lavagen dieser Tiere zu sehen. Auch die Peyerschen Plaques (PP) des GALT (engl. gut associated lymphoid tissue) zeigten Veränderungen. Zum einen waren die PP größer und klarer zu unterscheiden, zudem war die totale Anzahl der Leukozyten deutlich erhöht. Die Zellen haben einen aktivierten Status was durch die Anzahl der B-Zellen in den Keimzentren bestätigt wurde (B220/PNA (engl. peanut agglutinin) und B7-2 FACS-Färbungen). Da TGF- β auch in die Zellzykluskontrolle involviert ist (Bouchard et al. 1997), wurden auch BrdU-Experimente durchgeführt, um die Lebensspanne von B-Zellpopulationen der TGF- β -Rezeptor TypII knock out Maus zu untersuchen. Es erwies sich, daß konventionelle B-2 Zellen eine um die Hälfte reduzierte Lebensspanne aufwiesen, während diese bei peritonealen B-1

Zellen um eine ähnliche Größenordnung erhöht war. Die Ig-Level der konditionellen knock out Mäuse für den TGF- β -Rezeptor Typll waren alle erhöht (vor allem IgG1) bis auf IgA, das vor allem in älteren Tieren nahezu nicht mehr zu messen war. Auch auf zellulärer Ebene konnte durch FACS-Experimente gezeigt werden, daß weder Milz-B-Zellen, noch PP-B-Zellen in den defizienten Tieren IgA auf der Oberfläche exprimieren, obgleich gerade die PP ein Ort hoher Produktion von IgA-exprimierenden B-Zellen sind (Butcher et al. 1982). Gleichzeitig konnte in den PP eine ca. $5 \times$ höhere Produktion von IgG1 exprimierenden B-Zellen detektiert werden. Desweiteren wurden Kontroll- und knock out Tiere mit dem thymusabhängigen Antigen NP (4-hydroxy-3-nitrophenyl-acetyl), das an „chicken- γ -globin“ (CG) gekoppelt war immunisiert. Die TGF- β -Rezeptor Typll defizienten Tiere zeigten eine Antwort in allen Immunglobulinen, wobei IgM und IgG3 ca. um das dreifache höher lagen als bei den Kontrolltieren. Im Gegensatz dazu lag die IgA Immunantwort der TGF- β -Rezeptor Typll defizienten Tiere selbst nach einer zweiten Immunisierung (boost) unter einer detektierbaren Grenze.

1.11 Zielsetzung der Doktorarbeit

(1) Generierung einer CD22 Adhäsionsdomänen knock out Mauslinie

Das Hauptprojekt dieser Doktorarbeit war, mittels eines genetischen Ansatzes die Funktion der Adhäsionsdomäne von CD22 in vivo näher zu untersuchen. Die Spezifität von CD22 für α 2,6 gebundene Sialinsäure und die Verantwortlichkeit der V-set Domäne hierfür wurden von verschiedenen Gruppen analysiert (Kelm et al. 1994; Powell et al. 1995; van der Merwe et al. 1996). Anhand der Kristallstruktur von Sialoadhesin (Siglec1), einem Mitglied der Siglec-Proteinfamilie, wurde dessen molekularer Mechanismus der Sialinsäurebindung aufgedeckt (May et al. 1998). Durch molekulares Modellieren und Mutageneseversuche wurde für CD22 ein ähnliches Zuckerbindungsmuster, wie für Sialoadhesin ermittelt. Hierbei spielt bei CD22 ein Arginin (bei der Maus das Arg130) bei der Bindung zu α 2,6 gebundener Sialinsäure die entscheidende Rolle (van der Merwe 1996).

Um diese Effekte nun in vivo verfolgen zu können sollte eine CD22 knock in Maus generiert werden, bei der besagtes Arginin130 durch ein Glutamat ersetzt werden sollte (R130E), um die Bindungsfähigkeit von CD22 zu eliminieren.

Die Vektoren, Target- und Kontrollvektor, für die Gene Targeting Experimente wurden von der Arbeitsgruppe Dr. Anton van der Merwe (von Christina Piperi) angefertigt. Die ursprüngliche Idee war hierbei, einen Targetvektor mit einem genetischen C57BL/6-Hintergrund zu verwenden, um den genetischen Hintergrund der CD22 defizienten Maus (Nitschke et al. 1997) beizubehalten. Mittels homologer Rekombination und der Cre/loxP-Technik sollte nun eine Mauslinie generiert werden, bei der die Bindungseigenschaft der externen V-set Domäne von CD22 an α 2,6 Sialinsäure ausgeschaltet ist.

Mittels der hieraus resultierenden Mauslinie sollte dann die B-Zellentwicklung, Signaltransduktion und der Immunstatus analysiert werden. Der Vergleich des Phänotyps der R130E Maus und der CD22 defizienten Maus sollte dann zeigen, wie die Adhäsions- und Signalleitungseigenschaften von CD22 zusammenhängen. Schließlich sollte durch die Analyse der B-Zellen des Knochenmarks und dessen Struktur die Frage des Knochenmarkhomings geklärt werden.

(2) Generierung einer SiglecG knock out Mauslinie

Ein weiteres Mitglied der Siglecproteinfamilie, das murine SiglecG (homolog zu humanen Siglec10), wurde in dieser Arbeit behandelt. In Zusammenarbeit mit dem Labor von Dr. Paul Crocker und vor allem seiner Mitarbeiterin Sheena Kerr war die Idee dieses neue Siglec in vivo durch Generation einer knock out Maus zu untersuchen. Die Strategie für die Gene Targeting Experimente für einen SiglecG knock out basierten auf der Verwendung der Balb1 (Noben-Trauth et al. 1996) ES-Zelllinie (aus BALB/c Mäusen), da hiermit sehr gute Erfahrungen vorlagen, was die Stabilität ihrer Omnipotenz und des Keimbahntransmissionspotenzials angeht. Desweiteren war die nächste Überlegung den Großteil der extrazellulären V-set Domäne, die die Bindungseigenschaften von SiglecG mit Sialinsäure ausmachen, zu eliminieren. Daher wurde im Labor von Paul Crocker (von Sheena Kerr) ein Kontroll- und ein Targetvektor kloniert, letzterer sollte dann für die folgenden Gene Targeting Experimente verwendet werden. Die Vorgehensweise zur Generierung der SiglecG knock out Maus sind im Ergebnisteil geschildert.

(3) Analyse der B-Zell spezifischen SMAD2 knock out Mauslinie

Wie schon oben erwähnt kam eine weitere Zusammenarbeit mit Dr. Burkhard Kneitz (Physiologische Chemie I, Biozentrum, Universität Würzburg) zustande. Seine Intention war es, die Rolle des TGF- β Signalmediators SMAD2 auf B-Zellebene näher zu untersuchen. Da Dr. Burkhard Kneitz Zugang zu einer durch Gene Targeting generierten Smad2 Exon2 geflochten Maus (Leihgabe von Erwin Böttinger, Raju Kucherlappati) und zu einer CD19-Cre Maus (Rickert et al. 1997) hatte, besaß er die Möglichkeit eine B-Zell spezifische SMAD2 knock out Maus (bSmad2^{-/-}) zu generieren.

Meine Aufgabe bestand darin, das B-Zellkompartiment und die Immunantworten der B-Zell spezifischen Smad2-defizienten Maus zu analysieren.

2. Material und Methoden

2.1 Bezugsquellen für Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden hauptsächlich von Roth (Karlsruhe) bezogen. Weitere Firmen waren Amersham Pharmacia Biotech (England), Applied Biosystems, Bio-Rad (München), Chemicon (Californien), Fluka (Neu-Ulm), Gibco/Invitrogen (Hilden), HT BIOTECHNOLOGY LTD (Cambridge, E) MBI/Fermentas (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Pall Corporation (NY, USA) Pharmacia (Freiburg), Quantum/Appligene, Sigma (Taufkirchen), Southern Biotech (Birmingham, USA) Stratagene (La Jolla, Ca).

Radiochemikalien lieferte anfangs die Firma Amersham Pharmacia Biotech (England) und später Hartmann Analytic (Braunschweig).

2.2 Synthetische Nucleinsäuren

Alle verwendeten Längenstandards (100 Bp Leiter, 1 Kb Leiter, DNA Marker II für genomische DNA), sowie dNTPs und pd(N)_6 wurden von MBI/Fermentas bezogen. Synthetische Oligonucleotide wurden von BIG BIOTECH GmbH (Freiburg) bezogen.

2.3 Bakterienstämme

In der Regel wurde für alle Arbeiten mit Bakterienstämmen, wenn möglich, *E. coli* DH5 α herangezogen (eventuell wurde sogar aus anderen Bakterienstämmen neu in *E. coli* DH5 α transformiert). Aus der Empirie heraus erwies es sich, daß andere Bakterienstämme als *E. coli* DH5 α bei bestimmten Anwendungen Probleme bereiteten (zB. bei Sequenzierungen). Die verwendeten Bakterienstämme und deren Genotypen waren:

***E. coli* DH5 α**

Genotyp: F⁻, endA1, hsdR17(r^k,m⁺k), supE44, thi-1, λ^- , recA1, gyrA96, relA1, ϕ 80dlacZ α deltaM15

***E. coli* INV α F'**

Genotyp: endA1, recA1, hsdR17(r^k,m⁺k), supE44, λ^- , thi-1, gyrA, relA1, ϕ 80lacZ α deltaM15delta(lacZYA-argF), deoR+, F'

***E. coli* NM522:**

Genotyp: (F⁻lacIq Δ (lacZ)M15, proA⁺, proB⁺, Δ (hsdMS-mrcB)5, Δ (lac-proAB), supE thi-1 lambda)

2.4 Medien für Bakterienkulturen

LB-Medium (Luria-Bertani Medium)

Bacto-Trypton	10 g/l
Bacto-Yeast-Extrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l

LB-Medium wird vor Gebrauch 20 min bei 120 °C autoklaviert.
Agarplatten enthalten zusätzlich 15 g Agar pro Liter LB-Medium.

SOC-Medium

Bacto-Trypton	20 g/l
Bacto-Yeast-Extrakt	5 g/l
NaCl	0,5 g/l
Glucose	20 mM

Als **Antibiotikazusätze** zu Bakterienmedien wurden Ampicillin und Kanamycin verwendet:

Ampicillin: Stock-Lösung: 50 mg/ml (in H₂O)
Konzentration im Medium: 100 µg/ml
Kanamycin: Stock-Lösung: 25 mg/ml
Konzentration im Medium: 50 µg/ml

Alle Puffer und sonstige Lösungen, die für die DNA-Arbeiten verwendet wurden, sind bei der jeweiligen Methode mit ihrer Zusammensetzung angegeben.

2.5 Die DNA-Arbeitsmethodik

Für die grundlegenden Arbeiten mit DNA wurden die gängigen Techniken (Maniatis et al.) verwendet. Dies bezieht sich auf die Generierung sämtlicher Vektoren und Sequenzinformationen der Doktorarbeit. In den meisten Fällen wurden DNA-Abschnitte durch Klonierung in einen Vektor transferiert, dieser Vorgang umfaßt die Gewinnung von DNA-Fragmenten, Ligation mit einem Vektor, Transformation in Bakterien oder Transfektion von eukaryotischen Zellen bis hin zu Kontrollen, wie Sequenzierung oder Southern-blot.

2.5.1 Restriktionsenzyme und Gelelektrophorese

Ein unerläßliches Werkzeug für das molekulargenetische Arbeiten sind die Restriktionsendonucleasen, welche DNA in spezifische Fragmente spalten. Sie erkennen bestimmte palindrome Sequenzen, und schneiden die Doppelhelix dann an Erkennungssequenzen, wozu Mg²⁺ benötigt wird. Diese können entweder kohäsive

(sticky) oder glatte Enden (blunt end) haben (Kessler et al. 1985; Kornberg et al. 1974). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurden zum größten Teil von MBI, Fermentas (Heidelberg) hergestellt und nach deren Vorgaben eingesetzt.

Die durch ein bestimmtes Restriktionsenzym erzeugten Fragmente können dann durch Gelelektrophorese aufgetrennt werden. In vielen Geltypen ist die elektrophoretische Beweglichkeit umgekehrt proportional zum Logarithmus der Anzahl der Basenpaare. Je nach erwarteter Fragmentgröße verwendet man zur Auftrennung 0,6-3 %ige mit $1 \times$ TBE angesetzte Agarosegele. Man kann die DNA z.B. durch in die Doppelhelix interkalierendes Ethidiumbromid (10 mg/ml), das in UV-Licht rot fluoresziert, sichtbar machen. Die Proben werden mit Laufpuffer (loading buffer) versetzt unter 30-150 V Spannung elektrophoretisch aufgetrennt, um dann im UV-Transilluminator sichtbar gemacht zu werden.

$1 \times$ TBE-Puffer	1	M	Tris-HCL
	0,85	M	Borsäure
	2	mM	Na ₂ EDTA; pH 8,3

$10 \times$ Loading buffer	0,25 % Bromphenolblau
	0,25 % Xylencyanol
	30 % Glycerin

2.5.2 DNA-Gelelution

Um bestimmte DNA-Fragmente zur weiteren Verwendung aus einem Agarosegel zu eluieren wurde in dieser Arbeit entweder das „QIAEX Gel Extraction Kit“ von QIAGEN oder „low melting agarose“ benutzt.

Bei ersterer Methoden wird das gewünschte DNA-Fragment mit einem sterilen Skalpell mit einer UV-Handlampe aus dem Gel ausgeschnitten, um dann laut Protokoll mit Hilfe einer Ionenaustauschsäule die DNA in einem geeigneten Elutionspuffer zu isolieren.

Bei der zweiten Methode wird das zu isolierende DNA-Fragment zuerst auf einem klassischen Agarosegel aufgetrennt. Die gewünschte DNA-Bande wird mit der UV-Handlampe lokalisiert und unterhalb ein Stück mit einem Skalpell aus dem Agarosegel entfernt. Nun wird in die entstandene Lücke des Agarosegels erwärmte „low melting agarose“ (Schmelzpunkt 37 °C und 0,35 % konzentriert) gefüllt, bis diese wieder geschlossen ist. Nun wird das DNA-Fragment durch abermalige Gelelektrophorese in die „low melting agarose“ aufgetrennt. Dieses Stück kann dann unter einem Transilluminator ausgeschnitten werden, um dann direkt aus der „low melting agarose“ (nach vorherigem Erhitzen) für weitere DNA-Arbeiten (zB. Sequenzierung oder Subklonierung) weiterverwendet zu werden. Diese Methode ist zum Beispiel geeignet, um sehr geringe Mengen DNA zu isolieren, da die Elution mit einem Kit meist mit einem gewissen Verlust an DNA verbunden ist.

2.5.3 UV-Spektrometrie zur Nukleinsäure Konzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung von gelöster DNA wird diese 1:50 oder 1:100 mit ddH₂O verdünnt und in eine gereinigte und gegen ddH₂O kalibrierte Quarzküvette gefüllt. Anschließend wird mit einem UV-Spektrophotometer die OD der DNA-Lösung beim Absorptionsmaximum von 260 nm gegen ddH₂O als Referenz gemessen. Da eine OD₂₆₀ von 1,0 einer DNA-Konzentration von 50 mg/ml entspricht, läßt sich der Wert der UV-Spektrometrie nach folgender Formel in die DNA-Konzentration umrechnen:

$$\text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 = x \text{ mg DNA/ml}$$

Bei einzelsträngiger DNA gilt:

$$\text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 33 = x \text{ mg DNA/ml}$$

Die Messung der OD₂₈₀ nm gibt zudem Aufschluß über den Grad der Proteinverunreinigung und damit Reinheit der Präparation, indem der Quotient aus OD₂₆₀ und OD₂₈₀ gebildet wird. Ein Wert um 1,8 stellt dabei ein gutes Ergebnis dar. Werte die unter diesem liegen deuten auf eine Proteinverunreinigung hin.

2.5.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Das benötigte DNA-Fragment wird dann in einen geeigneten Vektor kloniert. In vielen Fällen wird mit dem Phagemid pBluescript[®], der 2961 bp groß ist und ein pUC19 Abkömmling ist, gearbeitet. Ein Phagemid ist ein Plasmid mit einem Replikationsstartpunkt eines Phagen. Die wichtigsten Bestandteile sind eine „multiple cloning site“, ein Ampicillinresistenzgen und das lacZ-Gen.

(a) Linearisierung des Vektors

Der Phagemid pBluescript besitzt eine „multiple cloning site“, daher können eine Vielzahl von Restriktionsenzymen für eine Klonierung verwendet werden. Abhängig von den im Vektor vorhandenen Schnittstellen wählt man ein Enzym aus, welches das gewünschte DNA-Fragment flankierend schneidet. Mit dem gleichen Enzym wird der Vektor linearisiert und anschließend mit dem Fragment ligiert.

(b) Dephosphorylierung des Vektors

Zur Verhinderung der Selbstligation des Vektors werden die 5'-Phosphatenden mit Hilfe der „calf intestinal alkaline phosphatase“ (CIAP) abgetrennt.

Die CIAP ist ein dimeres Glykoprotein, das nur in Anwesenheit von vier Zinkatomen aktiv ist (Simsek et al. 1973). Der linearisierte Vektor wird mit Reaktionspuffer und dem Enzym 30 min. bei 37 °C inkubiert. Um eine vollständige Dephosphorylierung zu gewährleisten muß man ca. 1 unit/100pmol Vektor einsetzen (Maniatis et al.). Der Ansatz wird, wie beschrieben, mittels Gelelektrophorese eluiert.

10 × <i>Dephosphorylierungspuffer</i>	10	mM	ZnCl ₂
	10	mM	MgCl ₂
	100	mM	Tris-HCl; pH 8,3

2.5.5 Ligation eines DNA-Fragments mit einem Vektor

Die T4-DNA-Ligase bildet Phosphodiesterbindungen zwischen den freien 5'-Phosphor- und 3'-Hydroxylgruppen doppelsträngiger DNA aus. Hierzu benötigt sie ATP oder NAD⁺. Die T4-DNA-Ligase ist in der Lage sowohl kohäsive, als auch glatte Enden zu verbinden.

Das Verhältnis Insert zu Vektor sollte bei kohäsiven Enden ca. 1:3 betragen, um eine optimale Menge rekombinanter DNA zu erhalten (Sambrook et al 1989). Bei glatten Enden kann man 15 % Polyethylenglykol (PEG) hinzugeben, um die sterischen Bedingungen zu optimieren (Maniatis et al.).

Die Ligationsreaktion wird zwischen 4 und 16 °C ü.N. durchgeführt.

10 × <i>Ligationspuffer</i>	660	mM	Tris-HCL; pH 7,6
	66	mM	MgCl ₂
	100	mM	DTT
	660	mM	ATP

2.5.6 Transformation der rekombinanten DNA in kompetente Bakterienzellen

Zur Vervielfältigung rekombinanter DNA wird diese in einen bakteriellen Wirtszellenstamm eigener Wahl (z.B. DH5 α , INV α F' oder NM522) eingeschleust. Die Wahl des Bakterienstammes kann bei einigen Experimenten aufgrund des speziellen Genotypes von entscheidender Bedeutung sein. Die Transformation kann z.B. durch Hitze-, oder Elektroschock erfolgen. Es werden jeweils kompetente Bakterien benötigt, welche für diese beiden Methoden unterschiedlich hergestellt werden.

Für die Hitzeschockmethode werden die Zellen durch Alkali- und Erdalkaliionen aufnahmefähiger gemacht (Hanahan 1983). Zuerst wird der Bakterienstamm aus einem Glycerolstock auf eine LB-Platte ausgestrichen. Davon wird eine einzelne Kolonie gepickt und eine 2 ml Kultur ü.N. angeimpft. 500 μ l dieser Kultur werden zu 100 ml LB-Medium in einen sterilen Erlenmeyerkolben gegeben, und bei 37 °C und 225 rpm geschüttelt. Befinden sich die Zellen in der mittleren logarithmischen Wachstumsphase (bei OD600 sollte ein Wert von 0,6 nicht überschritten werden) wird der Kolben auf Eis mind. 30 min. gekühlt, damit der Zellmetabolismus zum Erliegen kommt. Nun werden die Zellen unter Kühlung und max. 3000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen in eiskalter TfbI-Lösung

resuspendiert, dann bei 4 °C und 3000 rpm abzentrifugiert. Jetzt werden die Zellen in TfbII-Lösung aufgenommen und in Volumina der Wahl unter Ethanol/Trockeneis aliquotiert. Die so gewonnenen kompetenten *E.coli*-Zellen werden in flüssigen Stickstoff gelagert.

LB-Medium 20 g Bacto-Tryptone
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
2,5 g MgSO₄ → ad 1l

TfbII-Lsg. 100 mM CaCl₂
30 mM KOAc
50 mM MnCl₂
15 % Glycerin

TfbII-Lsg. 10 mM Na-MOPS; pH 7,5
75 mM CaCl₂
10 mM KCl
15 % Glycerin

2.5.7 Transformationsvorgang

Vorbereitend müssen Agar-Platten hergestellt werden. Hierzu wird LB-Medium mit 15 g Agar pro Liter autoklaviert und dieses noch handwarm auf Plastikpetrischalen verteilt. Soll auf ein Antibiotikum selektioniert werden, wird das Medium in handwarmen Zustand mit der entsprechenden Menge Antibiotikum aus einem hochkonzentrierten Stock heraus versetzt. Die kompetenten Wirtsbakterien werden aus -80 °C für mind. 15 min. auf Eis gestellt. Der Ligationsansatz (max. 1/10 des Gesamtansatzes) wird vorsichtig zu 50-100 µl kompetenter Zellen gegeben und ca. 30 min. auf Eis stengelassen. Dann wird der Ansatz 45 s auf 42 °C erhitzt und mind. 2 min. auf Eis gestellt. Es werden jetzt 400 µl SOC-Medium hinzugegeben und die Zellen mind. 45 min. bei 37°C und 225 rpm regeneriert.

Bei der Elektrotransformation läuft der Vorgang ähnlich ab, bloß wird für den Transfer ein Pulsgenerator verwendet. Je nach erwarteter Effizienz der Transformation werden 2-100 µl des Ansatzes auf Agarplatten ausplattiert und ü.N. bei 37 °C inkubiert.

Die Antibiotikaresistenz dient zur Selektion auf erfolgreiche Transformation.

SOC-Medium 20 g Bacto-Tryptone
5 g Hefeextrakt
0,5 g NaCl
20 mM Glucose

2.5.8 Alkalische Isolation von DNA (Plasmiden) aus Bakterienkulturen und präparative Isolation mittels DNA-Kits

Mit rekombinanter DNA transformierte Bakterien enthalten nun große Mengen des gewünschten Plasmids. Die Prozedur, die angewandt wird, um das Plasmid aus dem Wirtsbakterium zu isolieren nennt man Minipräparation.

Zuerst wird das Plasmid mittels ü.N.-Kultur (LB-amp) in 3-5 ml bei 37 °C und 225 rpm vervielfältigt. Von diesen Kulturen werden 2-4 ml 1 min. bei 9000 rpm in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Dann wird das Pellet in 200 µl Lösung 1 resuspendiert, so daß eine trübe Lösung ohne Klumpen entsteht. Nun werden 400 µl frisch angesetzte Lösung 2 hinzugegeben und sofort mehrmals invertiert, damit ein homogenes Gemisch entsteht, somit werden die Bakterien lysiert (Schritt max. auf 5 min. ausdehnen). Die Lösung sollte jetzt sehr viskos und relativ klar sein. Jetzt werden 300 µl Lösung 3 zugegeben und abermals mehrmals invertiert. Bei diesem Schritt werden die Bakterienproteine ausgefällt, die nun durch Zentrifugation bei 13000 rpm abgetrennt werden. Der das Plasmid enthaltende Überstand wird nun in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Daran anschließend wird mit 70 % Ethanol gewaschen. Nachdem das Pellet einige min. getrocknet wurde, kann es in ddH₂O oder TE-Puffer aufgenommen werden (die Degradationsgefahr ist bei Wasser ungleich größer!).

Lösung 1 50 mM Glucose
 25 mM Tris-HCl; pH 8,0
 10 mM Na₂EDTA; pH 8,0
 ad ddH₂O

Lösung 2 0,2 N NaOH
 1 % SDS
 ad ddH₂O

Lösung 3 11,5 % Essigsäure
 3 M NaOAc
 ad ddH₂O
 pH 5,5 mit 100 % Essigsäure einstellen

Für die Präparation von großen DNA-Mengen wurden QIAprep-Kits (Qiagen, Hilden) verschiedener Art laut Protokoll verwendet.

2.5.9 Isolation genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen

Je nach Zelltyp wird eine genügend große Menge von Zellen eingesetzt. Bei der Präparation von genomischer DNA aus ES-Zellen z.B. wird eine mittlere bis große Zellkulturflasche adherente, dichte ES-Zellen, welche zuvor trypsiniert wurden, eingesetzt (die Zellzahlen lagen hier zwischen 5×10^7 und 1×10^8). Die Zellen werden nun zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, um dann in Lysis-puffer 1 aufgenommen zu werden (ca. 0,15 ml für 3×10^7 Zellen). Jetzt wird das gleiche Volumen Lysispuffer 2 addiert, um die Zellen zu lysieren, und schließlich wird Proteinase K bis zu einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml hinzugegeben. Dieser Cocktail wird über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

Nun wird mehrmals Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert (max. dreimal). Schließlich wird die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 100 % Ethanol und 7,5 M NH_4Ac gefällt. Nun kann die DNA entweder abzentrifugiert, oder auf Glaspipetten aufgewickelt werden, um dann mit 70 %igen Ethanol gewaschen zu werden. Schließlich wird die DNA in einem geeigneten Volumen H_2O oder TE-Puffer resuspendiert (eventuelles Erhitzen auf 56 °C und moderates Schütteln).

Lysispuffer 1 50 mM TrisHCl; pH 8,0
 100 mM NaCl
 100 mM EDTA

Lysispuffer 2 wie Puffer 1 + 1 % SDS

2.5.10 Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI)- Reinigung und Fällung

Die sauberste und effizienteste Methode die so gewonnene DNA aufzureinigen ist die PCI-Reinigung. Sowohl DNA, als auch RNA können durch PCI (25:24:1)-Extraktion von Proteinen gereinigt werden. Hierzu fügt man bei DNA 1 × Volumen PCI-Lösung zu der Probe hinzu und mischt kräftig. Nun wird einige min. bei ca. 3000 rpm bis zur Phasentrennung zentrifugieren. Die obere wässrige Phase, welche die DNA enthält, wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt, wobei darauf geachtet werden muß, daß die weiße Interphase mit all ihren Verunreinigungen nicht übernommen wird. Dann kann der Extraktionsschritt falls nötig wiederholt werden. Zur Sicherheit, um Phenolreste zu entfernen, kann nun die wässrige Phase nochmal mit Chloroform/ Isoamylalkohol (24/1) extrahiert werden.

Die DNA-Lösung vermischt man mit 0,1 Vol 3 M NaOAc-Lösung, pH 5 und 2,5 Vol Ethanol (100 %). Aufgrund der ungenügenden Hydratisierung der Phosphatgruppen in den Alkalisalzen der DNA kommt es nun zu einer Ausfällung der DNA in der 70 %igen Ethanol-Lösung. Zur quantitativen Fällung kann die DNA bei RT oder gekühlt inkubiert werden. Dann wird das Gemisch bei max. Umdrehungszahl in einer

Tischzentrifuge zentrifugiert und in einem gewünschten Volumen H₂O oder TE-Puffer aufgenommen.

2.5.11 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (Saiki et al. 1985; Erlich et al. 1988) ermöglicht die in vitro Amplifikation eines gewünschten DNA-Abschnitts aus einem heterogenen DNA-Gemisch. Hierzu werden zumindest so viele Informationen über den zu amplifizierenden Abschnitt benötigt, daß man Oligonukleotidprimer (meist 16-30 bp lang) konstruieren kann, die die betreffende Sequenz flankieren. Die Wahl der Primer ist essentiell für das Gelingen der PCR. Es ist darauf zu achten, daß möglichst keine Primerdimere und keine Eigenhybridisierung des Primers stattfindet.

Die PCR beginnt mit dem Vordenaturieren (94-96 °C), bei dem der zu amplifizierende DNA-Abschnitt in ssDNA überführt wird. Jeder der 25-35 jetzt folgenden Verdoppelungszyklen besteht aus den immer drei gleichen Schritten. Zunächst erfolgt die Denaturierung (94-96 °C), dann eine Abkühlung und das Hybridisieren der Oligonukleotidprimer an das DNA-Template und dann die DNA-Synthese (72 °C), zu der die vier Desoxyribonukleotide und eine hitzestabile DNA-Polymerase (meist ein Enzym aus einem Abkömmling des Bakteriums *Thermus aquaticus*) benötigt werden. Bei jedem der Zyklen dient die bereits vorhandene DNA als Matrize, somit wird die DNA bei jedem Zyklus verdoppelt. Somit ist es möglich mit wenig Ausgangsmaterial eine Kopienanzahl von bis zu 10⁶ zu erzielen, eine Menge die auf einem Agarosegel gut zu identifizieren ist.

Diese Methode hat jedoch durchaus ihre Grenzen, alleine schon durch eine max. Länge, die amplifiziert werden kann (eventuelles Ausweichen auf leistungsfähigere Enzyme). Ein typischer Reaktionsansatz setzt sich dabei wie folgt zusammen:

×	µl ddH ₂ O
5	µl 10 × Reaktionspuffer
1,5	µl dNTPs (100 mM)
1,5	µl forward Primer (60 ng/µl)
1,5	µl backward Primer (60 ng/µl)
0,1	µl (ca. 0,5 u) SuperTaq (HT Biotechnology LTD, England)
	50-200 ng DNA-Template
<hr/>	
	50 µl Gesamtvolumen

Für eine größere Anzahl von Proben wird ein Mastermix ohne DNA, die dann in ein Reaktionsgefäß vorgelegt wird, angefertigt und dann jeweils die entsprechende Menge des Mixes addiert. Ein typisches Programm für den Thermocycler sieht wie folgt aus:

94 °C	3-5 min.	Vordenaturieren
94 °C	45 s	Denaturieren
× °C	45 s	Annealing (×: je nach T _D des Primers)
72 °C	45 s- 3 min.	Extension
→	25-35 Zyklen	
72 °C	4 min.	Final Extension

Die genaue Annealingtemperatur (T_A) des jeweiligen Primers kann z.B. aus der Dissoziationstemperatur (T_D) berechnet werden:

$$T_D = (A + T) * 1 + (G + C) * 2$$

$$T_A = T_D - 2-3 \text{ °C}$$

Abgesehen von der Annealingtemperatur kann auch die MgCl₂-Konzentration, sowie die Zugabe hochmolekularer Chemikalien (wie z.B. Formamid), ausschlaggebend sein.

10 × PCR-Puffer	100	mM	Tris-HCl; pH 9,0
	15	mM	MgCl ₂
	500	mM	KCl
	1	%	Triton X-100
	0,1	%	(w/v) stabilizer

2.5.12 Southern Blot: Analyse genomischer DNA

Diese von Southern (1975) entwickelte Methode zur Immobilisierung von DNA auf einer Membran ermöglicht eine beliebig oft wiederholbare Analyse dieser DNA mit spezifischen Hybridisierungssonden. Nach der Elektrophorese photographiert man die DNA Fragmente zusammen mit einem Lineal (eventuell mit Fluoreszenzfarbstoff versehen), um die bei einer anschließenden Hybridisierung erhaltenen spezifischen Signale zuordnen zu können. Besteht die zu blottende DNA aus sehr großen Fragmenten (z.B. Restriktionsverdau von genomischer DNA), so wird diese für zweimal 10 min mit einer 0,25 M HCl-Lösung depurinisiert. Anschließend denaturiert man die DNA für zweimal 15 min in Denaturierungslösung (0,4 N NaOH). Auf eine mit Transferpuffer (0,4 N NaOH) gefüllte Kunststoffwanne legt man eine Glasplatte, auf die eine aus dickem Filterpapier (3 MM Whatman-Papier) bestehende Pufferbrücke so gelegt wird, daß die beiden Enden in den Puffer eintauchen. Das Agarose-Gel wird dann umgekehrt (Geltaschen liegen auf dem Whatman-Papier) auf dieses Filterpapier plziert. Auf das Gel wird eine trockene Nylonmembran luftblasenfrei aufgelegt. Auf die Membran gibt man zwei in gleicher Weise befeuchtete, sowie drei trockene Whatman 3MM Filterpapiere. Zur Verstärkung der Kapillarkräfte werden darauf noch ca. 10-15 Lagen Zellstoff gelegt. Das Ganze wird mit einer Glasplatte abgedeckt und mit einem Gewicht beschwert (Abb. 7). Das Blotten erfolgt für mindestens 4 h, besser ü/N.

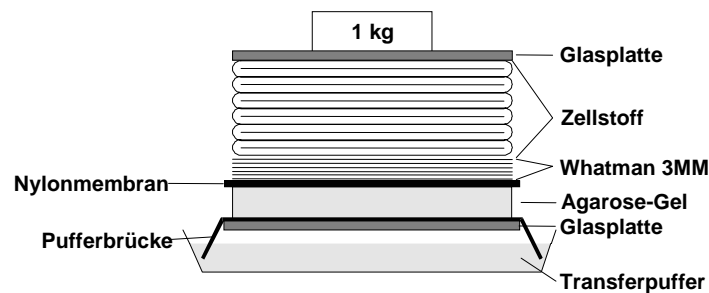


Abb. 7: Aufbau eines Southern-Blots (schematisiert).

Zum Abbau des Blots wird der Zellstoff und das Whatman 3MM-Papier entfernt. Das Gel und die daran haftende Membran werden umgedreht und die Geltaschen mit einem Bleistift durchgezeichnet. Die Membran wird kurz in $2 \times$ SSC-Puffer gespült und anschließend mit Zellstoff abgetupft (Nylonmembran darf nie trocken werden!). Durch *UV-crosslinking* wird die DNA dauerhaft an die Membran gebunden. Das UV-Licht bewirkt, daß ein kleiner Teil der Thymidinreste der DNA mit positiv geladenen Amingruppen der Membran verbunden werden (Church und Gilbert 1984). Es gibt mehrere Variationen des Southern-Blots z.B. den Squash- oder den Sandwichblot. Beim Squashblot wird das Gel direkt auf eine feste Unterlage gelegt und beim Sandwichblot kommen zwei Membranen zum Einsatz.

2.5.13 Screenen von DNA-Fragmenten durch radioaktive Hybridisierung

Im Jahre 1965 zeigten Gillespie und Spiegelman, daß DNA-Sequenzen durch Hybridisierung mit radioaktiven Sonden identifiziert werden können. Je länger die DNA-Sonden sind, desto stärker das Signal, weswegen eine Hybridisierung mit zu kurzen Fragmenten (z.B. Oligonukleotidprimern) immer mit Schwierigkeiten verbunden ist. Für eine Hybridisierung benötigt man eine radioaktiv markierte Sonde, diese kann man z.B. durch „random priming“ oder durch „end-labeling“ gewinnen.

2.5.14 Herstellung radioaktiver Sonden

Für das „random priming“ wird das große Fragment (Klenow-Fragment) der DNA-Polymerase I verwendet, das eine 3'-5'- Exonuclease und Polymerase ist. Somit ist das Klenow-Fragment geeignet in 5'-3'- Richtung einer DNA-Matrize zusätzliche Nucleotide anzuhängen. Hierzu wird die gewünschte Menge DNA in H_2O 5 min. bei $100\text{ }^\circ\text{C}$ denaturiert und dann sofort auf Eis gestellt. Dann werden folgende Reagenzien hinzugefügt:

10 µl	5 × OLB-Puffer
2 µl	BSA (10 mg/ml)
5 µl	[α - ³² P]-dCTP (ca. 50 µCi)
1 µl	Klenow-Fragment (4U/µl)
	Ad 50 µl

Dieser Reaktionsansatz wird 1 h bis ü.N. bei 37 °C inkubiert. Der OLB-Puffer enthält als wichtigste Bestandteile unmarkierte Nukleotide, sowie hexamere Oligonukleotidprimer, die zufällig an das DNA-Template anlagern.

5 × OLB-Puffer besteht aus einem Gemisch der Lösungen A,B,C in Verhältnis 1:2,5:1,5

Lösung	Konz./Volumen	Substanz
0	1,25 M 0,125 M	Tris-HCl pH 8,0 MgCl ₂
A	1 ml 18 µl 5 µl 5 µl 5 µl	Lösung 0 β-Mercaptoethanol dATP (100 mM) dGTP (100 mM) dTTP (100 mM)
B	2 M	Hepes pH 6,6
C	50 O.D.Units	pd(N) ₆

Desweiteren wurden in der vorliegenden Arbeit zwei käuflich erwerbbar Kits verwendet: „Random Primers DNA Labeling System (Gibco, BRL, Hilden) und „Nona Primer Kits I & II (Quantum, Appligene), die auf der Random-Priming Methode von Feinberg und Vogelstein (Feinberg and Vogelstein 1983) beruhen.

2.5.15 Reinigung der Sonden, Hybridisierung, Waschen der Nylonmembranen und Autoradiographie

Die Reinigung der Sonden erfolgt entweder mit Hilfe der Gelfiltrations-Chromatographie (Sephadex G-25), oder unter Verwendung des „Nucleotide Removal Kits“ (Gibco, Hilden). Dadurch ist es möglich, markierte DNA-Sonden von überschüssigen, freien ³²P-markierten Nukleotiden zu trennen.

Die geblotteten Nylonmembranen werden in einer Glasröhre mit QuickHyb-Hybridisierungslösung (Stratagene) ca. 45 min. bei der gewählten Hybridisierungstemperatur (60-68 °C) prähybridisiert. Nach Auswechseln der QuickHyb wird die denaturierte (5 min, 96 °C), radioaktiv markierte, Sonde hinzugegeben, um jetzt 2h bis ü.N. zu hybridisieren. Nach dem Entfernen der

QuickHyb wird die Nylonmembran mind. 3 × mit 0,2 × SSC/0,1% SDS in der Hybridisierungsröhre gewaschen. Je nach noch zu detektierender Strahlung (Geiger-Müller-Zählrohr) wird nochmals gewaschen oder die Membran in eine Plastikfolie eingeschweißt und ein Röntgenfilm mind. ü.N. darauf exponiert.

2.5.16 Sequenzierung von Plasmiden und genomischer DNA

Zur weiteren Verifikation von DNA-Abschnitten wurden diese mit fluoreszenzmarkierten Nucleotiden (Abi Med Big Dyes DNA Sequencing Kit) thermozyklisch amplifiziert und dann im Lasersystem eines Sequenziergerätes (AbiMed Prism 310, Applied Biosystems) analysiert. Um eine höhere Genauigkeit und ein reineres Template zu erhalten wurde (vorallem bei genomischer DNA) der Zwischenschritt über eine spezifische PCR (event. geschachtelte PCR), die mit einem „Nucleotide removal kit“ aufgereinigt wurde, gewählt. Ein typischer Reaktionsansatz sieht dabei wie folgt aus:

0,5-1,5 µg	DNA-Template
60-70 ng	spezifischer Primer
2,5-5 %	DMSO (optional)
4 µl	Big Dyes Sequencing Mix (Applied Biosystems)
ad 20 µl	H ₂ O

Dieser Ansatz wird in einem Thermocycler (Biometra) folgendermaßen amplifiziert:

30 s	96 °C	
15 s	50 °C	
4 min	60 °C	25 Zyklen

Das Reaktionsprodukt wird nun gefällt und in einem Sequenziergefäß (Genetic Analyzer Tube, Applied Biosystems) in TSR (Template Supression Reagent, Applied Biosystems) aufgenommen, um dann analysiert zu werden.

10 µl	Sequenzieransatz	
90 µl	H ₂ O	
10 µl	Natriumacetat, pH 5,2	
250 µl	EtOH (RT)	mischen, 20 min 14000 rpm

Das Pellet wird zweimal mit 70 % EtOH gewaschen, dann in TSR aufgenommen, und schließlich 2 min denaturiert. Nun kann die Sequenzierung des Reaktionsansatzes im Sequenziergerät (AbiMed Prism 310, Applied Biosystems) erfolgen.

2.6 ES-Zellarbeitsmethodik

2.6.1 Zellkulturmaterialien und grundlegende Arbeitstechniken

Medien: EMFI-Medium

1 × DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO/Invitrogen), 10% ES-Zell getestetes FCS (PAN, später GIBCO/Invitrogen), 2 mM L-Glutamin, 0,1 mM β -Mercaptoethanol, Penicillin/Streptomycin je 100 μ g/ml, 0,375% Natriumbicarbonat.

ES-Zellmedium

Hergestellt wie EMFI-Medium, aber mit 15 % ES-Zell getestetem FCS (PAN, später GIBCO/Invitrogen) und anfangs mit einem CHO-Zellen LIF-Überstand, später mit einem rekombinanten LIF (ESGRO, Chemicon) versetzt. Zu Selektionszwecken werden 0,4 mg/ml Geneticin (Gibco/Invitrogen), bzw. 2 μ M Ganciclovir (Sigma/Taufkirchen) hinzugegeben.

Blastocysteninjektionsmedium

ES-Zellen für die Injektion werden in DMEM/10 % FCS und 0,1 mM β -Mercaptoethanol aufgenommen.

Blastocystenisolationsmedium

Für die Blastocystenisolierung werden M2 und M16-Medium und embryonengetestetes Parafinöl von Sigma (Taufkirchen) verwendet.

Einfriermedium für ES-Zellen und andere Zelllinien

Für die Konservierung von ES-Zellen wurde anfangs ein Mix aus 40 % DMEM/50 % FCS (ES-Zell getestet) und 10 % des Kryokonservierungsmittels Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet. Später wurde aufgrund einer höheren Effizienz beim Auftauen ein Mix aus 90 % FCS (bei ES-Zellen speziell getestet) und 10 % DMSO bei allen Zelllinien verwendet.

PBS (phosphatgepufferte Saline)

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

Pelletieren von Zellen

In der Regel werden alle Zelltypen 5 min bei 1300 rpm und 4 °C in einer Megafuge Zentrifuge (Heraeus, Osterode) pelletiert.

2.6.2 Gewinnung und Testen von LIF (Leucemia Inhibitory Factor) als ES-Zellmedienzusatz

Die EMFI-Zellschicht, welche immer bei der Kultivierung von ES-Zellen als Grundlage dient, produziert LIF, das die Ausdifferenzierung der ES-Zellen verhindert (Williams et al. 1988). Zusätzlich zu dem endogen produzierten LIF wird dem ES-Zellmedium LIF zugegeben. LIF als ES-Zellmedienzusatz wurde aus einer CHO (chinese hamster ovary)-Zelllinie, die mit einem Expressionsvektor für das LIF-Gen stabil transfiziert worden war, gewonnen (CHO-LIF). CHO-Zellen wachsen ähnlich wie EMFIs adherent und werden bis zur Konfluenz kultiviert, um den Überstand mit dem produzierten LIF als ES-Zellmedienzusatz zu verwenden.

CHO-LIF Zellen werden in Alpha-Medium aufgetaut und bis zur Konfluenz auf einer 175 cm² Zellkulturflasche kultiviert. Dann wird eine dieser Zellkulturflaschen auf drei 175 cm² Flächen aufgeteilt (mit Trypsin/EDTA). In diesem Stadium werden die CHO-Zellen drei Tage bis zur abermaligen Konfluenz mit EMFI-Medium kultiviert. Der Überstand wird nun abgenommen, steril filtriert und aliquotiert weggefroren. Die verschiedenen Aliquots werden nun mit auf 0,5 %iger Gelatine ausgesähten ES-Zellen auf ihre Differenzierungshemmung hin getestet. Jeweils die gleiche Zahl von ES-Zellen werden so auf 24-well Zellkulturplatten verteilt und ES-Zellmedium mit CHO-LIF Überstand in einer Verdünnung von 1:50 bis 1:400 versetzt. Nun werden die Zellen über einen Zeitraum von fünf Tagen auf ihre Proliferationsverhalten und Phänotyp hin beurteilt.

Die optimale Verdünnung für die meisten CHO-LIF Überstände lag bei 1:100 oder 1:200, in diesen Mengen wurden diese Überstände dann auch dem ES-Zellkulturmedium zugesetzt. Später wurde LIF kommerziell von ESGRO, Chemicon erworben und pro 500 ml ES-Zellmediensflasche 5×10^5 Units eingesetzt.

			<u>Endkonz.</u>
<i>Alpha-Medium(500 ml)</i>	MEM-alpha medium	500 ml	
	(Gibco/Invitrogen)		
	dialysiertes FCS	50 ml	10 %
	(Entfernung v. Thymidin)		
	L-Glutamin	5 ml	1 mM
	Pen/Strep	5 ml	1 ×
	Methotrexat	50 µl	0,1 µM

2.6.3 Testen von neuen FCS-Chargen

Genauso wie neue CHO-Lif Überstände mußte auch die Qualität neuer FCS-Chargen in der ES-Zellkultur getestet werden. Hierzu werden ES-Zellen auch auf 24-well Zellkulturplatten ausgesät, diesmal allerdings auf inaktivierten EMFIs. Es werden jeweils mehrere Reihen für das entsprechende FCS ca. vier Tage auf Proliferation und Morphologie hin beurteilt. Hierbei wird vorallem auf ausdifferenzierte ES-Zellen (Bildung von Keimschichten und embryonalen Strukturen) geachtet, die ausgezählt werden und zwischen den verschiedenen FCS-Sorten verglichen werden. So kann ein Vergleich zu dem bisher verwendeten FCS gezogen werden. Anfangs wurde ein ES-Zell getestetes FCS von PAN, später von Gibco/Invitrogen verwendet.

2.6.4 Herkunft, Gewinnung und Kultivierung von embryonalen Stammzellen

Die für ein „Gene targeting“ verwendeten embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) werden aus der inneren Zellmasse von Blastozysten gewonnen. Die mechanisch isolierten ES-Zellen werden in der Regel auf einer Nährzellschicht („Feeder layer“ bestehend aus embryonalen Fibroblasten) kultiviert. Die embryonalen Fibroblasten (EMFIS), welche unter anderem den „Leucemia inhibitory factor“ (LIF) produzieren, dienen dazu die Pluripotenz der ES-Zellen zu konservieren (wobei das wichtigste Merkmal hierbei die Fähigkeit ist Keimbahntransmission herbeizuführen). Es ist empirisch erwiesen, daß LIF die originale Potenz der ES-Zellen aufrecht erhält (Williams et al. 1988; Pease et al. 1990).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde mit bereits etablierten ES-Zelllinien gearbeitet: C57BL/6-III (Ledermann and Bürki 1991), BALB/c-I (BALB/c) (Noben-Trauth et al. 1996) und E14Tg2a (129/ola) (Kuehn et al. 1987).

2.6.5 Isolation von primären embryonalen Fibroblasten (EMFIS)

In der vorliegenden Arbeit wurden ES-Zellen immer mit Vektoren transfiziert, die ein Neomycinresistenzgen tragen. Damit diese Zellen mit Geneticin (G418) selektioniert werden können, sollte die EMFI-Nährschicht auch G418-Resistenz besitzen. Daher wurden die EMFIS aus Mäusen isoliert, die schon ein Neomycinresistenzgen im Genom integriert hatten.

Hierzu wurden verschiedene knockout Mäuse verwendet. Embryonen trächtiger, neomycinresistenter Weibchen werden am Tag 13,5 isoliert. Der Kopf und die embryonale Leber werden entfernt und die Embryonen zweimal in PBS gewaschen. Daraufhin werden die Embryonen durch eine 18-gauge Kanüle in ein 50 ml Röhrchen homogenisiert. Nun wird das Gemisch 30 min in einem 37 °C Wasserbad trypsiniert (Trypsin/EDTA, Gibco/Invitrogen).

Nach Zugabe und Mischen von $1 \times$ Volumen PBS (ohne CaCl_2 und MgCl_2) und kurzem Setzen der großen Aggregate wird der Überstand abgenommen und 5 min bei 1300 rpm zentrifugiert. Das Trypsin wird dann mit „Dulbecco's Modified Eagle Medium“ (DMEM, Gibco/Invitrogen) inaktiviert. Die so gewonnenen EMFIS werden auf einer 175 cm^2 Zellkulturflasche ausplattiert. Nachdem sie konfluent gewachsen sind werden sie in ca. 5 Aliquots je 175 cm^2 Zellkulturflasche aufgenommen und in flüssigem Stickstoff konserviert (freezing mix: 90 % FCS/10 % DMSO). Diese Prozedur kann bis zu fünfmal mit den restlichen Gewebestücken wiederholt werden.

2.6.6 Verwendung und Behandlung von EMFIS

Ein Aliquot eingefrorener EMFIS wird in DMEM (für EMFIS) in einer 175 cm^2 Zellkulturflasche aufgetaut. Sind die Zellen adherent und konfluent werden sie trypsiniert und auf drei 175 cm^2 Flächen weiterexpandiert. Dieser Vorgang kann je nach Qualität der EMFIS bis zu sechsmal wiederholt werden, da sich dann die EMFIs nicht mehr teilen. Bevor ES-Zellen auf einer „feeder layer“ ausplattiert werden, inaktiviert man diese durch das Zytostatikum Mitomycin C von SIGMA ($10 \mu\text{g/ml}$ mind. 1 h Behandlung/dann mind. dreimaliges Waschen mit PBS). Das Zytostatikum verhindert die weitere Zellteilung der EMFIs und somit ein Loslösen der Nährschicht vom Boden der Zellkulturflasche. Auch jetzt noch kann die EMFI-Schicht beliebig auf andere Flächen aufgeteilt werden.

2.6.7 Propagieren von EMFIS und ES-Zellen

Wenn EMFIS konfluent, bzw. ES-Zellkolonien dicht und groß genug gewachsen sind werden sie durch Trypsinieren passagiert. Hierzu wird die entsprechende Fläche zweimal mit PBS gewaschen und dann mit Trypsin/EDTA bedeckt (z.B. 80 cm^2 mit 3,5 ml, bzw. 175 cm^2 mit 5 ml). So werden die Zellen max. 5 min in einem Brutschrank ($37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 10 % CO_2) inkubiert, um dann sorgsam mit einer Plastikpipette vereinzelt zu werden. Dann wird das Trypsin durch Zugabe des entsprechenden Mediums inaktiviert. EMFIs werden in der Regel auf die dreifach größere Fläche verteilt. Bei ES-Zellen kommt es auf die Dichte und Größe der Zellkolonien an, eventuell werden sie sogar nur auf eine nächstgrößere Kulturflasche propagiert (zB. von 80 cm^2 auf 175 cm^2).

2.6.8 Transfektion von ES-Zellen

Um embryonale Stammzellen genetisch zu manipulieren benötigt man einen „Targeting Vektor“ und eine ES-Zelllinie der eigenen Wahl (in dieser Arbeit C57BL/6-III, BALB/c-I und E14Tg2a (129/ola)), die Keimbahntransmission ermöglicht.

Zuerst werden ES-Zellen in ES-Zellmedium auf einer durch Mitomycin C inaktivierten EMFI-Nährschicht aufgetaut und solange kultiviert bis mind. 5×10^6 Zellen vorhanden sind (entspricht einer 80 cm^2 Zellkulturflasche). Nun wird der

„Targeting Vektor“ linearisiert, gefällt und steril in H₂O aufgenommen (die Konzentration sollte bei ca. 1 µg/µl liegen). Zuerst wird die linearisierte Vektor-DNA (15-40 µg) ca. 15 min bei 65 °C inkubiert, um eventuell vorhandene Bakterienverunreinigungen zu beseitigen. Nun werden die ES-Zellen der Wahl trypsiniert und einmal mit PBS (ohne CaCl₂ und MgCl₂) gewaschen und dann abzentrifugiert. Jetzt werden die ES-Zellen in 0,8 ml reinem DMEM-Medium aufgenommen und in eine sterile Elektroporationsküvette (0,4 cm Elektrodenabstand) gegeben und 5 min bei RT stehengelassen. Dann wird die sterile DNA hinzuaddiert und der Ansatz abermals 5 min inkubiert, um nun elektroporiert zu werden. Hierzu wurde ein Bio-Rad-Elektroporationsgerät auf 250 V, 500 µF und ∞ Ω eingestellt. Nach einer 5 minütigen Ruhephase werden die ES-Zellen in 20 ml ES-Zellmedium aufgenommen. Die ES-Zellen werden schließlich mit einer Dichte von $2-4 \times 10^4$ pro Zellkulturpetrischale (mit EMFI-Nährschicht) ausplattiert.

2.6.9 Selektion und Kultivierung resistenter ES-Zellklone

Alle verwendeten „Targeting Vektoren“ besaßen ein Neomycin-Phosphotransferasegen (mit einem Tk-Promoter), das die ES-Zellen nach Integration des Vektors G418 (Geneticin, Gibco/Invitrogen) resistent macht. Die mit dem Vektor elektroporierten ES-Zellen werden auf Zellkulturpetrischalen (Ø 10 cm), die mit einer inaktivierten EMFI-Nährschicht bedeckt sind, verteilt, so daß nicht mehr als 5×10^5 ES-Zellen auf eine Zellkulturschale entfallen. Die ES-Zellen werden, nach einer 24 stündigen Erholungsphase mit ES-Zellmedium, nun je nach Klonegröße (optisch gut sichtbare dichte, weiße ES-Zellkolonien) 10-14 Tage mit 0,4 mg/ml G418 kultiviert. Jetzt werden, je nach erwarteter Effizienz des Experiments (eine korrekte homologe Integration in das Genom in ca. 50 selektionierten Klonen), bis zu 1000 ES-Zellkolonien mit einer Mikropipette (25 µl Einstellung) unter einem Mikroskop in 96-well Platten mit 50 µl/well vorgelegtem PBS (ohne CaCl₂/MgCl₂) pipettiert.

Hierbei wird ein spezielles Pipettierschema eingehalten, welches es ermöglicht die gepickten ES-Zellklone direkt mit einer Multichannelpipette von den 96-well Platten auf die 48-well Zellkulturplatten zu transferieren. In den 96-well Platten werden die einzelnen Klone mit je 50 µl Trypsin/EDTA vereinzelt und 100 µl PBS hinzugegeben und die eine Hälfte der ES-Zellen auf 48-well Zellkulturschalen mit inaktivierten EMFIS (mit ES-Medium) pipettiert, die andere Hälfte für eine PCR-Analyse abzentrifugiert und der Überstand abgeschüttet.

Indem die restlichen ES-Zellen für die PCR-Analyse mit 25 µl H₂O ca. 15 min bei 80 °C inkubiert werden, lysiert man diese. Nun werden die Zellen ü.N. bei 57 °C mit Proteinase K (0,2 µg/µl) verdaut, um dann die Lysate direkt für die PCR einzusetzen (oder eventuell wegzufrieren). Um unnötige Einfrierschritte zu vermeiden, werden die ES-Zellklone auf den 48-well Zellkulturflächen während der PCR-Analyse unter täglichem Medienwechsel (ES-Zellmedium mit G418) weiterkultiviert. Die schon verwendeten Zellkulturpetrischalen werden nach einem Medienwechsel am nächsten Tag abermals nach ES-Zellklonen abgesucht und eventuell gute Kolonien „nachgepickt“.

Die PCR-positiven Klone werden dann weiterpropagiert auf 24-well-, 12-well-, 6-well-Platten und schließlich 40 cm²-Zellkulturflaschen. Ab dem 12-well-Stadium wird immer ein Teil der ES-Zellen abgenommen und kryokonserviert.

2.6.10 Cre-Transfektion von homolog rekombinierten ES-Zellklonen

Ein weggefrorenes Kryotube ES-Zellen eines homolog rekombinierten Klones wird auf eine 40 cm² Zellkulturflasche in G418-ES-Zellmedium aufgetaut. Sind die Zellen konfluent gewachsen werden sie trypsiniert und gezählt. Pro Elektroporation mit 5 µg Cre-Expressionsplasmid (pMC-Cre; Gu et al. 1993) werden 2×10^6 ES-Zellen eingesetzt. In einer 0,4 cm Bioradelektroporationsküvette werden das Plasmid und die Zellen gemischt und 10 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Nun werden die ES-Zellen nach dem Standardprotokoll (250 V, 500 µF und $\infty \Omega$) für ES-Zellen mit einem Biorad-Elektroporationsgerät transient transfiziert (das Plasmid wird hierbei, anders als bei Gene Targeting Experimenten, nicht linearisiert, um eine stabile Integration zu vermeiden). Die 2×10^6 eingesetzten ES-Zellen werden nach der Elektroporation auf eine mit EMFIs bewachsenen Zellkulturschale (Ø10 cm) ausgesät. Das Medium, nunmehr ES-Zellmedium ohne G418, wird spätestens alle 24 h gewechselt. Sind die Zellkulturschalen konfluent mit ES-Zellklonen bewachsen (je nach ES-Zelllinie ca. 1,5-2 d), werden sie wieder gesplittet. Diesesmal wird je $\frac{1}{4}$ einer Kulturschale auf zwei neue mit EMFIs bewachsenen Zellkulturschalen (Ø10 cm) verteilt, da mehr ES-Zellen einen Zellrasen ergeben würden, aus dem keine einzelnen Kolonien mehr isoliert werden könnten.

Hier nun spielt das Herpes Simplex Thymidinkinasegen (Tk) der Selektionskassette die entscheidende Rolle. Durch die Cre (causes recombination)-Rekombinase wird die von zwei gleichgerichteten loxP (locus of X-over P) Sequenzen flankierte Selektionskassette herausrekombiniert. Wird dem ES-Zellmedium nun das Thymidinanlogon Ganciclovir (Ganc, 2 µM; Sigma) hinzugegeben wird dieses, wenn das HSV-TK Gen vorhanden ist, von der Herpes Simplex Thymidinkinase phosphoryliert und metabolisch in die DNA integriert. Die HSV-Thymidinkinase hat eine wesentlich höhere Affinität für Thymidinanaloge als die zelleigene Thymidinkinase. Das in die DNA integrierte Thymidinanalogon hat zur Folge, daß die DNA-Synthese abbricht und somit der Zelltod eintritt, wenn ES-Zellklone die Selektionskassette noch beinhalten. Der kritische Punkt bei der Ganciclovir Selektion ist, daß selbst nach erfolgreicher Entfernung der Selektionskassette noch HSV-Thymidinkinaseenzym in den ES-Zellen vorhanden sein kann. Aus diesem Grund werden die ES-Zellen nach Cre-Transfektion nochmal gesplittet. In diesem Stadium sollte überschüssiges Thymidinkinaseenzym verloren gehen. Sind die ES-Zellklone nun wieder groß genug geworden, wird die Ganciclovir Selektion gestoppt (nach 4-5 d) und 1 d mit ES-Zellmedium weiterkultiviert. Somit können sich die ES-Zellkolonien regenerieren und es werden nun pro transfiziertem ES-Zellklon ca. 50 einzelne Kolonien durch „Picken“ isoliert. Technisch geschieht dies wie die Isolation von homolog rekombinierten ES-Zellklonen nach Elektroporation mit dem Targetvektor. Mit einer PCR, die über den Bereich der Selektionskassette hinweg amplifiziert, wurde dann in dieser Arbeit auf eine erfolgreiche Entfernung der Selektionskassette gescreent.

2.6.11 Vorbereitung von ES-Zellklonen für das Injizieren in Blastozysten

ES-Zellklone, bei denen eine korrekte homologe Rekombination verifiziert werden konnte, werden auf eine 40 cm² Zellkulturflasche, deren Boden mit einer EMFI-Nährschicht bedeckt ist, aufgetaut. Nachdem sie dichte, weiße Kolonien gebildet haben, werden sie wie beschrieben trypsinisiert, gut vereinzelt und auf eine „6-well“ Zellkulturfläche, die mit 0,5 %iger Gelatine bedeckt ist, ausgesäht. Hierbei wird je die Hälfte, 1/4-tel und 1/8-tel der ES-Zellen auf ein well verteilt. Durch diesen Schritt soll die Hauptmasse der EMFIS von den ES-Zellen abgetrennt werden, indem die Zellkulturschalen nun mind. 30 min im Brutschrank inkubiert werden, um dann den Überstand abzunehmen und abzuzentrifugieren. Zusätzlich werden die 6-well-Flächen mit PBS (ohne CaCl₂ und MgCl₂) gespült und dieser Überstand abgenommen und abzentrifugiert. Diese verschiedenen Zellpräparationen werden nun in max. 1 ml Injektionsmedium aufgenommen und können direkt zur Injektion verwendet werden. Die abermaligen ES-Zellpräparationen durch Spülen mit PBS erwiesen sich als praktisch wertvoll, da diese Medienlösung weniger Viskosität aufwies und somit leichter durch die Injektionskanüle floß.

2.6.12 Blastozystengewinnung aus trächtigen Mäusen, Mikroinjektion von ES-Zellen und Reimplantation

Für das Injizieren von C57BL/6-III ES-Zellen (aus Mäusen mit schwarzer Fellfarbe) wurden Blastozysten von BALB/c Mäusen (weiße Fellfarbe) und für E14Tg2a ES-Zellen (aus Mäusen mit agouti Fellfarbe) Blastocysten von C57BL/6-III Mäusen verwendet. Somit war es möglich bei der F1 Generation sofort den Grad des Chimarismus anhand der Fellfarbe zu erkennen.

Es werden hierfür abends BALB/c oder C57BL/6-III Tiere verpaart, um am nächsten Tag die Weibchen zu trennen, welche einen Vaginalpfropf haben. Von diesen Tieren wird am Tag 3,5 der Uterus isoliert und die abgetrennten Uterushörner mit M2-Medium ausgespült. Die so gewonnenen Blastozysten werden mit einer Mundpipette in M16 überführt und mit Parafinöl beschichtet. Diese Zellkulturschale wird in einem Brutschrank bis zur Mikroinjektion der ES-Zellen aufbewahrt. Hierdurch wird die Injektion in der Regel sogar vereinfacht, da sich das Blastocoel dadurch klarer bildet. Die ES-Zellen werden mit Hilfe eines Mikroinjektionsmanipulators durch eine Halte- und eine Injektionsnadel in die Blastocyste injiziert (wenn möglich bis zu 20 Zellen/Blastocyste), und diese dann in die Uterushörner eines scheinträchtigen CD1 Weibchens transferiert (bis zu 20 Blastocysten pro Uterus).

2.7 Immunologische und proteinbiochemische Methoden

2.7.1 ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay)

Zum Nachweis von Immunglobulinen bestimmten Isotypes und Spezifität wurde die ELISA-Technik verwendet. Zuerst werden die Wells von Poly- oder Maxisorb-Elisaplatten (Nunc) über Nacht (4 °C) mit goat- α -mouse Immunglobulin Isotypen (1-2 $\mu\text{g/ml}$ PBS; 50 μl pro well) beschichtet. Im Prinzip können alle Inkubationsschritte entweder bei 4° C über Nacht oder bei 37 °C, 2h in einer feuchten Kammer durchgeführt werden. Dann werden die freien Bindungsstellen der beschichteten Plattenoberfläche geblockt, indem 200 μl 1 % BSA, 0,1 % Azid in PBS hinzugegeben wird und die Elisaplatten wieder 2h oder ü.N. inkubiert werden. Danach werden die Elisaplatten, in dieser Arbeit mit einem Columbus Elisa Washer von Tecan (Crailsheim), dreimal mit PBS gewaschen, um überschüssiges BSA und Immunglobuline zu entfernen. Nun werden die zu untersuchenden Seren in Verdünnungsreagenz (0,1 % BSA, 0,05 % Azid in PBS) auf unbeschichteten 96-well Platten 1:3 seriell vorverdünnt. Hierbei empfiehlt sich bei Immunglobulinlevelmessungen eine Anfangsverdünnung von 1:200 und bei einem spezifischen AK-Nachweis eine Anfangsverdünnung von 1:20. Bei ersterem Messverfahren werden Immunglobulinstandards mit einer Anfangsverdünnung von 1 $\mu\text{g/ml}$, bei zweiterer Messung wird ein Pool von Seren eingesetzt, bei denen eine ausreichende spezifische Immunantwort zu erwarten ist. Nach dem Transfer der Seren von den 96-well Platten auf die Elisaplatten folgt ein Inkubationsschritt von maximal 1,5 h bei 37 °C. Danach werden die Elisaplatten abermals dreimal mit PBS gewaschen. Nun werden die spezifischen goat- α -mouse Immunglobuline, die an Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt sind, in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ und einem Volumen von 50 μl pro well hinzugegeben. Nun werden die Elisaplatten 1 h bei 37 °C inkubiert, um dann abermals gewaschen zu werden. Jetzt wird das Substrat, das durch die Alkalische Phosphatase umgesetzt wird, hinzugegeben. Das Substrat ist p-Nitrophenylphosphat (1 mg/ml) in einem Diethanolaminpuffer (1 M Diethanolamin; 0,5 mM MgCl_2 pH 9,8). Die Messung der Absorption des Farbstoffes erfolgt bei 405 nm in einem ELISA-Reader Vmax und die Auswertung der Rohdaten mit der Software Softmax Pro 3.0.

2.7.2 ELISPOT-assay

Mit dem ELISPOT-assay ist es möglich die Antikörperabgabe einzelner Zellen zu messen. Wie bei einem ELISA werden hier die AK durch eine Farbreaktion, mittels Alkalischer Phosphatase initiiert, sichtbar gemacht. Die sezernierten AK werden dabei bei der Zugabe des umzusetzenden Substrats durch „low melting agarose“ fixiert.

Die zu analysierende Zellsuspension wird hierbei wie üblich aufgereinigt. Im ersten Schritt des ELISPOTs werden speziell beschichtete 25 well Platten (Nunc) mit einem spezifischen ungelabelten AK (1 µg/ml PBS), oder einem spezifischen Antigen ge-coated (beschichtet). Das Volumen pro well beträgt 1ml. Die ELISPOT-Platten werden dann in einer Feuchtkammer ü.N. bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag werden die nicht besetzten Flächen der wells durch Zugabe von 5 %igem FCS besetzt. Jetzt wird 1 h bei RT in einer Feuchtkammer inkubiert. Nun werden die ELISPOT-Platten unter Hochdruck mit PBS gewaschen. Danach ist darauf zu achten, daß die Platten sehr gut trockengeklopft werden.

Die zu analysierenden Zellpopulationen, wie üblich vorbereitet und sehr gut gewaschen, werden nun vorverdünnt und 1×10^6 Zellen (in RPMI⁺ oder BSS/BSA) auf die trockenen wells gegeben. Die verschiedenen Anfangsverdünnungen werden nun dreimal 1:10 runterverdünnt. Die ELISPOT-Platten werden nun ü.N. in einem Brutschrank bei 37 °C und unter 5 % CO₂ inkubiert. Bei diesem Schritt ist es extrem wichtig, daß die Platten keinerlei Erschütterung ausgesetzt werden, damit es zu keiner Verzerrung bei der folgenden Farbreaktion kommt. Nun werden die Platten abermals gewaschen und trockengeklopft. Jetzt werden die Alkalische Phosphatase (AP) gelabelten Immunglobuline der Wahl auf die wells gegeben (1 µg/ml; 1ml/well). Die Platten werden dann 3 h bei RT in einer Feuchtkammer inkubiert. Die Platten werden danach wieder gewaschen und getrocknet. Währenddessen wird die Substratlösung (AMP-BCIP) auf 37 °C erwärmt und gleichzeitig 3 %ige „low melting agarose“ aufgekocht und auf 42 °C abgekühlt. Nun wird die Agarose 1:5 mit der AMP-BCIP-Lösung gut gemischt und 1 ml pro well hinzugegeben. Ist die Agarose auspolymerisiert können die Zellen, welche AK sezerniert haben, durch einen blauen Farbumschlag mit dem bloßen Auge oder mit einem Binokular ausgezählt werden.

<i>Substratlösung:</i>	95,8 ml	AMP (2-Amino-2-Methyl-1-Propanol)
(AMP-Lsg.)	150 mg	MgCl ₂ × 6H ₂ O
	100 µl	Triton X100
	pH mit HCl auf 10,25 ad 1l	

AMP-BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat Dinatriumsalz)
BCIP 1 mg/ml AMP-Lösung

2.7.3 Durchflußcytometrie/FACS (engl. fluorescence activated cell sorting)

Die Durchflußcytometrie ist eine Methode die sich bekannte Zelloberflächenmarker zu Nutze macht, indem Zellen nach der Reaktion mit einem nach Möglichkeit monoklonalen AK, der wiederum mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, in Zellpopulationen eingeteilt werden können. Die gefärbten Zellen werden an der Lasereinheit eines FACS-Gerätes vorbeigeleitet, um dann die Lichtstreuung (Größe und Granularität der Zellen) und das vom jeweilig verwendeten Fluoreszenzfarbstoff emittierte Licht in einer Messeinheit zu detektieren.

Für eine einzelne Anfärbung werden 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen aus einem bestimmten Zellpool (zB. Organ oder eine Zellsuspension) in einem speziellen FACS-Tube abzentrifugiert und der Überstand gut abgesaugt. Jeder Färbeschritt mit einem fluorchrommarkierten Antikörper wird auf Eis, in Dunkelheit, mind. 25 min und einem Volumen von 25 μ l FACS-Puffer durchgeführt. Nach jedem Schritt werden die Zellen mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen und wieder abzentrifugiert. Nach dem letzten Färbeschritt werden die Zellen in 300-600 μ l FACS-Puffer aufgenommen und können nun analysiert werden.

In dieser Arbeit verwendete Fluorochrome waren Phycoerythrin (PE), Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Cychrome (Cy). Es wurden auch biotinylierte AK verwendet, die dann in einem sekundären Schritt mit fluorchromgekoppeltem Streptavidin gefärbt wurden. Die Analyse der Zellen erfolgte in einem FACScan oder FACScalibur beide von Becton Dickinson vertrieben. Von dieser Firma wurde auch die Auswertungssoftware CellQuest bezogen.

2.8 Präparation von Organen, Seren und Immunisierungen

2.8.1 Präparation von Milzzellen

Für die Präparation wird steriles Präparationsbesteck verwendet. Die Mäuse werden durch CO₂ oder Genickbruch getötet. Die Milz wird auf der linken peritonealen Seite der Maus, nach Reinigung des Fells mit Ethanol, mit einem Schnitt herauspräpariert und je nach Verwendung in PBS oder Zellmedium gelagert (RPMI⁺, BSS/BSA). Nach dem Entfernen von überschüssigem Binde- und Fettgewebe werden die Milzzellen durch ein Falcon Cell Strainer in einer Zellkulturschale vereinzelt. Nach Aufnahme in 5 ml entsprechendem Medium werden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Dann wird eine Gey's Lyse durchgeführt (Lyse der Erythrozyten). Hierzu werden die Zellen 5 min auf Eis mit 5 ml Gey's Lösung versetzt. Das danach weiße Pellet wird einmal gewaschen und erneut abzentrifugiert, um dann in 10 ml des entsprechenden Mediums aufgenommen zu werden. Jetzt werden die lebenden Zellen anhand einer Trypanblau Färbung und einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Gey's solution (500 ml): 350 ml H₂O + 100 ml A + 25 ml B + 25 ml C

A: 35g NH₄Cl; 1,85g KCl; 1,5g Na₂HPO₄x 2 H₂O; 0,12g KH₂PO₄; 5,0g Glucose (5,5g Glucose Monohydr). ad 1l, sterilfiltrieren

B: 0,42g MgCl₂x 6 H₂O; 0,14g MgSO₄ x 7 H₂O; 0,34g CaCl₂ (0,45g CaCl₂ x H₂O) ad, 100ml; autoklavieren

C: 2,25g NaHCO₃ ad 100ml, sterilfiltrieren

2.8.2 Präparation von Knochenmarkzellen

Nach dem Töten der Tiere werden die Femuren mit einem sterilen Präparationsbesteck abgetrennt. Es ist hierbei darauf zu achten, daß keine Blutgefäße verletzt werden. Femurkondylen und Hüftkopf werden abgetrennt und der Knochen mit einer 1 ml Spritze durchgespült. Die Zellen werden wie bei der Milz beschrieben einer Gey's Lyse unterzogen.

2.8.3 Präparation von peritonealen Zellen

Der getöteten Maus werden mit einer 5 ml Spritze vorsichtig ca. 5 ml Medium in das Peritoneum gespritzt. Nun wird der Bauchraum einer sanften Massage unterzogen, um die Zellen von der Innenwandung zu lösen. Durch dasselbe Einstichloch werden nun vorsichtig wieder 5 ml Medium in die Spritze aufgezogen. So werden beide Bauchraumseiten behandelt, die Zellen abzentrifugiert und in 5 ml Medium aufgenommen.

2.8.4 Immunisierungsprotokoll und Präparation von Seren

Die Tiere der Wahl werden entweder mit TNP₁₈-Ficoll (selbst gekoppelt), oder mit TNP₁₃-Ovalbumin (selbst gekoppelt) intraperitoneal injiziert immunisiert. Das injizierte Volumen beträgt dabei jeweils 100 µl, wobei 10 µg oder 100 µg TNP₁₈-Ficoll und 100 µg TNP₁₃-Ovalbumin eingesetzt werden. Ovalbumin Antigene werden zuvor 1h bei Dunkelheit mit Alu-Gel-S (Serva) vorinkubiert, dies soll die langsame Abgabe des Antigens gewährleisten. Hierzu wird das benötigte Volumen TNP-Ovalbumin mit dem jeweils zweifachen Volumen PBS und Alu-Gel-S versetzt, dieses dann inkubiert und schließlich einmal mit PBS gewaschen und dann abermals abzentrifugiert. Die Tiere werden je nach Versuchsansatz an Tag 0 immunisiert und an Tag 7, oder wahlweise Tag 14 abermals immunisiert (geboostet). Je nach Ansatz werden die Tiere an Tag 0, 7, 14 und eventuell 21 durch Anritzen der Schwanzvene geblutet. Hierbei genügen wenige große Tropfen Blut, um Seren zu gewinnen. Das Blut wird in einem Eppendorfreaktionsgefäß entweder 1 h bei 37 °C, oder ü.N. bei 4 °C inkubiert. Die festen Blutbestandteile werden 5 min bei 1300 rpm abzentrifugiert und die Seren in neue Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Diese Seren können dann direkt für Plattenelisas verwendet werden.

In der Regel werden die Seren beim Messen von totalen Immunglobulinleveln mit einer Anfangsverdünnung von 1:200 und beim Messen einer spezifischen Immunantwort mit einer Anfangsverdünnung von 1:20 eingesetzt.

3. Ergebnisse

3.1 Generierung einer CD22R130E Knock in Maus zur Deletion der CD22 Adhäsionsdomäne

Das Hauptprojekt zu Beginn dieser Doktorarbeit war mittels eines genetischen Ansatzes die Funktion der Adhäsionsdomäne von CD22 näher in vivo zu untersuchen. Zu diesem Zweck sollte mittels eines Targetvektors für Gene Targeting Experimente mit embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) eine Punktmutation in das CD22 Gen eingeführt werden, die das für die Sialinsäurebindung essentielle Arginin 130 gegen ein Glutamat 130 austauschen sollte (R130E Mutation). Embryonale Stammzellen sind ein optimales Vehikel für eine genetische Veränderung endogener Gene. Zum einen können sie in vitro manipuliert und kultiviert werden, zum anderen ist bekannt, daß sie unter optimalen Kulturbedingungen Pluripotenz besitzen, sich also zu wohl den meisten Körperzellen weiterentwickeln und zudem die Keimbahn durchlaufen können.

Die Einführung einer Punktmutation mittels Gene Targeting wird im Vergleich zu einem „klassischen“ knock out, bei dem ein ganzes Gen ausgeschaltet werden soll, „knock in“ genannt. Bei der Anwendung der „knock in“ Technik werden die verwendeten Selektionskassetten, im Gegensatz zur knock out Technik, in einer intronischen Sequenz des Gens der Wahl hintereinandergeschaltet, um später mittels der Verwendung des Cre (causes recombination) Rekombinase/loxP-Systems (aus dem Bakteriophagen P1) die gesamte Selektionskassette in vitro oder in vivo deletieren zu können (Sauer 1987; Sauer 1993; Sauer und Henderson 1988). Dieses System bedient sich der Eigenschaft der Cre-Rekombinase eine DNA-Sequenz zwischen zwei sogenannten LoxP (locus of X over P1) Erkennungssequenzen, die gleich orientiert sind, herauszurekombinieren. Dies funktioniert nicht nur bei Bakterien, sondern auch bei Eukaryonten. Das Ziel dieser Technik ist, daß schließlich neben der gewünschten Mutation nur eine der LoxP Sequenzen in einer intronischen Sequenz übrigbleibt.

Um die CD22R130E Mutation durch homologe Rekombination an die gewünschte genomische Position zu bringen wurde, ein Targetvektor konstruiert (von Christina Piperi aus dem Labor von Dr. Anton van der Merwe). Die Grundlage für diesen Vektor war genomische C57BL/6-III DNA, um den genetischen Hintergrund der bereits existierenden CD22 defizienten Maus (Nitschke et al. 1997), für spätere vergleichende Studien, beizubehalten. Aus diesem Grund wurden für die Gene Targeting Experimente auch C57BL/6-III ES-Zellen (Ledermann und Bürki 1991) verwendet, zu denen der Targetvektor dann isogene DNA besitzt. Der Targetvektor wird so konstruiert, daß die Selektionskassetten (das Neomycinphosphotransferasegen und das Herpes Simplex Thymidinkinasegen) von genügend genomischer DNA, den sogenannten Armen der homologen Rekombination, umgeben ist. Dies soll die folgende homologe Integration des Targetvektors in den genomischen Locus ermöglichen. Hierbei ist darauf zu achten, daß die eingeführte Mutation sich so nah wie möglich an der Selektionskassette befindet, um einem Verlust derselben bei der homologen Rekombination vorzubeugen.

Zur späteren Konfirmation von ES-Zellklonen mit korrekt integriertem Targetvektor wurde zudem ein Kontrollvektor kloniert, um mit ES-Zellklonen und Lysaten, die mit

diesem Vektor transfiziert wurden, eine Test-PCR zu etablieren. Dies wird dadurch ermöglicht, daß der Kontrollvektor in 3'-Richtung verlängert wurde. Es wurden dann Primerpaare entworfen, wobei die 5'-Primer im zukünftigen Targetkonstrukt liegen und die 3'-Primer im verlängerten Kontrollvektorbereich liegen.

Diese Basisvektoren wurden im Labor von Anton van der Merwe (University of Oxford) von Christina Piperi kloniert, später wurden sie auf verschiedene Art variiert. Ausgehend von der genomischen Organisation des Maus CD22-Gens und einem C57BL/6-III Hintergrundes wurden nun folgende Klonierungsschritte durchgeführt:

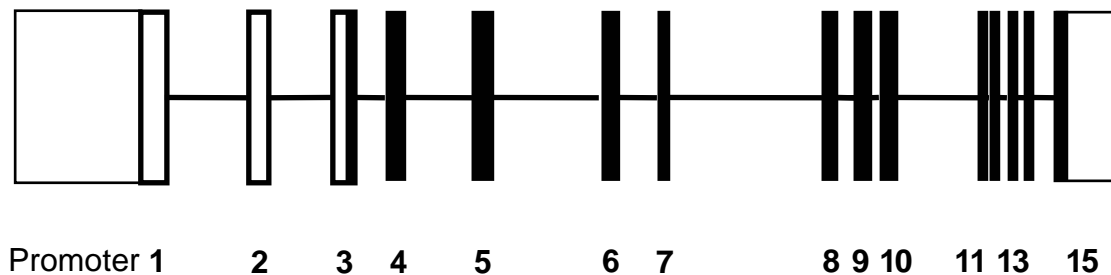
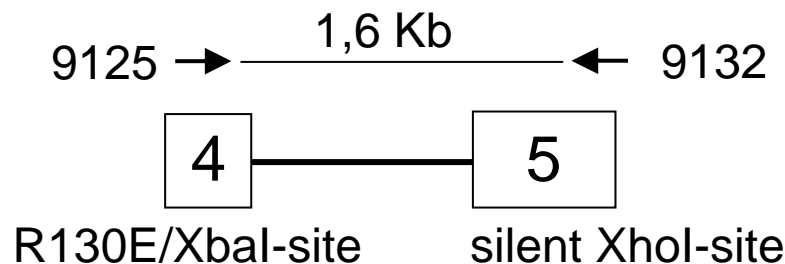


Abb. 8: Genomische Organisation des Maus CD22-Gens; Exons sind als Kästen, kodierende Bereiche als gefüllte Kästen gezeigt.



9125: 5'-TGGGTCTAGAGATGACCGCAGGGACTG-3'

9132: 5'-CTTTGCTCGAGTGCTGGACTTGGCACTTC-3'

Abb. 9: "Long distance PCR" von Exon 4 und 5, die auch die R130E Mutation einführt (ausgeführt von Christina Piperi; Oxford).

Dieses PCR-Fragment (wie alle folgenden auch) wurde in den Phagemid pBlue-scriptSKII kloniert und die korrekten Sequenzen der Exons und der „splice junctions“ durch Sequenzierung bestätigt.

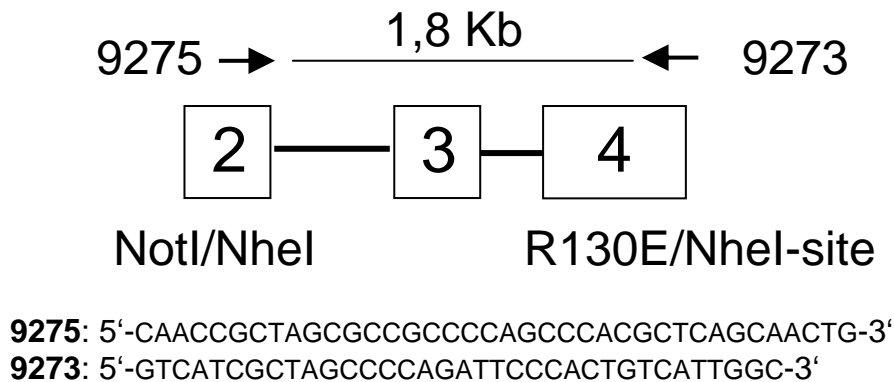


Abb. 10: „Long distance PCR“ zwischen Exon 2 und 4, die ein 1,8 Kb großes Fragment ergibt. Auch bei diesem Fragment wurden die „splice junctions“ sequenziert (ausgeführt von Christina Piperi; Oxford).

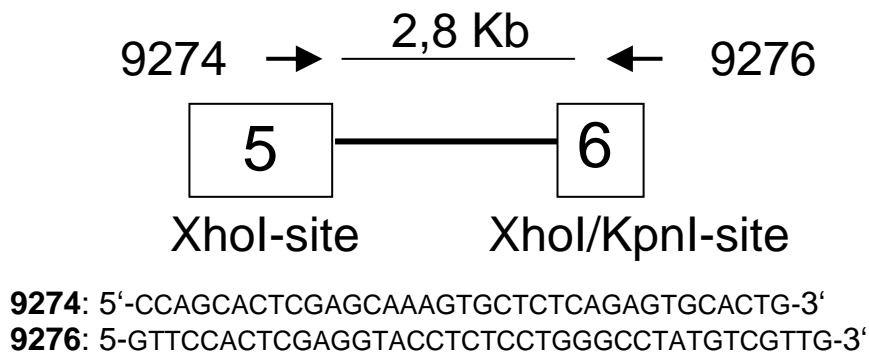


Abb.11: „Long distance PCR“ zwischen Exon 5 und 6, die ein 2,8 Kb großes Fragment ergibt, welches durch Sequenzierung überprüft wurde (ausgeführt von Christina Piperi; Oxford).

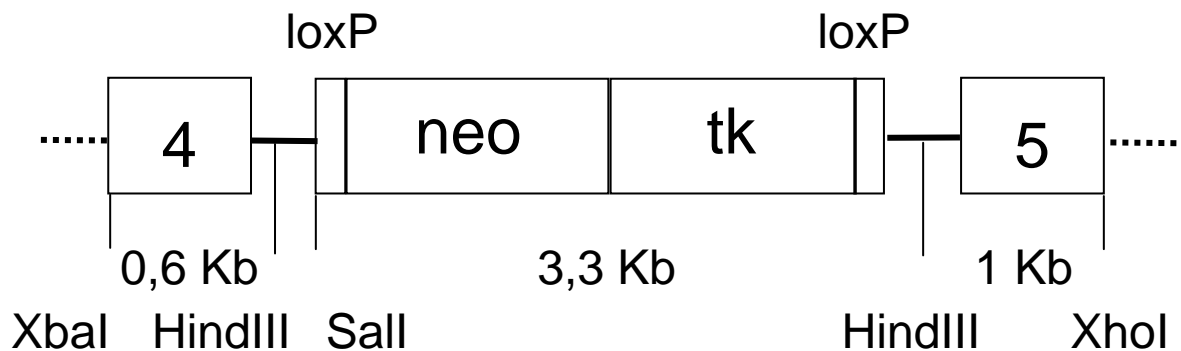


Abb. 12: Darstellung der Einführung einer Neo-/Tk-Selektionskassette zwischen Exon 4 und Exon 5 (ausgeführt von Christina Piperi; Oxford).

In das Plasmid Exon 4/5 wurde ein palindromischer „Linker“ über eine HindIII Schnittstelle eingeführt, der eine Sall Schnittstelle enthielt. Mit Hilfe dieser neuen unigenen Schnittstelle wurden das Neomycinphosphotransferasegen (Neo) und das Herpes Simplex Thymidinkinasegen (Tk) aus dem Vektor pBS112SX in dieses Plasmid eingebracht. Das Neo-Gen ist für die positive Selektion von ES-Zellen mit G418 vorgesehen, während das Tk-Gen für eine spätere negative Selektion, nach der Deletion der Selektionskassette, mit Ganciclovir dient. Alle Spleißstellen, die Neo/Tk-Sequenzen und die LoxP-Stellen wurden durch Sequenzierung verifiziert (ausgeführt von Christina Piperi; Oxford).

Targetvektor 1

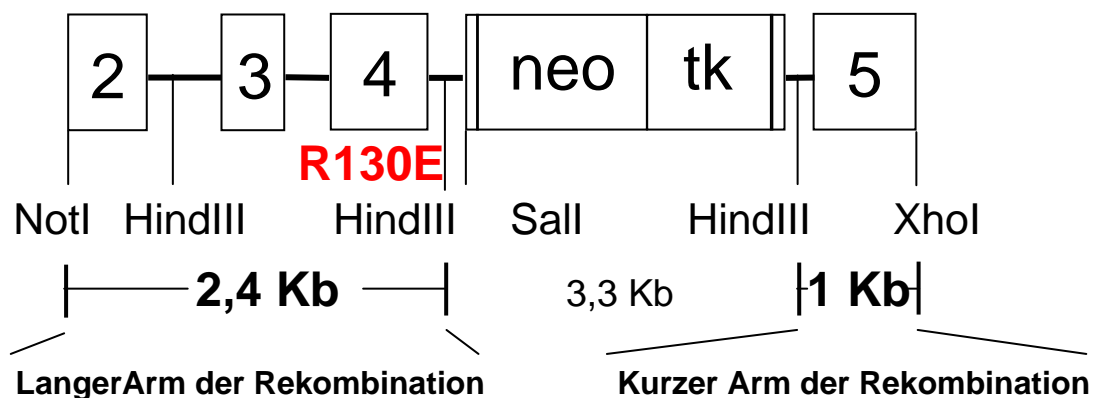


Abb. 13: Zusammenfügen der vorher gewonnenen Fragmente zum Targetvektor1 (ausgeführt von Christina Piperi; Oxford).

Nun wurden Exon 2 und 3 aus dem schon vorhandenen Plasmid zu dem als letzten klonierten Fragment hinzugefügt. Durch die Verwendung einer XbaI Schnittstelle in der R130E-Region und einer NheI Schnittstelle im Vektor, der Exon 2-4 enthielt, gelangt man zur mutierten Sequenz, hier im Vergleich zur wildtypischen Situation:

	G	L	R	(aa)
WT	GGG	TTG	AGG	A
R130E	GGG	CTA	GAG	A
	G	L	E	(aa)

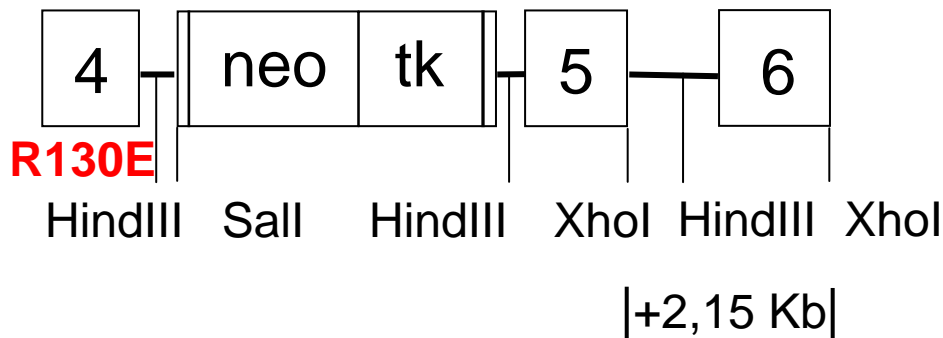
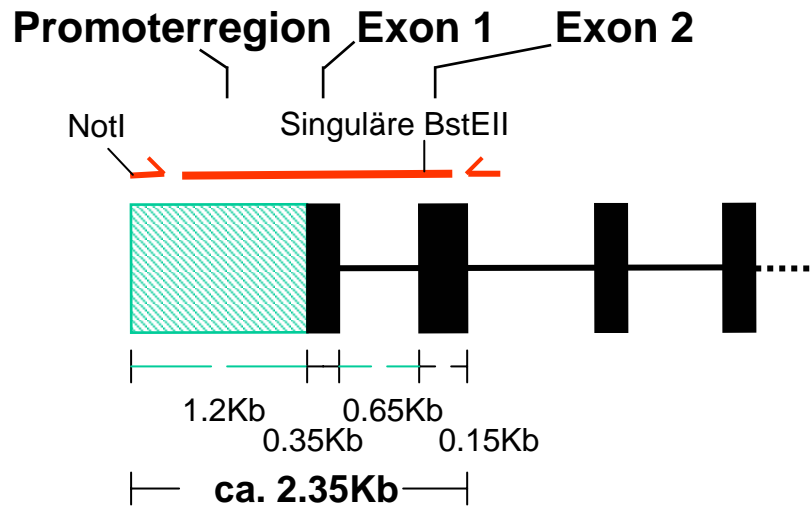
Kontrollvektor

Abb.14: Darstellung des aus den gewonnenen Fragmenten fertig klonierten Kontrollvektors, der um 2,15 Kb in 3'-Richtung länger ist als der Targetvektor (ausgeführt von Christina Piperi; Oxford).

Für den Kontrollvektor wurden Exon 4/5/Neo/Tk über die XhoI-Schnittstelle mit Exon 5/6 verbunden. Sowohl beim vorher klonierten Targetvektor, wie auch beim Kontrollvektor wurden die Spleißstellen, wie auch alle Exone auf ihre Korrektheit hin durchsequenziert. Somit ist der Kontrollvektor im Vergleich zum Targetvektor um 2,15 Kb in 3'-Richtung verlängert.

Im späteren Verlauf der Doktorarbeit wurde der lange Arm des Targetvektors zusätzlich in 5'-Richtung verlängert, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, eine korrekte homologe Integration des Konstruktes zu erzielen. Diese Überlegung resultierte aus der niedrigen Frequenz von homologen Integrationsereignissen in ersten Experimenten. Zu diesem Zweck wurde der Vektor in 5'-Richtung über Exon 2 bis 1,2 Kb in den CD22-Promoter verlängert. Somit erhielt man einen Bereich 5' der Selektionskassette, der nunmehr von 2,4 Kb auf 4,7 Kb angewachsen war. Als genomische Template-DNA wurde hier 129/ola DNA aus Milzzellen verwendet, um dieses Targetkonstrukt dann mit der E14Tg2a ES-Zelllinie (Mausstamm: 129/ola) zu verwenden.

Zu diesem Zweck wurde ein Restriktionsenzym benötigt, daß am besten in der Region um Exon 2 einmalig im Targetvektor schneidet. Zudem mußte ein sinnvoll langes Stück DNA aus der Promoterregion gewonnen werden. In Exon 2 liegt die einzige BstEII-Schnittstelle im Targetvektor, daher wurde ein 3'-Primer an der 3'-Spleißstelle von Exon 2 gewählt. Zudem wurde ein 5'-Primer im CD22 Promoterbereich gewählt, der ein genügend großes Fragment ohne repetitive Sequenzen mit dem entsprechenden 3'-Primer ergibt. Mit den beiden gewählten Primern CD22promoter5'NotI und CD22IVS2/3(5') wurde nun eine PCR durchgeführt und das isolierte DNA-Fragment in den Targetvektor kloniert (über NotI und BstEII).



5'-Primer: **CD22promoter5'NotI**:
 5'-CATAGCGGCCGCACACACTCTCACATGCC-3'

3'-Primer: **CD22IVS2/3(5')**:
 5'-CCATACCTTGACAGCATCCTCAC-3'

Abb. 15: Darstellung der PCR-Strategie zur Verlängerung des Targetvektors in 5'-Richtung in den CD22-Promoterbereich hinein. Dieses Fragment wurde von einem genomischen 129/ola DNA-Template (aus Milzzellen) gewonnen.

Der letztendlich verwendete Targetvektor für die Versuche mit der E14Tg2a ES-Zelllinie sah wie folgt aus:

Targetvektor 2

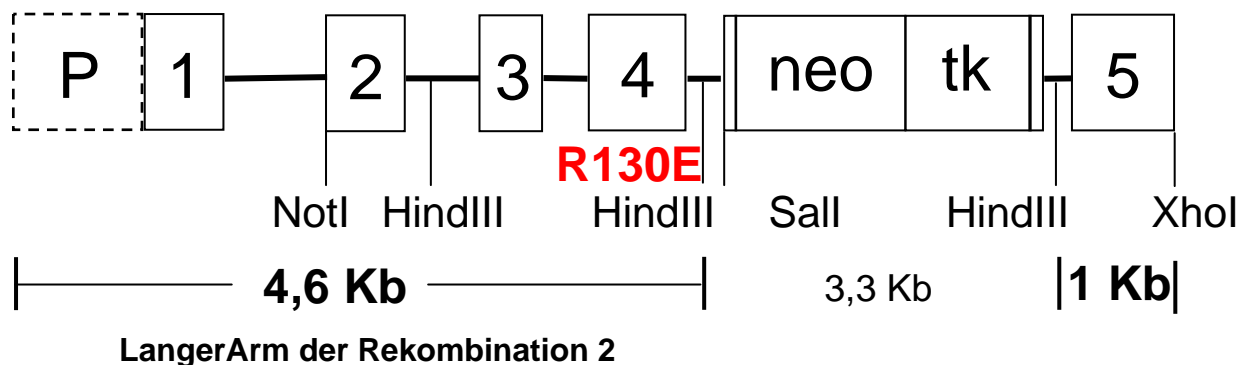


Abb. 16: In 5'-Richtung veränderter Targetvektor2, somit ist der lange Arm für die homologe Rekombination auf 4,7 Kb angewachsen. Dieses Konstrukt wurde wie oben beschrieben in den Phagemid pBluescriptSKII kloniert.

Mit dem fertig konstruierten Targetvektor wurden nun die Gene Targeting Experimente durchgeführt. Die Vorgänge, die hierbei theoretisch auf genomischer Ebene eines Allels ablaufen sollten, sind die folgenden:

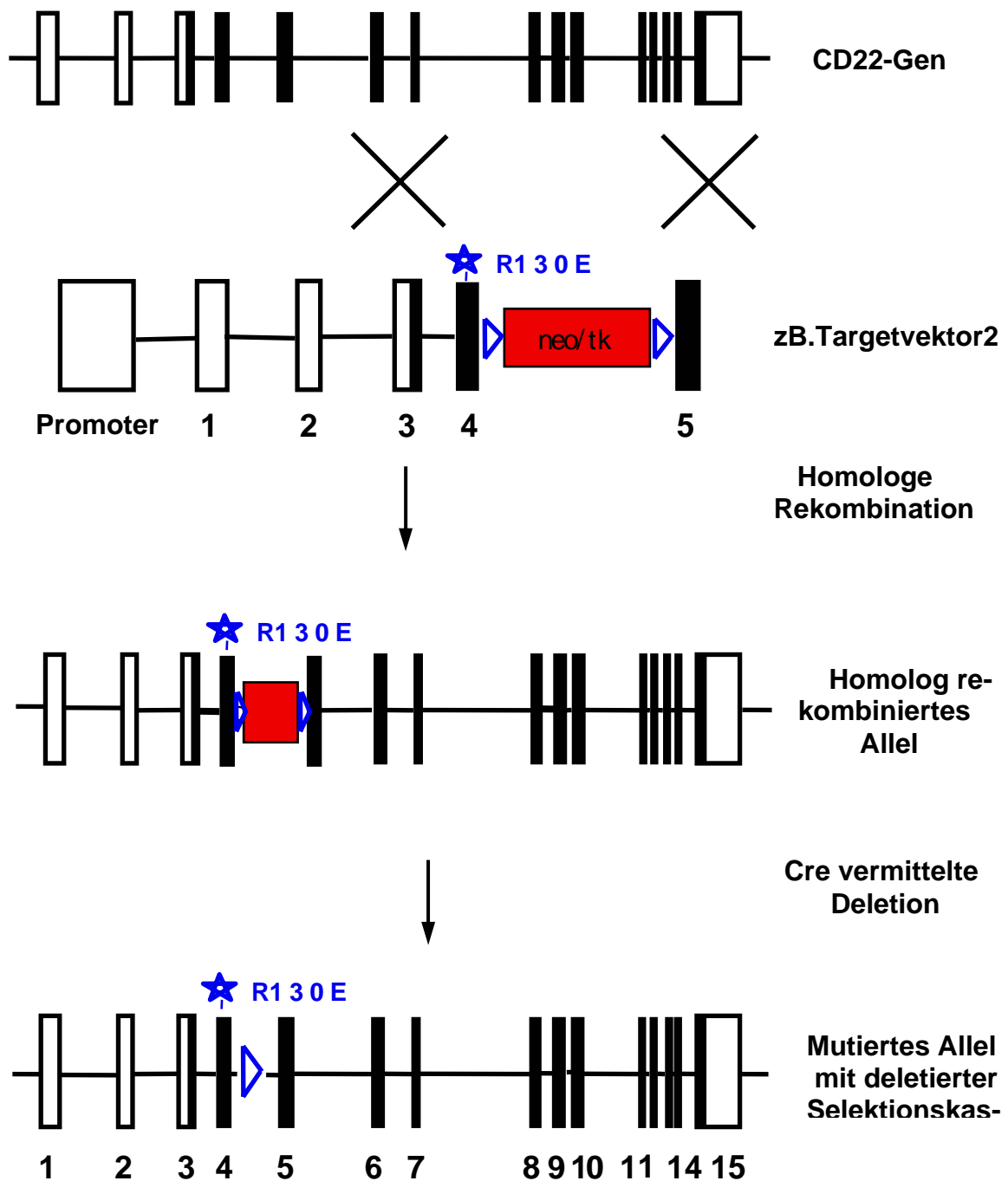


Abb. 17: Man sieht hier die genomische Organisation des CD22 Gens von Exon 1 bis Exon 15. Darunter hier das Targetkonstrukt, wobei die Kreuze die homologe Rekombination andeuten sollen. Die LoxP-Sequenzen (locus of X-over P1) sind durch Pfeile dargestellt. Nach der homologen Rekombination sollte ein Allel so mutiert sein, daß an der korrekten genomischen Position das Targetkonstrukt mit Selektionskassette,

LoxP-Stellen und der R130E-Mutation positioniert ist. Danach folgt die Deletion der Selektionskassette mittels der Cre-Rekombinase *in vitro* oder *in vivo*, wobei nur die Mutation und eine LoxP-Sequenz übrig bleiben sollten, die mit ihrer Positionierung in einem Intron die Expression nicht stören sollte.

3.1.1 Etablierung einer Screening-Target-PCR mit Hilfe eines Kontrollvektors

Das Testverfahren für eine erfolgreiche homologe Rekombination in ES-Zellen, das in dieser Arbeit verwendet wurde, bestand aus einer geschachtelten Screening-PCR aus der Selektionskassette über den 3'-Bereich des Targetvektors in den angrenzenden genomischen Bereich hinein. Zu diesem Zweck wurde der Kontrollvektor entworfen, mit welchem vor einem Targetexperiment mit dem Targetvektor eine Screening-PCR etabliert wurde.

Hierzu wurde zuerst eine ES-Zelltransfektion (s. Methoden 2.6.8) mit dem Kontrollvektor und der ES-Zelllinie der Wahl durchgeführt. Durch diese Vorgehensweise sollte eine sichere Positivkontrolle für das folgende Targetexperiment etabliert werden. In dem Fall des Kontrollvektors kann jeder G418-resistente ES-Zellklon einer Transfektion für diese Art der PCR verwendet werden, da nur wichtig ist, daß der 3'-Bereich des Kontrollvektors im Genom der getesteten ES-Zellklone enthalten ist, der über das 3'-Ende des Targetvektors hinausgeht. Nach der Transfektion der ES-Zellen mit dem Kontrollkonstrukt wurden nun sowohl Einzelklone in 96-well Platten gepickt, als auch Zelllysate aus ganzen Zellkulturschalen, die bis zum Heranwachsen der Klone kultiviert wurden, angefertigt. Mit diesem ES-Zellmaterial wurden nun Einzel-PCRs, wie auch geschachtelte PCRs etabliert.

Die 5'-Primer lagen hierbei im Bereich des Tk-Gens: **tk3'-1**; **tk3'-2** und **tk3'-3**. Die 3'-Primer lagen jeweils nahe jenseits Exon 5: **1432**; **22IN5AS1** und **22IN5AS2**. Somit sind die amplifizierten Fragmente je nach Primerpaarung 1,4 Kb (für die externe PCR) oder 1 Kb groß (für die interne PCR).

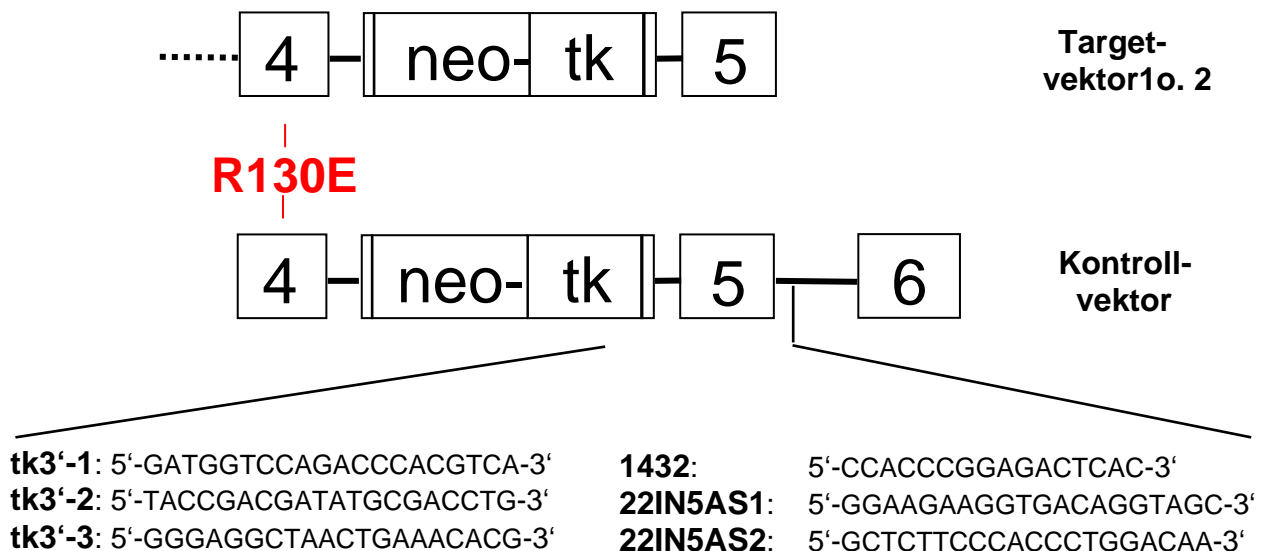


Abb. 18: Kontrollvektor mit 5'-Primern im Tk-Bereich und 3'-Primern jenseits Exon5 und somit des Targetvektors. Die Primer sind in ihrer 5'-3'-Orientierung angeordnet.

Für die Kontroll-PCR wurde jede Primerkombination einzeln etabliert und zudem alle möglichen geschachtelte Kombinationen getestet. Als PCR-Template wurden bei Einzelklonen 5 µl aus 96-well Platten und bei ES-Zelllysaten max. 2,5 µl eingesetzt. Das eingesetzte Templatevolumen spielt eine nicht unerhebliche Rolle, bei Lysat-PCRs mit einem größerem Volumen wurde die PCR-Reaktion gehemmt. Die PCR-Reaktion für die Einzelkombination wurde wie beschrieben durchgeführt (Material und Methoden 2.5.11).

Für die geschachtelten PCRs wurde, wie dann auch später beim „Targetscreens“, die erste PCR-Runde mit 25 Zyklen und die zweite mit 35 Zyklen ausgeführt. Als Template für die zweite PCR wurde ein empirisch als optimal getestetes Volumen von 2,5 µl aus der ersten PCR-Reaktion eingesetzt. Hier beispielhaft mit der Primerkombination, die in der Regel auch für die „Targetscreens“ verwendet wurde:

tk3'-1/22-IN5AS2 und tk3'-3/1432

37,9	µl ddH ₂ O
5	µl 10 × Reaktionspuffer
1,5	µl dNTPs (100 mM)
1,5	µl tk3'-1(60 ng/µl)
1,5	µl 22IN5AS2(60 ng/µl)
0,1	µl SuperTaq (HT Biotechnology LTD, England)
2,5	µl DNA-Template

50 µl Gesamtvolumen

Dieser Grundansatz wurde ohne Taq-Polymerase in einem Mastermix für den gesamten Screen pipettiert (in einem Falconröhrchen) und dann in 10er-Ansätzen in Eppendorfreaktionsgefäße. Erst jetzt wurde SuperTaq (HT Biotechnology LTD, England) hinzugegeben, da sich diese Vorgehensweise als effizienter und sicherer für das Gelingen der PCR mit einem so großen Ansatz erwies.

Die PCRs wurden in einem Biometra PCR-Cycler mit dem folgendem Programm durchgeführt:

94 °C	5 min.	Vordenaturieren
94 °C	45 s	Denaturieren
56 °C	45 s	Annealing
72 °C	60 s	Extension
→ 25 Zyklen		
72 °C	4 min.	Final Extension

Aus diesem ersten PCR-Ansatz wurde die zweite geschachtelte (nested) Reaktion wie folgt durchgeführt (der Mastermixansatz wurde wie beschrieben angesetzt):

37,9	μ l ddH ₂ O
5	μ l 10 × Reaktionspuffer
1,5	μ l dNTPs (100 mM)
1,5	μ l tk3'-3 (60 ng/ μ l)
1,5	μ l 1432 (60 ng/ μ l)
0,1	μ l SuperTaq (HT Biotechnology LTD, England)
2,5	μ l aus der ersten PCR-Reaktion
<hr/>	
50 μ l	Gesamtvolumen

Diese PCR-Reaktion wurde mit demselben Programm wie erstere ausgeführt, nur statt mit 25 Zyklen mit 35 Zyklen.

Exemplarisch sieht man auf dem folgenden Agarosegel Einzel- und geschachtelte PCRs mit leicht variierenden Templatemengen, aber jeweils korrekter Bandengröße. Die korrekten Bandengrößen der Einzel-PCRs sind:

1,4 Kb für tk3'-1/22IN5AS2
1,0 Kb für tk3'-3/1432

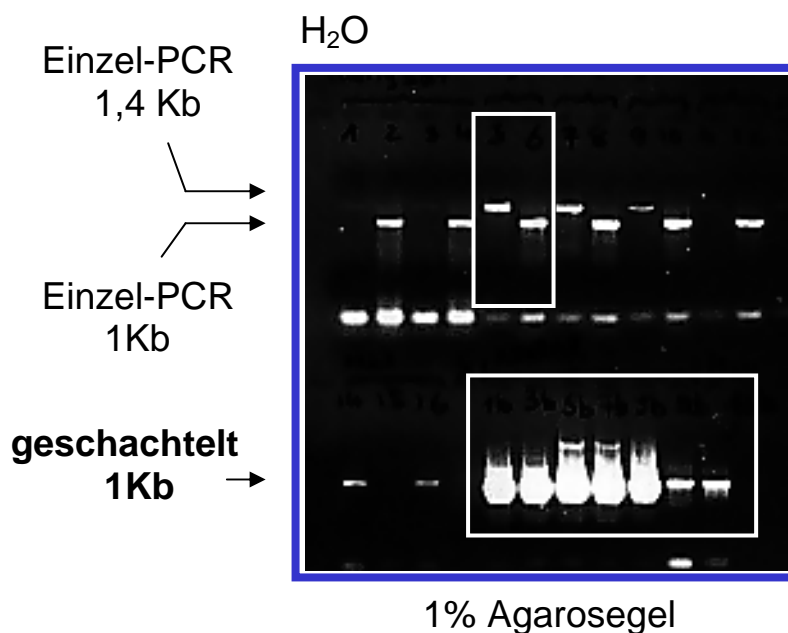


Abb.19: Agarosegelbeispiel für Test-PCRs mit dem R130E-Kontrollvektor. Zu sehen sind Einzel- und geschachtelte PCRs mit den angegebenen Primerkombinationen mit einem Template aus mit Kontrollvektor transfizierten ES-Zelllysaten.

Somit wurden die Primerkombinationen tk3'-1/CD22IN5AS2 und tk3'-3/1432 für die folgenden Gene Targeting Experimente mit dem Targetvektor verwendet, um eine korrekte homologe Integration des Vektors in das ES-Zellgenom mittels PCR-Screen zu verifizieren.

3.1.2 Kurzübersicht über die verwendeten ES-Zelllinien

Am Beginn dieser Doktorarbeit wurden ES-Zellen aus einem C57BL/6-III Mausstamm verwendet (Ledermann und Bürki 1991), um den Mausstamm beizubehalten mit dem die CD22 k.o. Maus (Nitschke et al. 1997) generiert wurde, damit spätere vergleichende Studien auf demselben Hintergrund basieren könnten. Mit der C57BL/6-III ES-Zelllinie (aus Freiburg von Dr. Lars Nitschke), dessen Keimbahntransmissionspotential getestet war, wurden nun ES-Zellklone mit einer korrekter homologen Rekombination gewonnen. Alle Schritte bis zur Verifikation durch PCR, Sequenzierung und Southern-Blot konnten durchgeführt werden. Doch schon beim Schritt, chimäre Mäuse zu generieren, traten Probleme auf. Es zeigte sich darauf, daß die verwendete C57BL/6-III ES-Zelllinie das Potenzial zur Keimbahntransmission verloren hatte, da diese nach Verpaarung von chimären Tieren mit C57BL/6 und CD22 k.o. (C57BL/6-Hintergrund) Mäusen nicht funktionierte.

Aufgrund vorhandenen Zellmaterials und Kenntnis über prinzipielles Keimbahntransmissionspotential wurden nun trotz eines anderen DNA-Hintergrundes mehrere Targetexperimente mit der BALB/c-I Maus-ES-Zelllinie (Noben-Trauth et al. 1996) durchgeführt. Es erwies sich jedoch trotz eines hohen Aufwandes (900 und 1000 getesteter ES-Zellklone in zwei Experimenten), daß der DNA-Hintergrund offensichtlich zu unterschiedlich ist, da kein korrektes homologes Integrationsereignis mittels Target-PCR detektiert werden konnte.

Somit mußte eine erneute Ausweichmöglichkeit gefunden werden, die den genetischen Hintergrund des vorhandenen Konstruktes mit in Betracht zog. An der Würzburger Universitätsklinik war diese Option durch das Labor von Kai Schuh gegeben, in dem erfolgreich die ES-Zellsublinie E14Tg2a (Kuehn et al. 1986) verwendet worden war. Daher fiel die Entscheidung auf diese Zelllinie, die durch einen Polymorphismusscreen in Exon 4 und 5 im Vergleich zu C57BL/6-III, 129/ola und WW6 (75% 129/Sv, 20% C57BL/6, 5% SLJ) getestet wurde. Alle vier getesteten Polymorphismen zeigten eine Übereinstimmung der E14Tg2a ES-Zelllinie mit dem 129/ola-Hintergrund, der dem C57BL/6-III Hintergrund näher ist als es der BALB/c Hintergrund ist.

An diesem Punkt der Arbeit wurde die Verlängerung des ursprünglichen Targetvektors (mit einem genomischen 129/ola DNA-Template aus Milzzellen) in 5'-Richtung in die Promoterregion des CD22-Gens durchgeführt, wodurch der lange Arm der homologen Rekombination auf nunmehr 4,7 Kb anwuchs. Mit der E14Tg2a Zelllinie und dem verlängerten Targetingvektor wurden ab diesem Zeitpunkt alle Targetexperimente der Arbeit durchgeführt, wobei die E14Tg2a ES-Zelllinie ein im Vergleich zu den zuvor verwendeten ES-Zelllinien ein extrem gutes Kultur- und Proliferationsverhalten an den Tag legte.

3.1.3 Gene Targeting Experimente mit der C57BL/6-III ESZelllinie

Das Gene Targeting mit dem R130E-Targetvektor wurde mit C57BL/6-III ES-Zellen (Ledermann und Bürki 1991) begonnen, um eine CD22/R130E „knock in“ Maus zu erzeugen, die den gleichen genetischen Hintergrund wie die CD22 defiziente „knock out“ Maus (Nitschke et al. 1997) hat. Da man je nach Effizienz des Targetexperiments von einer Integrationsfrequenz von einer korrekten Integration in ca. 50-100 transfizierten ES-Zellklonen ausgeht, muß eine genügend große Anzahl ES-Zellen elektroporiert und dann weiterkultiviert werden. Es wurden nie weniger ES-Zellen als aus einer dicht gewachsenen 175 cm²-Zellkulturflasche elektroporiert (s. Material und Methoden 2.6.8), dies entsprach ca. $2,5 - 5 \times 10^7$ ES-Zellen. Nun wurden verschiedene Gene Targeting Experimente, wie in Material und Methoden beschrieben, durchgeführt. Es wurden je nach Anzahl phänotypisch für gut befundener ES-Zellkolonien nach der G418-Selektion 500-1000 Einzelklone gepickt und auf 48-well Zellkulturplatten weiterkultiviert. Die beim ersten PCR-Screen positiven ES-Zellklone wurden bis mindestens auf 40 cm²-Zellkulturflaschen bei täglichem G418-Medienwechsel weiterkultiviert.

Diese ES-Zellklone mußten nun auf ihre korrekte homologe Integration weiter überprüft werden. Die Vorgehensweise sah dabei wie folgt aus:

- (1) Abermalige Target-PCR der beim ersten PCR-Screen positiven ES-Zellklone mit Lysaten aus späteren Stadien der Kultivierung, z.B. einem Teil einer 40 cm²-Zellkulturflaschen.

Nach zweimaliger Bestätigung der ES-Zellklone durch die Target-PCR wurde durch einen Southern-Blot die korrekte einmalige homologe Integration des Targetvektors überprüft.

Nach einem positiven Southern-blot Ergebnis mußte nachgewiesen werden, daß die Mutation durch den homologen Integrationsvorgang nicht verloren gegangen war. Zu diesem Zweck wurde eine geschachtelte PCR aus der Selektionskassette über die R130E Mutation hinweg durchgeführt und das PCR-Produkt dann sequenziert. Desweiteren wurde eine Mutations-PCR durchgeführt mit Primerpaaren, die spezifisch für die Mutationssequenz, beziehungsweise die entsprechende Wildtypsequenz sind.

Durch diese Vorgehensweise ergibt sich die hohe Anzahl der insgesamt durchgeführten Gene Targeting Experimente mit der C57BL/6-III ES-Zelllinie, da bei den ersten Experimenten keine Bestätigung der PCR-positiven ES-Zellklone durch Southern-blot erzielt werden konnte. Die folgende Auflistung gibt einen Überblick über die durchgeführten Targetexperimente mit der C57BL/6-III ES-Zelllinie mit Angabe der gescreenten ES-Zellklone, der PCR-positiven Klone nach der Screening-PCR und der Bestätigungs-PCR aus ES-Zelllysaten späterer Zellkulturstadien und der Southern-blot positiven ES-Zellklone:

**Integrationsereignisse nach homologer
Rekombination laut Target- PCR-Screen
mit tk3'-1/CD22IN5AS2 und tk3'-3/1432
und Southern-blot**

Experiment	Anzahl der gepickten Klone nach G418-Selektion	Anzahl der Target- PCR positiven Klone		Southernblot- positive Klone
		1.PCR	2.PCR	
(1)	550	3	2	0
(2)	700	13	5	0
(3)	750	27	10	0
(4)	800	9	2	1

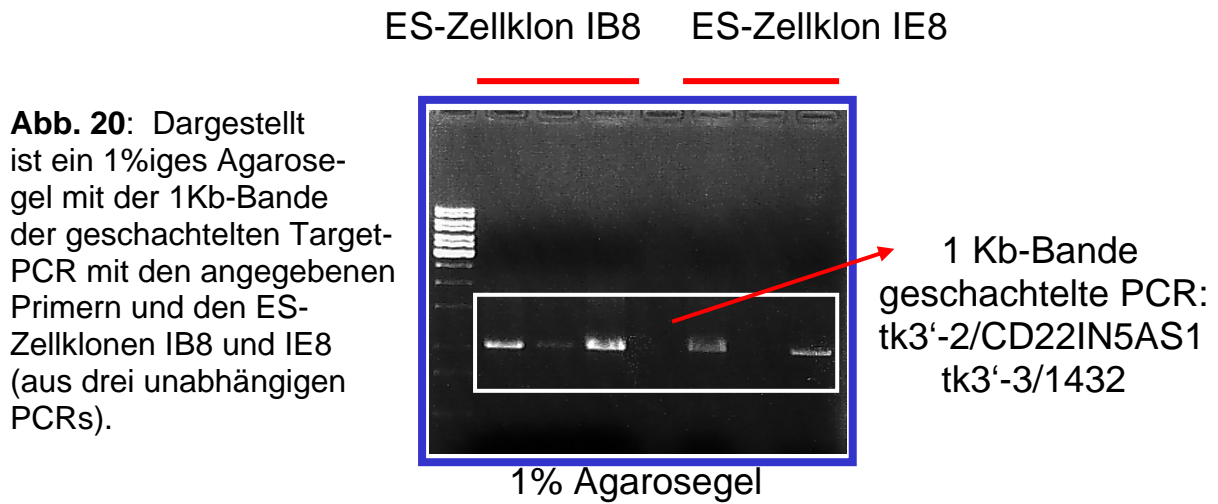
Da sich aus den Target-PCR positiven ES-Zellklone dieses ersten PCR-Screens mit tk3'-1/CD22IN5AS1 und tk3'-3/1432 nur ein einziger durch Southern-blot bestätigen ließ, wurden weitere Experimente, bei denen mit anderen Primer, nämlich der Primerpaarung tk3'-2/CD22IN5AS1 und tk3'-3/1432 die Target-PCRs durchgeführt wurden. Die Ergebnisse dieser PCR-Screens mit der C57BL/6-III ES-Zelllinie stellten sich wie folgt dar:

**Integrationsereignisse nach homologer
Rekombination laut Target-PCR-Screen
mit tk3'-2/CD22IN5AS1 und tk3'-3/1432
und Southern-blot Analyse**

Experiment	Anzahl der gepickten Klone nach G418-Selektion	Anzahl der Target- PCR positiven Klone		Southernblot- positive Klone
		1.PCR	2.PCR	
(5)	650	2	2	1
(6)	700	3	2	0
(7)	950	0	0	0

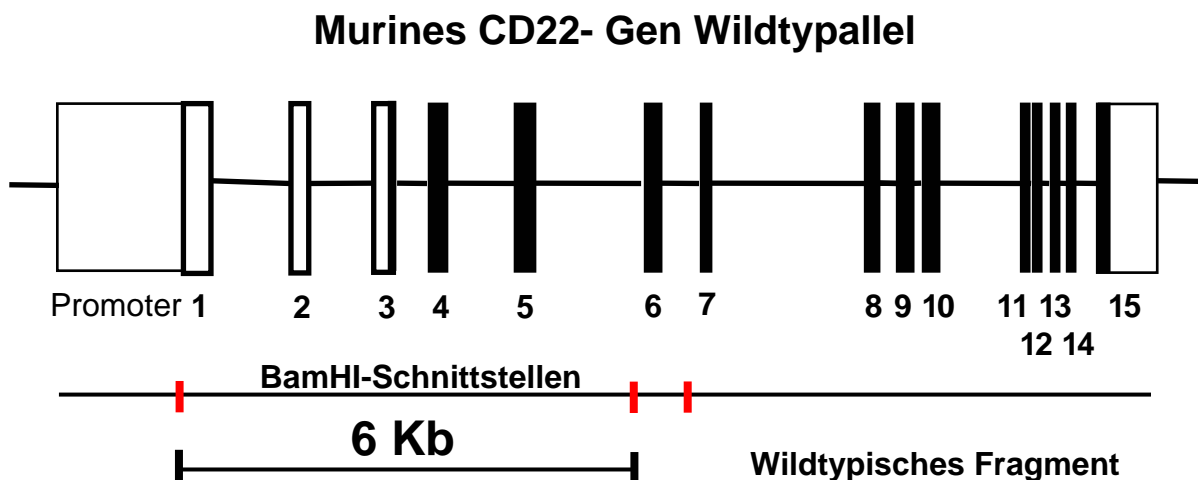
Es zeigte sich hierbei, daß trotz ähnlicher Anzahl analysierter ES-Zellklone wesentlich weniger ES-Zellklone PCR-Screen positiv waren. Aus den Gene Targeting Experimenten (4) und (5) konnten je zwei ES-Zellklone mit der jeweiligen Primerpaarun-

gen abermals durch weitere Target-PCRs mit Zelllysaten aus verschiedenen Zellkulturflaschenstadien bestätigt werden. Als Beispiel sind auf dem folgenden Agarosegel die ES-Zellklone IB8 und IE8 aus dem fünften Targetexperiment zu sehen:



3.1.4 Bestätigung der Target-PCR positiven ES-Zellklone mittels Southern-blot

Für die Verifizierung der Target-PCR positiven ES-Zellklone wurde nun eine Southern-blot Strategie erarbeitet. Zu dieser gehörte die Wahl eines passenden Restriktionsverdau und einer DNA-Sonde, die radioaktiv markiert wurde. Für die R130E Targetvektoren 1 und 2 wurde ein BamHI-Verdau gewählt, der die wildtypische genomische Bande von 6 Kb auf 9 Kb, im Fall einer korrekten Integration des Targetvektors mit Selektionskassette, anwachsen lassen würde.



CD22-Allel nach korrekter homologer Rekombination

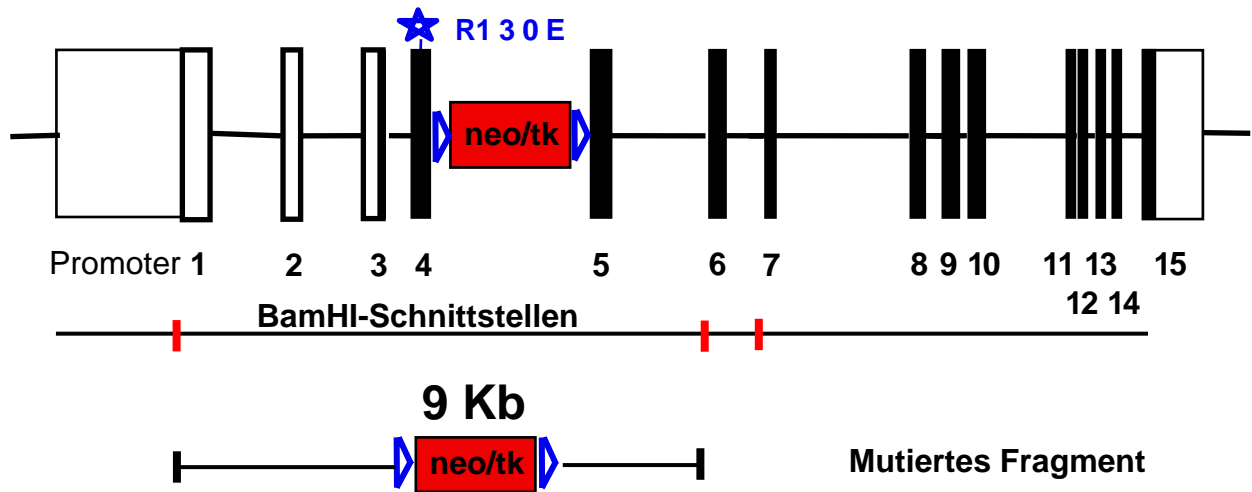


Abb.21: Darstellung des murinen wildtypischen CD22-Gens und des mutierten Allels nach korrekter homologer Rekombination. Vermerkt sind die jeweiligen BamHI-Fragmente, die durch einen Southern-blot bestätigt werden sollten.

3.1.5 Wahl und Isolation einer radioaktiven DNA-Sonde

Der mit einem BamHI-Verdau angefertigte Southern-blot wurde, wie beschrieben, mit einer durch random-priming markierten DNA-Sonde hybridisiert. Es gibt nun verschiedene Möglichkeiten, eine geeignete DNA-Sonde auszuwählen. Man kann eine interne, das heißt im Bereich des Targetkonstruktes liegende, oder eine externe Sonde in einem dem Targetvektor angrenzenden genomischen Bereich wählen. Bei der Wahl einer internen DNA-Sonde kann es passieren, daß man homologe Integrationsereignisse in das ES-Zellgenom detektiert, die nicht an der korrekten genomischen Position, sondern an einer zufälligen Position (eventuell nur Fragmente des Targetvektors) integriert haben. Aus diesem Grund ist eine externe DNA-Sonde, wenn technisch möglich, immer zu bevorzugen.

Da zu diesem Zeitpunkt der Arbeit die gesamte Sequenzinformation aus dem 3'-Bereich jenseits des Targetvektors und zudem schon erfolgreich verwendetes DNA-Template vorlag, wurden Sonden aus diesem Teil des CD22-Gens isoliert. Mit allen in der nächsten Abbildung aufgeführten Sonden wurden Southern-blots durchgeführt, aber nur mit einer Sonde (1,6 Kb/HindIII), deren Hauptanteil innerhalb der Targetvektorsequenz liegt, funktionierte jeder Southern-blot reproduzierbar. Die Sonden wurden immer durch Restriktionsverdau aus einem vorhandenen Vektor (zB. dem Kontrollvektor) isoliert. Dann wurden die Fragmente über ein Agarosegel und Ionenaustauschsäulen aufgereinigt, um schließlich erneut in den pBluescriptIIKS kloniert zu werden. Dadurch konnten die Sonden jederzeit in großen Mengen durch Restriktionsverdau und Aufreinigung zuverlässig produziert werden.

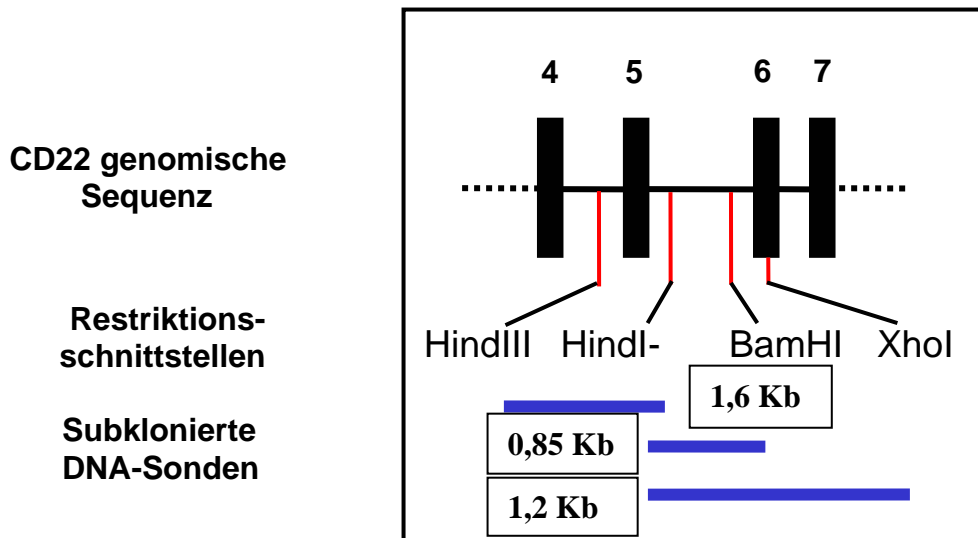


Abb. 22: Darstellung der in pBSKSII subklonierten DNA-Sonden für Southern-blot Experimente mit Target-PCR positiven ES-Zellklonen. Als DNA-Template diente der beschriebene R130E-Kontrollvektor.

3.1.6 Southern-blot Ergebnisse von C57BL/6-III ES-Zellklonen

Das erste reproduzierbare Southern-blot Ergebniss ergab sich aus dem vierten Targetexperiment mit der C57BL/6-ES-Zelllinie. Aus 800 gescreenten ES-Zellklonen mit den Primerpaaren Tk3'-1/CD22IN5AS2 und Tk3'-3/1432 konnten zwei durch eine abermalige Targetscreens-PCR wiederbestätigt werden.

Mit diesen beiden ES-Zellklonen (ES-Zellklone ID8 und IC1D8) und drei verschiedenen Kontrollklonen, von denen einer in der ersten Targetscreens-PCR positiv war (ES-Zellklon ID7) und zwei mit dem Targetvektor transfizierte, aber nicht Target-PCR positive ES-Zellklone (Klone VIB7 und IB2), wurde nun ein reproduzierbarer Southern-blot durchgeführt. Hierfür wurden in diesem Fall eine interne (1,6 KbHindIII) und eine externe (0,85 KbHindIII/BamHI) DNA-Sonde verwendet. Intern bedeutet hierbei ein DNA-Fragment, welches innerhalb des verwendeten Targetvektors liegt (in diesem speziellen Fall nur zum Teil). Eine so geartete Sonde hat den Nachteil, daß eine Integration des Targetvektors an einer nicht korrekten genomischen Position mit dem Southern-blot alleine nicht ausgeschlossen werden kann. Daher ist es sinnvoll eine externe Sonde, sprich ein DNA-Fragment aus einem dem Targetvektor angrenzenden Bereich, zu verwenden. Dies sieht man auf den folgenden reproduzierten BamHI-Southern-blots:

C57BL/6-III ES-Zellklone
BamHI-Southern-blots mit einer
 internen und externen Sonde hybridisiert

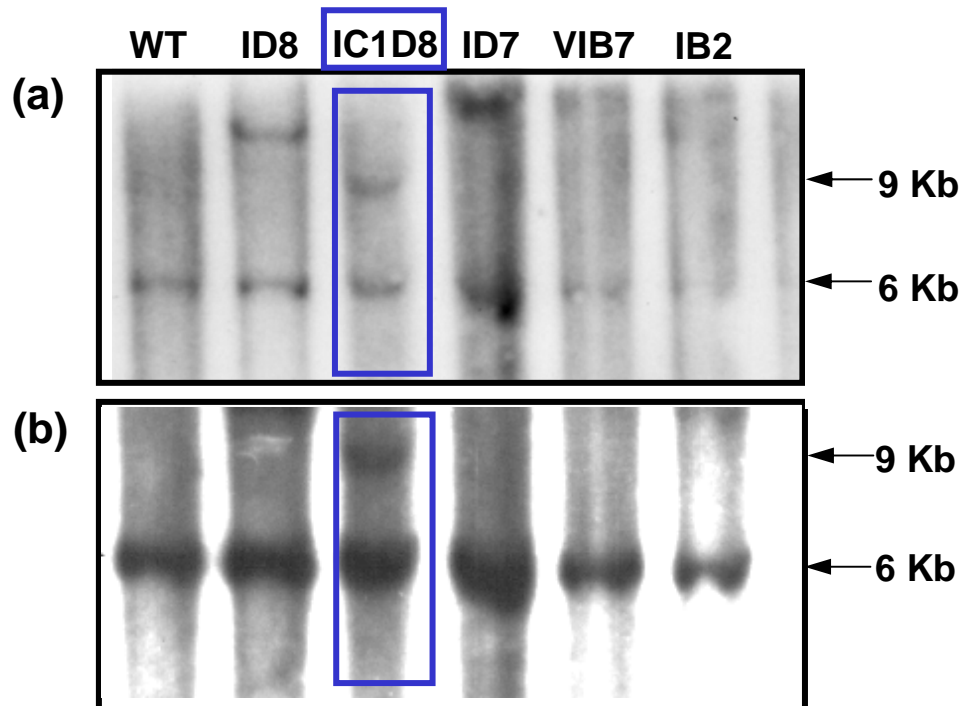


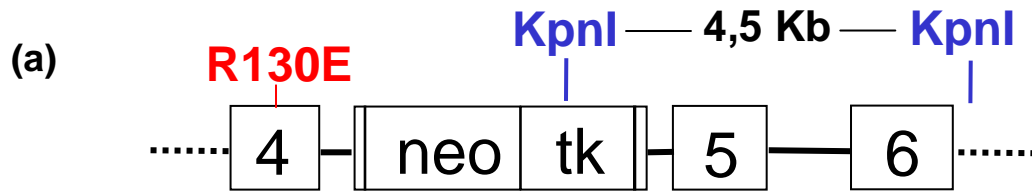
Abb. 23: Southern-blots mit BamHI-verdauter C57BL/6-III-WT-DNA und ES-Zellklon-DNA der Klone ID8, IC1D8, ID7, VIB7 und IB2. (a) Als radioaktive DNA-Sonde diente das interne 1,6KbHindIII-Fragment. (b) Als radioaktive DNA-Sonde diente das externe 0,85KbHindIII/BamHI-Fragment.

Dieser Southern-blot zeigt, daß das korrekte mutierte Fragment von 9 Kb Größe nur bei dem C57BL/6 ES-Zellklon IC1D8 aufleuchtet.

Um das Ergebnis des BamHI-Southern-blots weiter zu bestätigen, wurde ein weiterer Southern-blot mit einem alternativen Restriktionsverdau mit derselben 1,6KbHindIII-Sonde durchgeführt. Hier bot sich in diesem Fall ein KpnI-Verdau an, da eine KpnI-Schnittstelle innerhalb der Selektionskassette im Bereich des Tk-Gens liegt und eine weitere 3' jenseits Exon 6.

Desweiteren war nur bekannt, daß in einer Umgebung von mehreren Kilobasenpaaren um den Targetvektor keine weiteren KpnI-Schnittstellen liegen. Somit war für einen KpnI-Southern-blot ein sehr großes Wildtypfragment und im Fall einer korrekten homologen Integration des Targetvektors mit der Selektionskassette ein 4,5 Kb großes knock in Fragment zu erwarten.

Die Lokalisierung der KpnI-Schnittstellen bei korrekter Integration des Targetvektors ist nun folgend schematisch dargestellt, darunter ist der entsprechende KpnI-Southern-blot mit Markierung der C57BL/6 WT-DNA und des C57BL/6-III-ES-Zellklons IC1D8 abgebildet:



(b) **C57BL/6-III ES-Zellklone**
KpnI-Southern-blot mit einer
 1,6 Kb/HindIII-Sonde hybridisiert

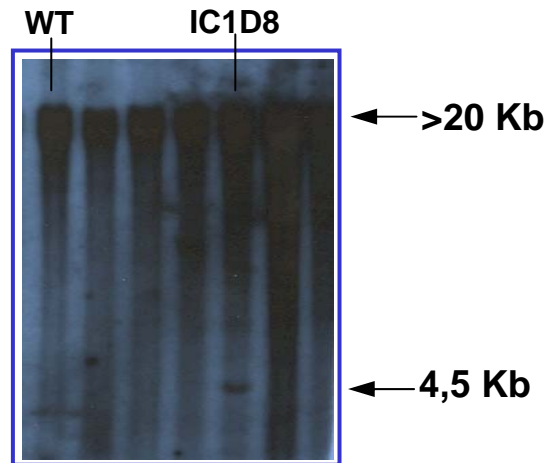


Abb. 24: (a) Darstellung des CD22R130E-Targetvektors mit der 3' angrenzenden genomischen Sequenz, für den Fall einer korrekten Integration des Targetvektors (von Exon 4 bis Exon 6) und bekannten KpnI-Schnittstellen. (b) KpnI-Southern-blot von C57BL/6-III-ES-Zellklonen mit Markierung von WT- und IC1D8-DNA.

Das Ergebnis dieses KpnI Southern-blots bestätigt das Ergebnis des BamHI Southern-blots. Auch hier ist das korrekte Fragment, das für das mutierte Allel spezifisch ist, in diesem Fall von 4,5 Kb Größe bei dem ES-Zellklon ICID8 zu sehen. Aufgrund der empirischen Befunde über die klonierten Sonden, gewonnen durch Southern-blot Experimente mit den angegebenen DNA-Fragmenten, wurde nun die 1,6 Kb-Sonde für die Hybridisierungen für die weiteren Southern-blots eingesetzt, da es keine reproduzierbaren Ergebnisse mit den externen Sonden gab. Diese interne DNA-Sonde, wurde durch random priming mit α -P³²-dNTPs radioaktiv markiert, und ein Southern-blot mit den C57BL/6-III ES-Zellklonen (BamHI verdaut) IB8 und IE8 aus dem fünften Targetexperiment hybridisiert. Das Autoradiogramm dieses Ansatzes ergab folgendes reproduzierbares Ergebnis:

C57BL/6-III ES-Zellklone
BamHI-Southern-blot mit einer
 1,6 Kb/HindIII-Sonde hybridisiert

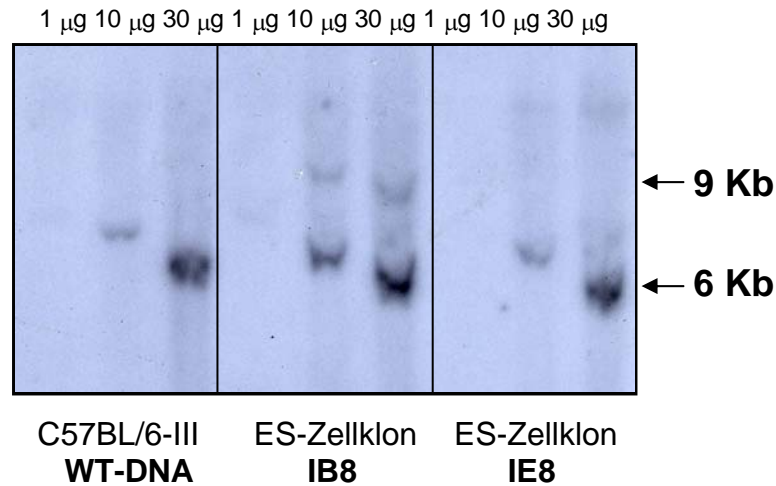


Abb. 25: Southern-blot mit BamHI-verdauter C57BL/6-WT-DNA und ES-Zellklon-DNA der Klone IB8 und IE8. Es wurden 1, 10 und 30 µg genomische ES-Zell-DNA eingesetzt. Als DNA-Sonde diente ein internes 1,6 Kb HindIII-Fragment, wie oben beschrieben (Abb. 22).

Als zusätzliche Bestätigung dieses Ergebnisses wurde vom Southern-blot die zuvor benutzte Sonde entfernt, indem 0,1× SSC/0,1 % (w/v) SDS zum Kochen gebracht wurde und der Southern-blot zweimal 15 min in einer Glaswanne in dieser Lösung geschüttelt wurde. Dieser Southern-blot wurde nun mit einer Neomycin-Phosphotransferasesegen-Sonde hybridisiert, um die Selektionskassette direkt zu identifizieren. Das Ergebnis dieser Hybridisierung ist auf dem nächsten Autoradiogramm zu sehen:

C57BL/6-III ES-Zellklone
BamHI-Southern-blot mit einer Neomycin-
 Phosphotransferasesegen-Sonde hybridisiert

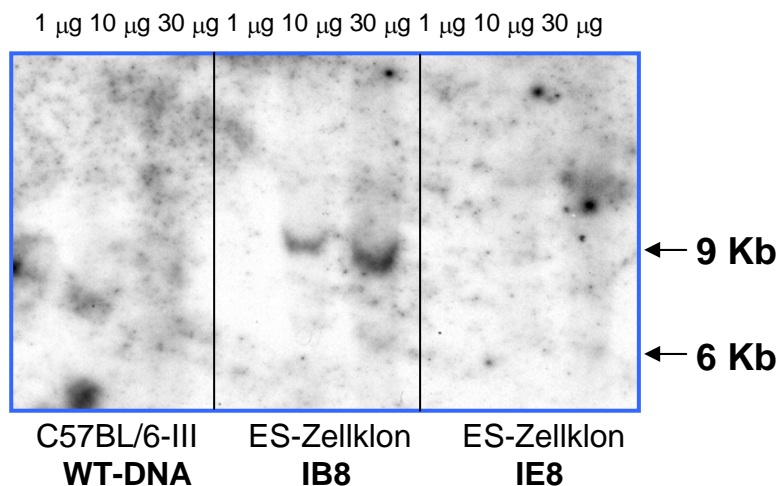


Abb. 26: Gestrippter Southern-blot, davor mit einer 1,6 Kb/HindIII-Sonde hybridisiert, danach mit einer Neomycin-Phosphotransferasegen-Sonde hybridisiert. Als Target-DNA sind wieder 1, 10 und 30 μ g C57BL/6-III wildtypische DNA und genomische DNA der ES-Zellklone IB8 und IE8 zu sehen.

Auf dem zuletzt gezeigten Autoradiogramm sieht man beim C57BL/6 ES-Zellklon IB8 ein 9 Kb Fragment. Dieses Fragment entspricht dem BamHI-Fragment, welches auch zuvor mit der 1,6 Kb/HindIII-Sonde identifiziert wurde. Dies bedeutet, daß dieses korrekte Fragment tatsächlich das Neomycin-Phosphotransferasegen enthält.

Theoretisch müßte auch beim ES-Zellklon IE8 ein Fragment einer anderen Größe detektierbar sein, da auch dieser Klon einer G418-Selektion unterzogen wurde. Aufgrund der Tatsache, daß das Agarosegel für die ausreichende Auftrennung der DNA-Fragmente lange über Nacht der Gelelektrophorese unterzogen wurde, könnte ein Fragment mit dem Neomycin-Phosphotransferasegen (ca. 1 Kb) durchaus schon aus dem Agarosegel ausgetreten sein.

3.1.7 Bestätigung von Southern-blot positiven ES Zellklonen mittels spezifischer Mutations-PCR und Sequenzierung

Die ES-Zellklone, die mit der ES-Zelllinien C57BL/6-III durch mehrmalige Wiederholung der Target-PCR aus verschiedenen Zellkulturstadien und Southern-blot als korrekt verifiziert werden konnten, mußten nun noch auf die R130E-Mutation hin überprüft werden. Dies wurde mittels zweier Strategien umgesetzt.

Zum einen wurde die Mutation direkt mit einer PCR in Exon 4 nachgewiesen. Auf der 5'-Seite der Mutation mit dem Primer 1428 und im R130E-Bereich mit einem Primerpaar 1425 und 1426. Hierbei enthält der Primer 1425 die Mutationssequenz, während 1426 die wildtypische C57BL/6-III Sequenz erkennt. Diese Mutations-PCRs wurden mit genomischer ES-Zellklon-DNA aus dem Zellkulturstadium einer 40 cm² Zellkulturflasche durchgeführt. Exemplarisch für eine der Mutations-PCRs ist hier ein Beispiel für die C57BL/6-III Klone IE8 und IB8 gegeben, wobei der Klon IB8 bestätigt werden konnte. Die korrekte Agarosegel-DNA-Bande ist 350 Basenpaare groß, darf aber im Falle der R130E (Primer 1428/1425) Primerpaarung nur bei einem ES-Zellklon mit der Mutation zu amplifizieren sein.

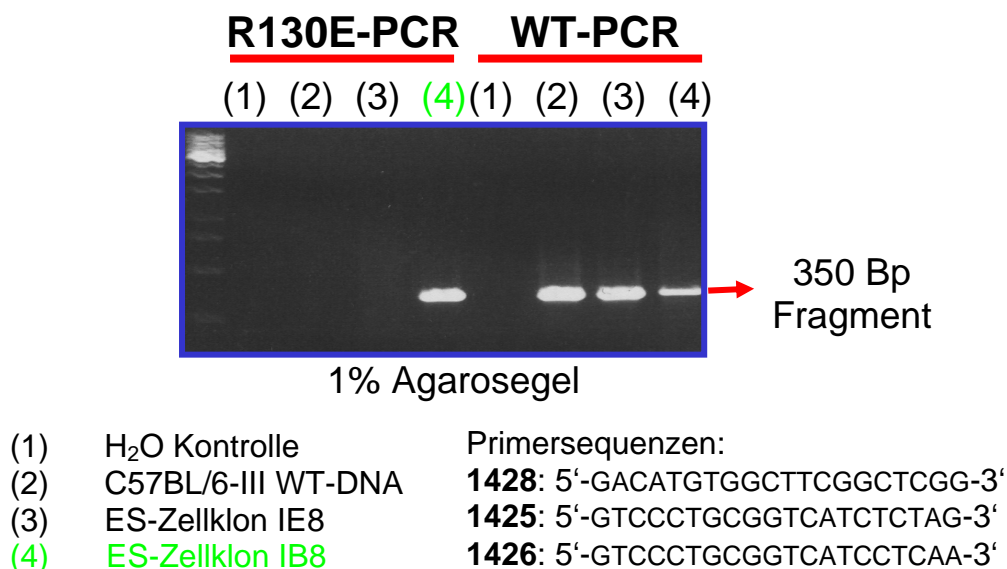


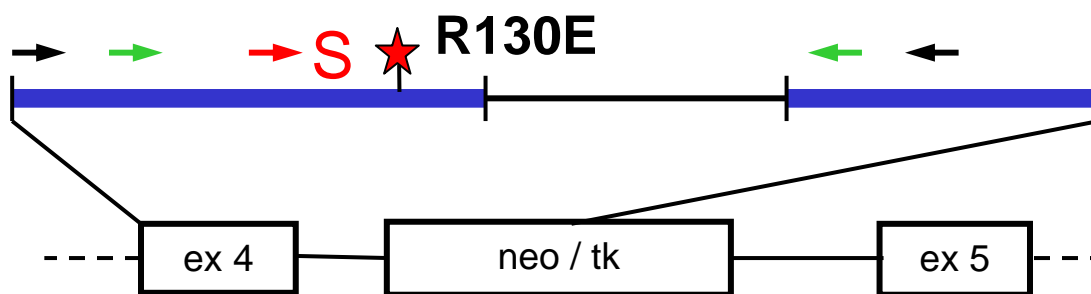
Abb. 27: PCRs für die R130E-Mutation und das WT-Allel anhand zweier C57BL/6-III ES-Zellklone. Die verwendeten Primer sind 1428 (5'-Primer), 1425 (R130E-Primer) und 1426 (WT-Sequenz-Primer), das erwartete PCR-Fragment ist 350 Bp groß.

Auf dem oben gezeigten Agarosegel erkennt man, wie erwartet, ein WT-Fragment für jede der verwendeten genomischen DNAs. Für die R130E-Mutations-PCR hingegen zeigt nur der ES-Zellklon IB8 ein korrektes PCR-Signal. Man würde auch für den ES-Zellklon IE8 ein 350 Bp-Fragment erwarten, allerdings nicht, wenn dieser Sequenzbereich des Targetvektors in diesem Fall gar nicht in das ES-Zellgenom integriert wurde. Der ES-Zellklon IE8 ist also G418 resistent, besitzt dem zur Folge eine funktionierende Neomycin-Resistenz, aber scheint andere Sequenzbereiche des Targetvektors gar nicht in das Genom integriert zu haben.

Um schließlich sicherzugehen, daß die R130E-Mutation bei der homologen Rekombination nicht herausrekombiniert wurde und sich noch an der korrekten Position 5' der Selektionskassette befindet, wurde eine geschachtelte (nested) PCR aus der Neomycinresistenzkassette über die R130E-Mutation hinweg (Primerpaarung 1428/neo8 und ex4-1/neo9) durchgeführt und das PCR-Produkt so weit wie möglich sequenziert (Primer ex4-2). Die Strategie für dieses Experiment ist hier exemplarisch anhand des C57BL/6-III Klons IB8 dargestellt.

Sequenzierergebnis des C57BL/6-III ES-Zellklons IB8

(a) Schema der Sequenzierungsstrategie:



- ➔ Primerpaarung: 5'- 1428/neo8 -3'
- ➔ Primerpaarung: 5'- ex4-1/neo9 -3'
- ➔ Sequenzprimer: ex4-2

(b) Sequenzierung der geschachtelten PCR mittels Primer ex4-2:

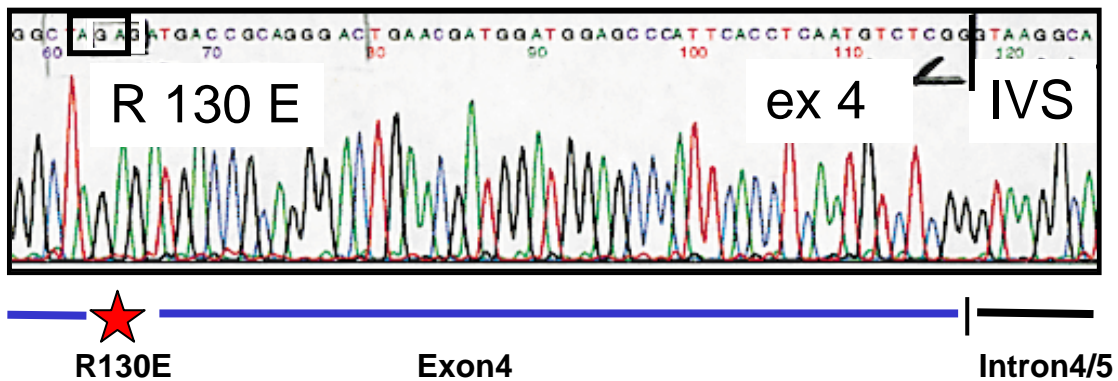


Abb. 28: (a) Schema der Sequenzierungsstrategie (b) Sequenziererergebnis des C57BL/6-III ES-Zellklons IB8 zur Überprüfung der R130E-Mutation und deren Position. Die verwendeten Primer und deren schematische Position innerhalb des Targetvektors sind dargestellt, wie auch das zu dem Klon gehörige Sequenziererergebnis.

Anhand dieser Sequenzierung sieht man die durch den Primer 9125 eingeführte R130E-Mutation, sowie zwei Nukleotide, die von der eingeführten XbaI-Restriktionsschnittstelle der Vektorklonierung herrühren. Die Wildtypsequenz und die mutierte Sequenz stellen sich wie folgt dar:

WT	5' - TTG <u>AGG</u> - 3'
R130E	5' - CTAG <u>GAG</u> - 3'

Somit resultierten aus sieben verschiedenen Gene Targeting Experimenten mit der C57BL/6-III ES-Zelllinie 57 Target-PCR positive ES-Zellklone nach der ersten Screening-PCR. Bei der Bestätigung mit genomischer DNA aus den jeweiligen 40 cm² Zellkulturflaschenstadien konnten von diesen 57 ES-Zellklonen 23 durch eine abermalige Target-PCR mit den entsprechenden beim Screening verwendeten Target-PCR-Primern verifiziert werden.

Die ersten vier Target Experimente wurden mit der Primerkombination tk3'1/CD22IN5AS2 und tk3'3/1432 durchgeführt. Hierbei konnten aus 2800 untersuchten ES-Zellklonen von 52 Screen-Target-PCR ES-Zellklonen nur 19 durch abermalige Bestätigungs-PCR verifiziert werden und nur einer (IC1D8) von diesen mit verschiedenen Southern-blots bestätigt werden.

Bei den drei folgenden Target Experimenten wurden mit der Primerpaarung tk3'2/CD22IN5AS1 und tk3'3/1432 aus 2300 untersuchten ES-Zellklonen 5 PCR-positive Klone durch die Target-PCR identifiziert. Die darauf folgende Bestätigungs-PCR aus genomischer DNA konnte 4 dieser 5 ES-Zellklone verifizieren. Bei den

durchgeführten Southern-blots konnte einer dieser ES-Zellklone (IB8) als ein eine korrekte homologe Rekombination durchlaufener ES-Zellklon bestätigt werden. Aus diesen Ergebnissen läßt sich entnehmen, daß offensichtlich die Primerkombination für den PCR-Screen durchaus eine entscheidende Rolle spielt.

3.1.8 Cre-Transfektion von C57BL/6-III ES-Zellklonen zur in vitro Deletion der Selektionskassette

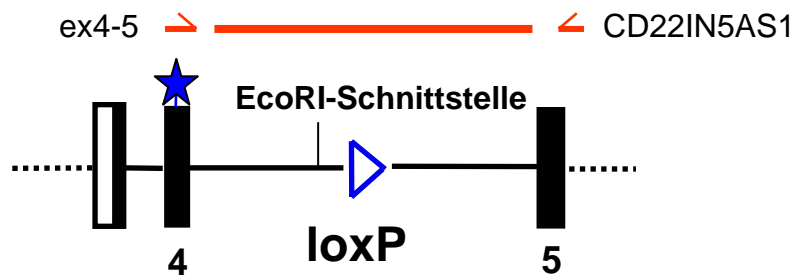
Die ursprüngliche Planung für die Weiterbehandlung der homolog rekombinierten und als korrekt bestätigten Klone war, diese durch transiente Cre-Plasmid (pMC-Cre; Gu et al. 1993)-Transfektion in vitro von der Selektionskassette zu befreien (Sauer 1987; Sauer 1993; Sauer und Henderson 1988). Diese ES-Zellklone, die sich vom Wildtyp nur noch durch die R130E-Mutation und eine loxP-Sequenz mit Linker unterscheiden würden, sollten dann in Blastozysten injiziert werden.

Doch tauchten zu diesem Zeitpunkt Probleme mit dem im Labor vorhanden pMC-CreN Plasmid auf (von Dr. Lars Nitschke aus dem Freiburger MPI), so daß keine erfolgreiche Deletion der Selektionskassette erzielt werden konnte. Es stellte sich heraus, daß es zu verschiedenen Punktmutationen in diesem pMC-CreN Plasmid gekommen war, daher wurden noch andere Cre-Expressionsplasmide getestet. Diese alternativen Plasmide stammten aus dem Labor Andras Nagy (pCX-NLSCre), Michael Sendtner (pMC-Cre), Markus Mohrs (pMCCreN) und Burkhard Kneitz (pCMV-Cre). Diese Plasmide wurden auf ihre Funktionalität hin untersucht und schließlich das pMC-cre Plasmid aus dem Labor Michael Sendtners verwendet.

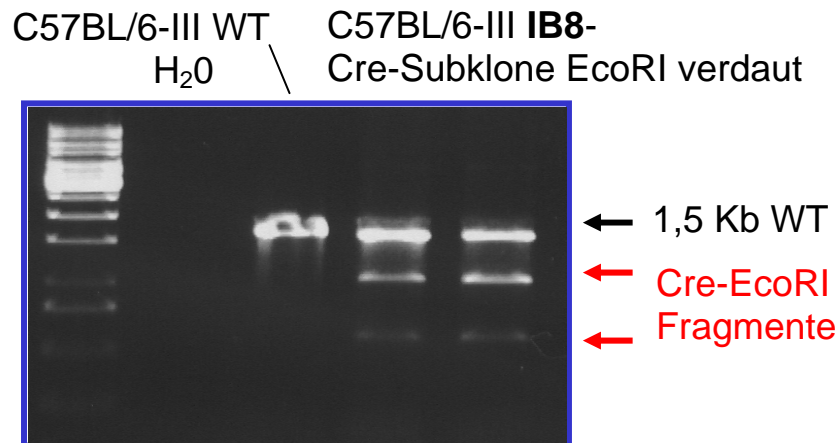
Die ES-Zellklone der Wahl wurden unter den gleichen Bedingungen elektroporiert wie ES-Zellen bei Gene Targeting Experimenten. Es stellte sich durch den Vergleich verschiedener Elektroporationen heraus, daß max. 5 µg des eingesetzten pMC-cre Vektors für eine effiziente Deletion der Selektionskassette ausreichten.

Zum Testen einer erfolgreichen Cre-Deletion wurde nun eine PCR konzipiert. Der 5'-forward Primer (ex4-5) liegt am 3'-Ende (21 Bp entfernt) von Exon 4. Der 3'-Primer (CD22IN5AS1) liegt 3' aufwärts von Exon 5. Somit entsteht ein ca. 1,5 Kb großes PCR-Fragment, daß das gesamte Intron 4/5 enthält, und somit auch ein Allel mit den loxP-Sequenzen und flankierenden Linkern amplifiziert. Dieses PCR-Fragment ähnlich groß wie das WT-Fragment. Zur letztendlichen klaren Kontrolle wurde ein EcoRI-Verdau mit dem PCR-Produkt durchgeführt, da in diesem CD22-Bereich nur eine EcoRI-Schnittstelle in der Linkersequenz der loxP-Site existiert. Eine schematische Darstellung dieser PCR und Beispiele von Cre-Subklonen des C57BL/6-III Mutterklones IB8 sehen wie folgt aus:

(a) Schematische Darstellung der PCR zur Identifikation des Allels mit *LoxP*-Sequenz:



(b) PCR-Ergebnis zweier C57BL/6-III IB8-Cre-subklone mit *EcoRI* verdaut:



ex4-5: 5'-GACTGAACGATGGATGGAGC-3'

CD22IN5AS1: 5'-GGAAGAAGGTGACAGGTAGC-3'

Abb. 29: (a) Schema der PCR (Primerpaarung ex4-5 und CD22IN5AS1), die die intronische Sequenz zwischen Exon 4 und 5 abdeckt, für den analytischen *EcoRI*-Verdau zweier Cre-Subklone des C57BL/6-III Mutterklones IB8. (b) Agarosegelbeispiel mit C57BL/6-III-WT und Cre-Subklon IB8 *EcoRI* verdauter DNA.

Mit dem oben gezeigten Test konnte die erfolgreiche Cre-Deletion bei zwei C57BL/6-III IB8 Cre-Subklonen gezeigt werden. Durch die Tatsache, daß nur eine *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle im intronischen Bereich zwischen Exon 4 und Exon 5 existiert, die das 1,5 Kb PCR-Fragment in ein 1 Kb und 0,5 Kb Fragment spaltet, kann mit Sicherheit ein korrekt Cre-deleliertes Allel nachgewiesen werden. Die PCR mit der C57BL/6 wildtypischen DNA dient lediglich als Positivkontrolle für ein korrektes funktionieren der PCR, und als negativ Kontrolle für den *EcoRI* Verdau.

An diesem Punkt der Arbeit zeigte sich anhand der ES-Zellklon IC1D8 und IB8 die praktische Umsetzung eines Gene Target Experiment bis hin zur Gewinnung injek-

tionsfähiger ES-Zellmutterklone (Klone nach der Bestätigung durch PCR, Sequenzierung und Southern-blot) und Cre-Subklonen (Mutterklone ohne Selektionskassette nach Cre-Deletion).

3.1.9 Blastocysteninjektionen mit der C57BL/6-III ES-Zelllinie

Wie oben beschrieben (s. 3.1.9) existierten über eine längere Zeitspanne Probleme mit einer effizienten in vitro Deletion der Selektionskassette durch Transfektion mit einem pMC-CreN Plasmid. Es waren zu diesem Zeitpunkt zwar schon mittels der Cre-Rekombinase deletierte Subklone vorhanden, bei denen jedoch die Deletion der Selektionskassette, weder durch PCR, noch durch Sequenzierung nachgewiesen werden konnte. Es lagen aber schon die verschiedensten Subklone der C57BL/6-III ES-Zellmutterklone IC1D8 und IB8 vor. Diese C57BL/6-ES-Zellklone waren durch verschiedene Target-PCRs, Southern-blot, Sequenzierung und eine spezifische Mutations-PCR als Klone mit einer korrekt abgelaufenen homologen Rekombination verifiziert.

In dieser Situation entschlossen wir uns dazu, ES-Zellmutterklone für eine Blastocysteninjektion zu verwenden, um nicht unnötig Zeit zu verschwenden und gleichzeitig die Pluripotenz und das Keimbahntransmissionspotenzial der verwendeten C57BL/6-ES-Zelllinie zu testen, da unter den Arbeitsbedingungen in unserem Labor noch keine Information über diese Parameter vorlag. Die klassische Vorgehensweise ist hierbei, die ES-Zellen in eine 3,5 Tage alte Blastocyste (hier eine BALB/c-Blastocyste) zu injizieren und diese dann in den Uterus eines scheinträchtigen Weibchens (hier CD1 Mäuse) zu transferieren. In diesem Fall würde man dann die chimären Nachkommen mit einer sogenannten Cre-deleter Maus verpaaren, um die Selektionskassette nach dem Verschmelzen der Vorkerne dann in vivo aus dem Cd22-Locus zu deletieren.

Die ersten Injektionsexperimente wurden von Birgit Ledermann am Institut für Versuchstierkunde in Zürich/Irchel durchgeführt. Es wurden hier C57BL/6-III ES-Zellmutterklone verschiedener Passagen des Klons IC1D8 verwendet. Die Passagenzahl (P_x) eines ES-Zellklons korreliert direkt mit dem Alter und somit auch mit der Zeitspanne, die der ES-Zellklon in Kultur war. Bei diesen beiden ersten Injektionsexperimenten (06.2000) wurde ein IC1D8-Klon mit der Passagenzahl 24 und einer mit der Passagenzahl 29 verwendet. Die für dieses Targetexperiment aufgetauten C57BL/6-III ES-Zellen besaßen zu diesem Zeitpunkt die Passagenzahl 13. Aus diesen Injektionsversuchen ging insgesamt nur ein nicht chimäres Männchen aus dem P_{24} IC1D8 Mutterklon hervor. Die Amme in dem Experiment mit dem P_{29} IC1D8 Mutterklon wurde zwar trächtig, schien aber die Embryos wieder resorbiert zu haben, da es keinerlei Nachkommen gab. Dieses Erscheinungsbild mag an der relativ hohen Passagenzahl eines ES-Zellklons liegen, wobei dies kein eindeutiger Befund ist.

Alle folgenden ES-Zellinjektionen mit C57BL/6-III ES-Zelllinienklonen wurden sowohl von Birgit Ledermann in Zürich, als auch von Dr. Burkhard Kneitz (Physiologische Chemie I, Universität Würzburg) an unserem Institut durchgeführt. Nach den ersten erfolglosen Injektionen mit C57BL/6-III ES-Zellmutterklonen, konnten nach diversen Problemen auch in vitro durch die Cre-Rekombinase von der Selektions-

kassette bereinigte Cre-Subklone gewonnen werden. Vorerst lagen ca. jeweils 50 dieser Subklone der ES-Zellmutterklone IC1D8 und später IB8 vor. Von diesen waren jeweils 10 Cre-Subklone durch die schon beschriebene spezifische PCR und Behandlung der Cre-Subklone mit G418 (ES-Zellklone sterben ohne Neomycinresistenzgen) und Ganciclovir (ES-Zellklone überleben in Abwesenheit des Tk-Gens) als korrekt bestätigt.

Diese Cre-Subklone wurden für die weiteren Blastocysteninjektionen verwendet. Hierbei ist zu bemerken, daß diese Cre-Subklone nun natürlich eine höhere Passagenzahl als der entsprechende ES-Zellmutterklon besitzen. Dies bedingt nun wiederum eine höhere Wahrscheinlichkeit, daß die Pluripotenz, oder das Keimbahntransmissionspotenzial dieser ES-Zellklone durch die Zellkultur ansich beeinträchtigt wurde. Nichts desto trotz entschieden wir uns ab diesem Zeitpunkt auf die Cre-Subklone zurückzugreifen, da es zum einen der ursprünglichen Planung entsprach und zum anderen eine Zeiteinsparung bedeutete, da eine spätere Verpaarung mit einer Cre-deleter Maus zur Deletion der Selektionskassette in vivo entfallen würde.

Alle C57BL/6-III ES-Zell-Blastocysteninjektionen mit Angabe des ES-Zellklons, des Injektors und des Ergebnisses sind in der nun folgenden Tabelle aufgelistet:

Monat/Jahr	ES-Zellklon	Injektor	Nachkommen	Verpaarung
06.2000	IC1D8/P24	B.Ledermann	1×nicht chimär	keine
06.2000	IC1D8/P29	B.Ledermann	keine	keine
09.2000	creD5/P29	B.Ledermann	keine	keine
10.2000	creI43/P27	B.Ledermann	keine	keine
10.2000	creIE10/P30	B.Kneitz	Amme trächtig	keine
12.2000	creD5/P30	B.Ledermann	keine	keine
01.2001	creS4/P26	B.Kneitz	Amme trächtig	keine
04.2001	creS10/P27	B.Kneitz	6×Chimäre	mit BL/6 50-90%ig
05.2001	creS9/P25	B.Kneitz	Keine Keimbahn-Transmission keine	keine

Hierbei sind alle Cre-Subklone, die im Jahre 2000 injiziert wurden, Abkömmlinge des ES-Zellmutterklons IC1D8 und die Cre-Subklone, die im Jahr 2001 injiziert wurden, Abkömmlinge des ES-Zellmutterklons IB8.

In vielen Fällen wurde die Amme gar nicht trächtig. In anderen wurde die Amme zwar schwanger, aber resorbierte die Embryonen offensichtlich wieder und hatte somit keine Nachkommen. Zudem trat ein Wurf auf, bei dem nur ein nicht chimäres Männchen vorhanden war. Nur ein einziges Injektionsexperiment und Transfer in eine Ammenmutter mit dem C57BL/6-ES-Zellklon CreS4 (ein durch die Cre-Rekombinase von der Selektionskassette befreiter ES-Zellsubklon) ergab insgesamt sechs chimäre Nachkommen. Vier von diesen Tieren waren Weibchen und zwei Männchen (Chimärismus von 50-90 %). Diese Tiere wurden nun mit hauseigenen C57BL/6 Mäusen verpaart. Bei dieser Konstellation ist eine Keimbahntransmission an einer schwarzen Fellfarbe zu erkennen. Stammt die Keimzelle allerdings von der BALB/c-Blastocyste ab, in die die C57BL/6-III ES-Zellen injiziert wurden, haben die Nachkommen eine

braune Fellfarbe. Trotz der Vielzahl der Verpaarungen (20 Stück) aller sechs chimären Tiere dieses einen Wurfes wurden nur braune Tiere (ca. 120 Tiere) geboren. Somit konnte mit keinem dieser Mäuse eine Keimbahntransmission erzielt werden.

3.1.10 Targetvektorveränderung im Hinblick auf eventuelle Infertilität bei Männchen durch das Herpes Simplex Virus Thymidinkinasegen

Aufgrund persönlicher Hinweise von verschiedenen Seiten tauchte ein weiteres Problem auf. Es handelte sich hierbei um die Tatsache, daß männliche Tiere, die das Herpes Simplex Virus Thymidinkinasegen in ihrem Genom tragen eventuell steril sein könnten. Schon 1990 (Braun et al. 1990) wurde das Phänomen der Infertilität von Mausmännchen bei Expression der HSV-Tk in den Keimzellen beschrieben. Bei histologischen Untersuchungen zeigte sich eine Unterbrechung der Spermienentwicklung bei gleichzeitiger hoher Expression der HSV-Tk in diesen Spermien. Zudem wurde ein spezifischer Promoter für die Expression der HSV-Tk in postmeiotischen Keimzellen eingesetzt. Auch diese Mäuse waren steril, und somit wird das Auftreten der Sterilität der Expression der HSV-Tk zugeschrieben.

Drei Studien in Folgejahren (Salomon et al. 1995; Ellison und Bishop 1998; Cohen et al. 1998) belegten diesen Befund und zeigten zudem, daß durch verschiedene Variationen des HSV-Tk-Gens der Infertilitätseffekt bei gleichzeitiger Funktionalität hinsichtlich der Ganciclovirphosphorylierung aufgehoben werden kann.

Da wir die Zeit bis zur Generierung von in vitro Deletion der Selektionskassette überbrücken wollten, lag somit die Überlegung nahe, den Tk-Genbereich aus dem Targetvektor zu entfernen. Somit wurde eine neue Präparation des Targetvektors 2 angefertigt, aus dem durch nur im Tk-Gen schneidende Restriktionsendonukleasen (SmaI und Pfl23II jeweils von MBI) ein 1 Kb großes Fragment des Tk-Gens entfernt wurde (Targetvektor2Tkdelete). Die überhängenden Enden wurden mit der Klenow-Polymerase aufgefüllt, und der Targetvektor religiert. Die von diesem Zeitpunkt an durchgeführten Targetexperimente wurden jeweils mit dem Targetvektor2 und dem Targetvektor2Tkdelete durchgeführt. Somit könnten die ES-Zellmutterklone, die auf diese Weise mit dem Targetvektor2Tkdelete gewonnen werden würden, direkt für Injektionsexperimente eingesetzt werden, um den Rest der Selektionskassette dann in vivo durch Kreuzung mit einer Cre-Deleter Maus, die die Cre-Rekombinase als konstitutiv aktives Transgen exprimieren, zu entfernen.

Leider erwies es sich schon bei den ersten auf die C57BL/6-ES-Zelllinienexperimente folgenden Targetexperimente, daß es mit dem neuen Targetvektor2Tkdelete keine G418 resistenten ES-Zellklone gab, daher mußte für die folgenden Experimente doch wieder auf den Targetvektor2 zurückgegriffen werden.

3.1.11 Veränderung der ES-Zell Kulturbedingungen

Aufgrund von Problemen bei den Injektionsversuchen mit der C57BL/6-III ES-Zelllinie lag die Überlegung nahe, die Kulturbedingungen für ES-Zellen zu optimieren. Durch persönliche Information aus verschiedenen Quellen (z.B. Phillip Yu; ehemals MPI in Freiburg) wurde uns mitgeteilt, daß Medien und Medienzusätze, die in mit Spülmitteln (z.B. Tensiden) behandelten Glasgefäßen gelagert werden, nicht für die Kultur von ES-Zellen geeignet seien und eventuell sogar essentielle Faktoren (Pluripotenz, Potenzial Keimbahntransmission zu bewirken) negativ beeinflussen könnten. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde für die Kultur von ES-Zellen und EMFIs nur Medien und Zusätze aus hauseigenen Mitteln verwendet. Nun entschlossen wir uns DMEM-Medium, PBS, Glutamin, β -Mercaptoethanol, Penicillin und Streptomycin von Gibco/Invitrogen zu beziehen. Die Medien für die Zellkultur wurden nur in Plastikgefäßen, die original von Gibco/Invitrogen geliefert wurden hergestellt. Somit konnte eine Kontamination mit Spülmittelzusätzen oder Ähnlichem vermieden werden.

3.1.12 Gene Targeting Experimente mit der BALB/c-I ES-Zelllinie

Da es trotz mit den erwähnten Methoden bestätigten C57BL/6-III-ES-Zellklonen mit korrekter homologer Integration keine erfolgreiche Keimbahntransmission gab, wurden wie erwähnt andere ES-Zelllinien in Betracht gezogen. Als erstes wurden zwei Gene Targeting Experimente mit der BALB/c-I-Linie (Noben-Trauth et al 1996) durchgeführt.

Seit 1993 (Law et al. 1993) ist bekannt, daß das Cd22 Gen mindestens zwei Allele besitzt. Bei einem Vergleich von BALB/c und C57BL/6 Tieren wurde ein weiteres Allel vermutet (van der Merwe et al. 1996), welches dann 1999 identifiziert wurde (Lajunias et al. 1999). Zudem ist durch einen Vergleich von Sequenzierung der kodierenden Region festzustellen, daß mindestens zehn Nukleotid- und sieben daraus folgende Aminosäuresubstitutionen zwischen dem C57BL/6 CD22-Gen und dem BALB/c CD22-Gen existieren, wobei ein Aminosäureaustausch in Exon 4 (Val→Cys) und zwei in Exon 5 (Arg→Cys und Arg→His) positioniert sind (und damit den Targetvektor betreffen). Es erwies sich, daß dieser Polymorphismus des Cd22-Gens offensichtlich eine Rolle spielt bei der Verwendung des C57BL/6-III Targetvektors mit der BALB/c ES-Zelllinie, da bei den beiden Experimenten mit dieser Konstellation keine ES-Zellklone durch den Target-PCR-Screen detektiert werden konnten. Es ist bekannt, daß die Wahrscheinlichkeit eines homologen Rekombinationsereignisses bei Verwendung nicht isogener DNA dramatisch sinkt (te Riele et al. 1992; Zhou et al. 2001). In dieser Arbeit wurden 900 und 1000 einzelne BALB/c-ES-Zellklone in zwei unabhängigen Experimenten mittels Target-PCR gescreent. Im ersten Experiment wurde mit der Primerkombination tk3'1/CD22IN5AS1 und tk3'-3/1432, und im zweiten mit der Primerkombination tk3'-2/CD22IN5AS2 und tk3'-3/1432 gescreent.

Bei 1900 gescreenten Balb/c-I ES-Zellklonen wurde kein einziges homologes Rekombinationsereignis mittels den genannten Target-PCRs gewonnen.

Daher wurden die Experimente mit der BALB/c ES-Zelllinie zugunsten anderer Target-Experimente mit der E14Tg2a ES-Zelllinie (Kuehn et al.1987) abgebrochen.

3.1.13 Gene Targeting Experimente mit der E14Tg2a ES-Zelllinie

Eine weitere Möglichkeit war durch die ES-Zelllinie E14Tg2a (genetischer Hintergrund 129/ola) (Kuehn et al.1987) gegeben, die zu diesem Zeitpunkt an der Universitätsklinik Würzburg im Labor von Dr. Kai Schuh erfolgreich verwendet wurde (und auch daher bezogen wurde).

Alle Experimente mit der E14Tg2a ES-Zelllinie wurden mit dem verlängerten R130E-Targetvektor (Targetvektor 2), der mit einem 129/ola DNA-Template um 2,3 Kb in 5'-Richtung verlängert wurde, durchgeführt.

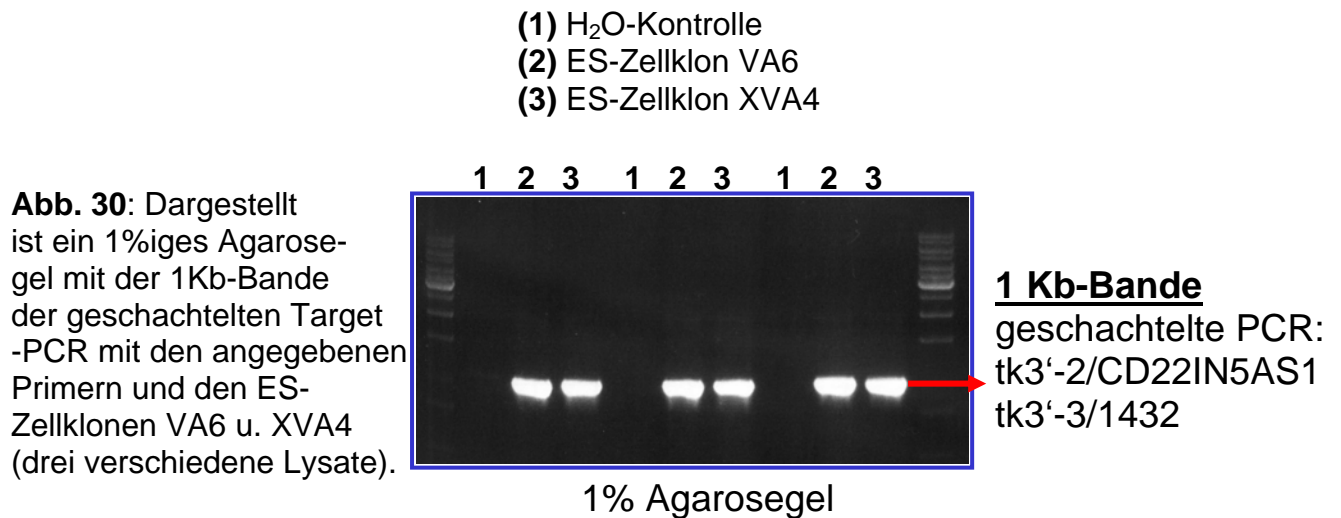
Aufgrund der oben beschriebenen Polymorphismen des Cd22-Gens und der Ergebnisse mit der BALB/c-I ES-Zelllinie wurde vor der Verwendung der E14Tg2a ES-Zelllinie eine vergleichende Sequenzierung von verschiedenen Mausstämmen anhand der Cd22 cDNA-Sequenz von C57BL/6 und BALB/c durchgeführt. In den Exons 4 und 5 existieren vier Nukleotidunterschiede und drei daraus folgende Aminosäuresubstitutionen zwischen C57BL/6 und BALB/c. Mittels dieser Informationen wurden diese Unterschiede durch eine vergleichende Sequenzierung von genomischer DNA der Mausstämmen C57BL/6, 129 und E14Tg2a (129/ola Hintergrund) untersucht. Dabei stellte es sich heraus, daß die E14Tg2a ES-Zelllinie dem C57BL/6 Hintergrund näher verwandt ist als dem BALB/c Hintergrund.

Somit war die E14Tg2a ES-Zelllinie erfolgversprechend und es wurden nun drei verschiedene Gene Targeting Experimente mit den dazugehörigen Bestätigungs-PCRs, Mutations-PCRs, sowie Southern-blots durchgeführt, da erst beim dritten Experiment zwei ES-Zellmutterklone im Southern-blot als korrekt im Sinne eines homologen Integrationsereignisses verifiziert werden konnten. Die einzelnen Gene Targeting Experimente stellten sich wie folgt dar:

Integrationsereignisse nach homologer Rekombination laut Target-PCR-Screen mit tk3'-2/CD22IN5AS1 und tk3'-3/1432 und Southern-blot Analyse

Experiment	Anzahl der gepickten Klone nach G418-Selektion	Anzahl der Target-PCR positiven Klone		Southernblot-positive Klone
		1.PCR	2.PCR	
(1)	730	2	0	0
(2)	650	3	2	0
(3)	830	6	2	2

Von dem letzten Gene Targeting Experiment konnten zwei ES-Zellklone durch eine wiederholte Target-PCR aus drei verschiedenen ES-Zelllysaten späterer Kulturstadien bestätigt werden. Genau diese ES-Zellklone konnten auch im Southern-blot bestätigt werden. Beispiel-PCRs aus diesen drei Kulturstadien sieht man auf dem folgenden Agarosegel:



3.1.14 Southern-blot Ergebnisse von E14Tg2a ES-Zellklonen

Mit allen ES-Zellklonen aus den Gene Targeting Experimenten mit E14Tg2a ES-Zellen wurden, nach abermaliger Bestätigung durch die Target-PCR mit der Primerpaarung tk3'-2/CD22IN5AS1 und tk3'-3/1432, Southern-blots mit allen subklonierten DNA-Sonden angefertigt. Aus den beiden ersten Gene Targeting Experimenten konnten jedoch keine ES-Zellklone mit einer korrekten homologen Integration isoliert werden.

Im Gegensatz dazu konnten, sowohl durch die Target-PCR aus verschiedenen Zellkulturstadien, wie auch durch Southern-blot mit einem BamHI-Verdau und der 1,6 Kb/HindIII-Sonde zwei E14Tg2a ES-Zellklone mit einer einmaligen homologen Integration an der korrekten genomischen Position gewonnen werden. Somit sollte auf einem BamHI-verdauten Southern-blot, wie schon bei den C57BL/6-III Southern-blots, lediglich eine 6 Kb große Wildtypbande und eine 9 Kb große Bande bei einer einmaligen korrekten Integration des Targetkonstruktes zu sehen sein. Diese Banden sind auf dem folgenden Autoradiogramm zu sehen:

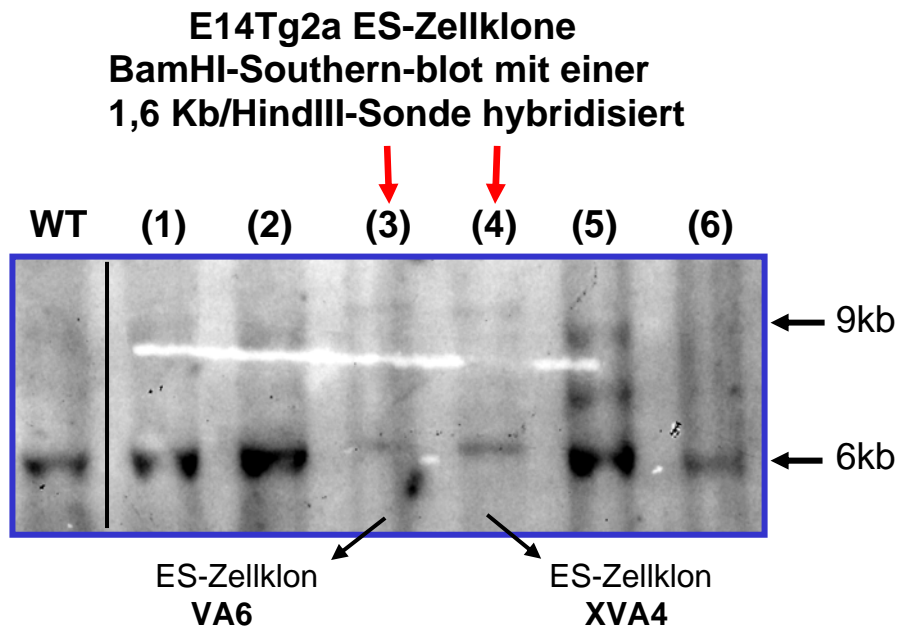


Abb. 31: Autoradiogramm eines Southern-blots von sechs Screen-Target-PCR positiven E14Tg2a ES-Zellklonen und C57BL/6-III wildtypischer DNA BamHI-verdaut. Der Southern-blot wurde mit der 1,6 Kb/HindIII-Sonde hybridisiert. Die Klone VA6 und XVA4 mit korrekter Integration des Targetvektors sind durch rote Pfeile markiert.

Man erkennt anhand des oben gezeigten Southern-blots, daß die E14Tg2a ES-Zellklone VA6 und XVA4 das korrekte wildtypische Fragment (6 Kb groß) und das korrekte Fragment nach homologer Integration der Selektionskassette an der richtigen genomischen Position im CD22-Gen (9 Kb groß) aufweisen. Außer diesen Fragmenten ist innerhalb der gesamten geblotteten Region kein anderes Fragment zu detektieren, dies bedeutet, daß es sich um ein einmaliges Integrationsereignis handelt.

Somit wurden diese E14Tg2a ES-Zellklone durch mehrmalige Screen-Target-PCR, Bestätigungs-PCR aus verschiedenen Zellkulturstadien, Southern-blot und auch hier nicht gezeigte spezifische Mutations-PCR und Sequenzierung der R130E-Mutation mit Hilfe einer für die Selektionskassette spezifischen und geschachtelten PCR bestätigt.

Die E14Tg2a ES-Zellmutterklone VA6 und XVA4 wurden, wie für die C57BL/6-III ES-Zellklone beschrieben, mit dem Cre-Expressionsplasmid pMC-Cre (ein Geschenk aus dem Labor Prof. Michael Sendtner) *in vitro* von der Selektionskassette befreit. Auch in diesem Fall wurden jeweils mindestens zehn Cre-Subklone gewonnen, die durch eine PCR der intronischen Sequenz zwischen Exon 4 und Exon 5 und Restriktionsverdau (EcoRI) in der LoxP-Sequenz verifiziert wurden. Zudem wurden die Cre-Subklone mit G418 (ES-Zellklone sterben ohne Neomycinresistenzgen) und Ganciclovir (ES-Zellklone überleben in Abwesenheit des Tk-Gens) als korrekt bestätigt.

3.1.15 Blastocysteninjektionsexperimente mit der E14Tg2a ES-Zelllinie

Die ersten fünf E14Tg2a ES-Zell Blastocysteninjektionsexperimente wurden direkt mit Cre-Subklonen, welche als von der Selektionskassette deletiert bestätigt waren, der E14Tg2a ES-Zellmutterklone VA6 oder XVA4 durchgeführt. Diese Experimente ergaben jedoch keine chimären Nachkommen. Aus diesem Grund beschlossen wir abermals auf die ES-Zellmutterklone (Passagenzahl 18-20 je nach Mutterklon) direkt zurückzugreifen. Diese ES-Zellklone sind durch das Wegfallen einer zusätzlichen Elektroporation (mit dem Cre-Expressionsplasmid) und einer weiteren Selektionsrunde (mit Ganciclovir) wesentlich weniger belastet und haben zudem eine niedrigere Passagenzahl. Die Nachkommen dieser Tiere mit einer durchlaufenen Keimbahntransmission sollten dann später durch Verpaarung mit einer Cre-deleter Maus in vivo von der Selektionskassette befreit werden. Tatsächlich ergaben gleich die ersten beiden Blastocysteninjektionsexperimente mit den E14Tg2a Es-Zellmutterklonen chimäre Nachkommen. Zu diesem Zeitpunkt der Doktorarbeit hatte unser Labor gemeinsam beschlossen die Blastocysteninjektionen nur noch im eigenen Haus durch Doktor B. Kneitz und im Labor von Prof. M. Sendtner durch Bettina Holtmann durchführen zu lassen. Da alle Blastocysteninjektionen mit C57BL/6-ES-Zellen durch Birgit Ledermann in Zürich zu keinem Ergebnis geführt hatten, beschlossen wir diese Option vorerst nicht mehr wahrzunehmen.

Im Falle der E14Tg2a ES-Zelllinie wurden die ES-Zellen in Blastocysten von C57BL/6 Weibchen injiziert und CD1 Weibchen als Ammenmutter verwendet. Werden die chimären Nachkommen nun mit C57BL/6 verpaart, dann haben deren Nachkommen im Fall einer gelungenen Keimbahntransmission eine agouti (braune) Fellfarbe und im anderen Fall eine schwarze Fellfarbe. Die Ergebnisse aller Blastocysteninjektionen mit E14Tg2a ES-Zellen sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Monat/Jahr	ES-Zellklon	Injektor	Nachkommen	Verpaarung
09.2001	creIE1/P23	B. Kneitz	keine	keine
10.2001	creIIA4/P23	B. Kneitz	keine	keine
11.2001	creIIIE3/P24	B. Kneitz	Amme trächtig	keine
02.2002	creID2/P25	B.Holtmann	keine	keine
02.2002	creID2/P25	B.Kneitz	Amme trächtig	keine
04.2002	creIE1/P24	B.Holtmann	keine	keine
04.2002	XVA4/P18	B.Kneitz	2×Chimäre je ca. 80 %ig (m.+w.)	mit BL/6
10.2002	VA6/P19	B.Holtmann	1×Chimäres 50 %ig (w.)	mit BL/6
10.2002	VA6/P18	B.Kneitz	keine	keine
12.2002	VA6/P20	B.Kneitz	2×Chimäre 70 u. 80 %ig (m.)	mit BL/6

Es traten mindestens zwei Fälle auf, in denen die Ammenmütter zwar trächtig wurden, aber die Embryonen offensichtlich resorbierten. Aus der ersten Injektion mit dem ES-Zellmutterklon XVA4 gingen zwei hochchimäre Tiere (ein Männchen und ein Weibchen) hervor, die aber keinerlei agouti Nachkommen zeugten.

Die anderen drei chimären Nachkommen wurden auch mit C57BL/6 Mäusen verpaart. Aus diesen Verpaarungen des 50 %ig chimären Weibchens (injiziert von Bettina Holtmann) und den beiden 70 und 80 %igen Männchen (injiziert von Burkhard Kneitz) gingen zuerst 21 schwarze Nachkommen (dies bedeutet keine Keimbahntransmission) aus drei Würfen hervor. Aus den nun folgenden Würfen gingen nur aus den Verpaarungen mit dem 80 %ig chimären Männchen einmal sieben und einmal acht agouti (braune) Nachkommen hervor. Dies bedeutet eine erfolgreiche Keimbahntransmission. Nun lag es nahe als erstes Schwanz-DNA dieser Tiere zu präparieren, um dann die zuvor verwendete Target-PCR mit dieser zu wiederholen. Zunächst gab es diverse Probleme mit Kontaminationen dieser DNA. Dann gelang es jedoch aus den ersten agouti Tieren (sieben Stück aus einem Wurf) dieser Serie positive Target-PCR Ergebnisse zu gewinnen.

Diese PCRs wurden mit derselben Primerpaarung wie die für das entsprechende Targetexperiment verwendet durchgeführt: tk3'-2/CD22IN5AS1 und tk3'-3/1432. Die Ergebnisse der ersten sieben getesteten Schwanz-DNAs, sowie abermalige schematische, genomische Positionsangabe der verwendeten Primer, sind den nächsten Abbildungen zu entnehmen.

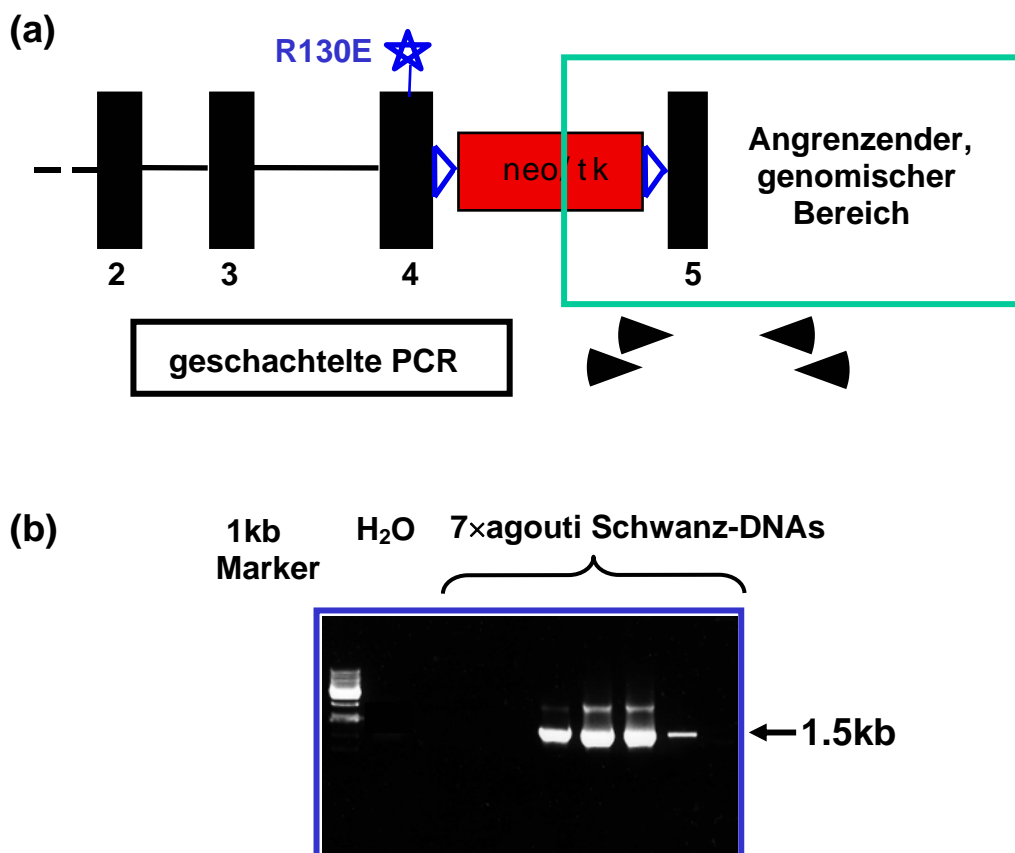


Abb. 32: (a) Schematische Darstellung des 3'-Endes des Targetvektors mit der angrenzenden genomischen Region und Position der verwendeten Targetprimer.

(b) Agarosegel mit Target-PCR Ergebnissen von den ersten sieben agouti Mäusen eines 80 %ig chimären Männchens aus der Injektion mit dem Klon VA6.

Auf der oben gezeigten Abbildung sieht man vier von sieben für die Target-PCR (mit oben angegebener Primerpaarung) positive Mäuse. Im Zuge weitere Test-PCRs mit den acht zusätzlich generierten agouti Nachkommen konnten noch drei weitere Mäuse mit dieser Target-PCR bestätigt werden. Zudem wurde eine spezifische PCR mit internen Primern für das Neomycin-Phosphotransferasegen durchgeführt. Hierbei konnten allerdings nur drei der sieben Target-PCR positiven ES-Zellklone bestätigt werden. Bei weiteren Versuchen diese PCR Ergebnisse zu reproduzieren stellte es sich heraus, daß dies nicht möglich war. Somit ist die Möglichkeit gegeben, daß sich bei den positiven PCR Ergebnissen um Artefakte aufgrund von Kontaminationen handelte. Nach diesen unklaren PCR-Ergebnissen beschloß die mir nachfolgenden Doktorandin Anja Hoffmann, sowohl die F1 Generation, als auch die F2 Generation mit der Primerpaarung tk3'-2/CD22IN5AS1 und tk3'-3/1432 (entsprechend der verwendeten Target-PCR) zu testen. Auch diese PCR Experimente ergaben keine positiven Resultate.

Zudem beschloß Anja Hoffmann nochmals mit Schwanz-DNAs der agouti Tiere den ursprünglichen BamHI Southern-blot (mit der 1,6Kb/HindIII-Sonde) zur Bestätigung der ursprünglichen Mutterklone zu wiederholen (hier nicht gezeigt). Dieser Southern-blot zeigte jedoch nur das 6 Kb wildtypische Fragment bei allen getesteten agouti Tieren.

Als letzter Test wurde von der Technischen Assistentin Carolin Dix ein FACS-Experiment mit Tieren der F2 Generation (vermeintlicher Genotyp: CD22R130E/CD22^{-/-}) durchgeführt. Bei diesem FACS-Experiment wurden Knochenmark- und Milzzellen mit einer α 2,6 Sialinsäure-SA Probe angefärbt, um im Vergleich zu entsprechenden Wildtypzellen die Mutation, die zu einem Bindungsverlust für α 2,6Sialinsäure führen sollte, zu bestätigen. Es war hierbei jedoch kein Unterschied der F2 Generation zu Wildtypmäusen zu sehen.

Aufgrund dieser Ergebnisse trat das erstaunliche Resultat zutage, daß die agouti Nachkommen (nach offensichtlich erfolgreicher Keimbahntransmission) der chimären Männchen aus dem Mutterklon VA6 schließlich doch nicht den Targetvektor an der korrekten genomischen Position trugen.

3.2 Generierung einer SiglecG knock out Maus

Ein weiteres Mitglied der Siglecproteinfamilie, das murine SiglecG (im Labor von Dr. Paul Crocker kloniert), wurde in dieser Arbeit behandelt. In Zusammenarbeit mit dem Labor von Dr. Paul Crocker und seiner Mitarbeiterin Sheena Kerr war die Idee, dieses neue Siglec in vivo durch Generation einer knock out Maus zu untersuchen. Die Strategie für die Gene Targeting Experimente für einen SiglecG knock out basierten zuerst einmal auf der Verwendung der BalbI (Noben-Trauth et al. 1996) ES-Zelllinie (aus BALB/c Mäusen), da hiermit sehr gute Erfahrungen vorlagen, was die Stabilität ihrer Pluripotenz und Keimbahntransmissionspotenzials angeht.

Des weiteren war die nächste Überlegung den Großteil der extrazellulären V-set Ig-Domäne, die die Bindung von SiglecG mit Sialinsäure bewirkt, zu eliminieren. Daher wurde im Labor von Paul Crocker (von Sheena Kerr) auf der Basis des pKStkneoloxp-Vektors ein Kontroll- und ein Targetvektor ausgehend von einer BALB/c-DNA kloniert, letzterer sollte dann für die folgenden Gene Targeting Experimente verwendet werden.

Die Vektoren, die für die Generierung einer SiglecG knock out Maus verwendet wurden, basieren auf dem pKStkneoloxp Vektor. Der pKStkneoloxp Vektor beinhaltet unter Verwendung des Bluescriptvektors pBSKSI das HSV-Tk1-Gen (Herpes Simplex Thymidinkinasegen mit einem HSV-Tk-Promoter), sowie das Neomycinphosphotransferasegen (mit einem Phosphoglycerinkinase-Promoter), welches von zwei LoxP-Sequenzen flankiert wird und eine weitere LoxP-Sequenz wenige Basenpaare entfernt 3' aufwärts besitzt. Vor der Konstruktion der Target- und Kontrollvektoren wurden sämtliche Restriktionsschnittstellen und LoxP-Stellen auf ihre Korrektheit hin sequenziert (Sheena Kerr).

Wie schon für den Fall der CD22/R130E knock in Maus beschrieben, wurde auch hier wieder ein zusätzlicher Kontrollvektor kloniert, um vor dem eigentlichen Targetexperiment eine zuverlässige geschachtelte Kontroll-PCR zu entwickeln.

In diesem Fall des SiglecG knock outs wurde jedoch im Gegensatz zu der Strategie, die bei der CD22/R130E knock in Maus angewandt wurde, die Methode der Positiv-Negativ-Selektion (Mansour et al. 1988) gewählt. Diese Methode stellt sicher, daß ES-Zellklone die das Targetkonstrukt korrekt homolog integriert haben, durch das Vorhandensein des Neomycin-Phosphotransferasegens und Verlust des HSV-Tk-Gens positiv selektioniert (durch G418- und Gancyclovir-Resistenz) werden können. Die ES-Zellklone, welche einer zufälligen Integration unterworfen waren hingegen beinhalten noch beide Selektionskassetten, da diese Art der Integration über die linearisierten Enden des Vektors vonstatten geht, und können somit einer negativen Selektion durch Zugabe von Gancyclovir unterworfen werden, wodurch diese ES-Zellklone sterben.

Um die Bindungsdomäne von SiglecG auf diese Art und Weise zu eliminieren, wurde nun ein Targetvektor konstruiert, der einen kurzen Arm (1,2 Kb) der homologen Rekombination zwischen den beiden Selektionskassetten und einen langen Arm (3,2 Kb) der homologen Rekombination 3' aufwärts der Neomycin-Phosphotransferasegen-Kassette des pKStkneoloxp-Vektors besitzt. Eine

schematische Darstellung dieses Konstruktes im Vergleich zu der SiglecG wildtypischen Situation ist dem folgenden Diagramm zu entnehmen:

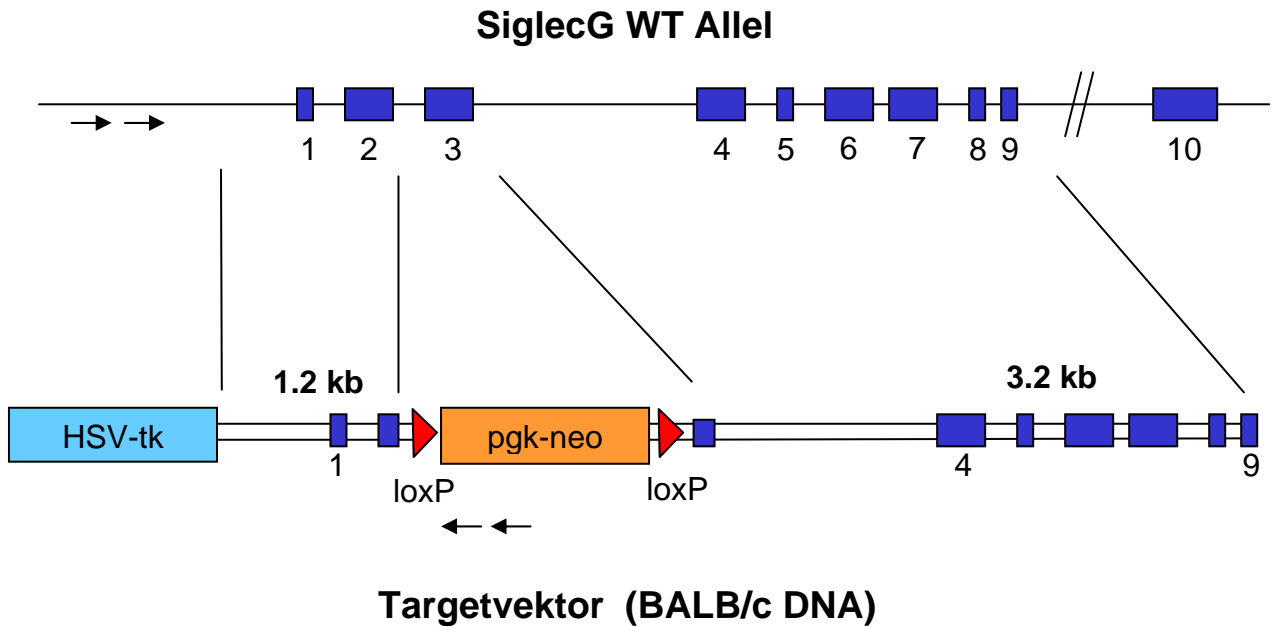


Abb. 33: Schematische Darstellung der SiglecG genomischen und wildtypischen Exon/Intronstruktur. Darunter ist die ebenfalls schematische Abbildung des SiglecG-Targetkonstruktes (von Sheena Kerr, Labor Dr. Paul Crocker, kloniert) mit den beiden Selektionskassetten und LoxP-Sequenzen skizziert. Die Verbindungslinien zwischen den beiden Abbildungen sollen die Orte der homologen Rekombination andeuten.

Der Kontrollvektor zu diesem Targetkonstrukt enthält nur den kurzen Arm der homologen Rekombination (wieder im Basisvektor pKStkneoloxp) nur um ein kurzes Fragment in 5'-Richtung verlängert, um in diesem Bereich geeignete Primer für eine Target-PCR zu finden. Dieses Konstrukt stellt sich schematisch wie folgt dar:

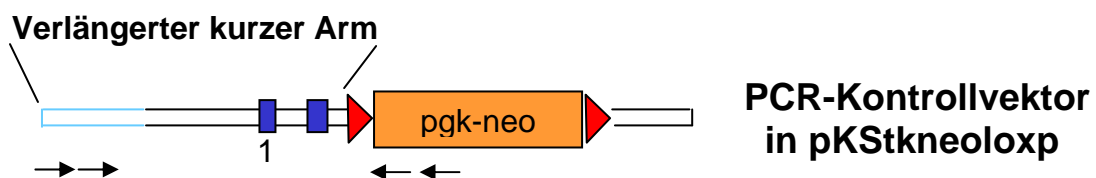


Abb. 34: Schematische Darstellung des SiglecG-Kontrollvektors (von Sheena Keer in pKStkneoloxp kloniert) mit verlängertem kurzen Arm. Die Pfeile deuten die Position der Primer für die Etablierung einer Kontroll-PCR an.

Letztendlich wurde der kurze Arm des Kontrollvektors über XhoI und BamHI in den pKStkneoloxp-Vektor kloniert. Die Korrektheit dieser Klonierung wurde durch verschiedene Restriktionsverdauemuster und Sequenzierung bestätigt.

Es wurden nun jeweils drei Primer für das überhängende Fragment des kurzen Armes und den Phosphoglycerasekinase Promoter des Neomycin-phosphotransferasegens konstruiert. Die Namensgebung und Sequenzen dieser Primer stellen sich von 5' in 3'-Richtung wie folgt dar:

10control5'(1): 5'-CAG TTC TCT GAC TGA AGA GG-3'

10control5'(2): 5'-TGA AGA GGA AGG ACA AGC GG-3'

10control5'(3): 5'-CAA GCG GGG AAC TGT GTT GA-3'

10pgkprom(1): 5'-AAG CGC ATG CTC CAG ACT GC-3'

10pgkprom(2): 5'-CAC TTG TGT AGC GCC AAG TG-3'

10pgkprom(3): 5'-TGG ATG TGG AAT GTG TGC GA-3'

Für die Etablierung einer zuverlässigen Target-PCR wurden nun Balb1 ES-Zellen (Passagenzahl 18) mit dem Kontrollvektor transfiziert (der Kontrollvektor wurde zuvor durch einen NotI-Restriktionsverdau linearisiert). Hierbei wurden dieselben Elektroporationsbedingungen wie für die Transfektionsexperimente mit allen anderen ES-Zelllinien verwendet. Hierzu wurde ein Bio-Rad-Elektroporationsgerät auf 250 V, 500 μ F und $\infty \Omega$ eingestellt, um den Ansatz (10 μ g linearisierter DNA und 5×10^6 ES-Zellen) nach 5 minütiger Inkubationszeit bei RT zu elektroporieren. Nach einer 5 minütigen Ruhephase wurden die ES-Zellen dann in 20 ml ES-Zellmedium aufgenommen. Die ES-Zellen wurden schließlich mit einer Dichte von $2-4 \times 10^4$ pro Zellkulturpetrischale (mit EMFI-Nährschicht) ausplattiert.

Bei diesen Kontrolltransfektion wurden die Zellkulturpetrischalen einen Tag nach der Elektroporation mit G418-ES-Zellmedium (0,4 mg/ml G418) überschichtet. In diesem Fall ist eine zufällige Integration des Kontrollvektors nicht von Bedeutung, da es nur darum geht, ES-Zellklone mit einem in das Genom integrierten Kontrollvektor zu gewinnen. Die ES-Zellen wurden nun acht Tage unter täglichem Medienwechsel selektioniert und dann ca. 50 Einzelklone gepickt und zusätzlich ein Gesamt-ES-Zelllysate aus einer ganzen Zellkulturschale angefertigt. Die Einzelklone und das Gesamtlysate wurden für die nun folgenden Test-PCRs wie in Material und Methoden beschrieben aufgearbeitet.

Mit diesen ES Zell-Lysaten wurden nun verschiedene Test-PCRs durchgeführt, bei denen vorallem die Annealingzeiten und Temperaturen variiert wurden. Mit den drei verschiedenen Primerkombinationen wurden nun alle möglichen Einzel-PCRs und geschachtelten PCRs getestet. Das eingesetzte Templatevolumen betrug bei Einzelklonlysaten 5 μ l und Gesamtlysate 2 μ l. Für Einzel-PCRs wurde das entsprechende Thermocycler-Programm mit 33 Zyklen verwendet. Für die geschachtelten PCRs wurde, wie dann auch später beim „Targetscreens“, die erste PCR-Runde mit 25 Zyklen und die zweite mit 35 Zyklen ausgeführt. Als Template für die zweite PCR wurde ein empirisch als optimal getestetes Volumen von 2,5 μ l aus der ersten PCR-Reaktion eingesetzt. Hier beispielhaft das PCR-Programm mit der Primerkombination, die in der Regel auch für die „Targetscreens“ verwendet wurde:

10control5'(1) und 10pgkprom(3)

37,9	µl ddH ₂ O
5	µl 10 × Reaktionspuffer
1,5	µl dNTPs (100 mM)
1,5	µl 10control5'(1) (60 ng/µl)
1,5	µl 10pgkprom(3) (60 ng/µl)
0,1	µl SuperTaq (HT Biotechnology LTD, England)
2,5	µl DNA-Template

50 µl Gesamtvolumen

Dieser Grundansatz wurde ohne Taq-Polymerase in einem Mastermix für den gesamten Screen pipettiert (in einem Falconröhrchen) und dann in 10er-Ansätzen in Eppendorfreaktionsgefäße. Erst jetzt wurde SuperTaq (HT Biotechnology LTD, England) hinzugegeben, da sich diese Vorgehensweise als effizienter und sicherer für das Gelingen der PCR mit einem so großen Ansatz erwies.

Die PCRs wurden in einem Biometra PCR-Cycler mit dem folgendem Programm durchgeführt:

94 °C	5 min.	Vordenaturieren
94 °C	45 s	Denaturieren
55 °C	45 s	Annealing
72 °C	60 s	Extension
→ 25	Zyklen	
72 °C	4 min.	Final Extension

Aus diesem ersten PCR-Ansatz wurde die zweite geschachtelte Reaktion wie folgt durchgeführt (der Mastermixansatz wurde wie beschrieben angesetzt):

37,9	µl ddH ₂ O
5	µl 10 × Reaktionspuffer
1,5	µl dNTPs (100 mM)
1,5	µl 10control5'(3) (60 ng/µl)
1,5	µl 10pgkprom(1) (60 ng/µl)
0,1	µl SuperTaq (HT Biotechnology LTD, England)
2,5	µl aus der ersten PCR-Reaktion

50 µl Gesamtvolumen

Diese PCR-Reaktion wurde mit demselben Programm wie die erste PCR ausgeführt, nur statt mit 25 Zyklen mit 35 Zyklen.

Exemplarisch sieht man auf dem folgenden Agarosegel Einzel- und geschachtelte PCRs mit leicht variierenden Annealingtemperaturen, aber jeweils korrekter Bandengröße. Die korrekten Fragmentgrößen der Einzel-PCRs sind jeweils ca. 1,3 Kb.

Test-PCRs mit Kontrollvektor transfizierten ES-Zelllysaten

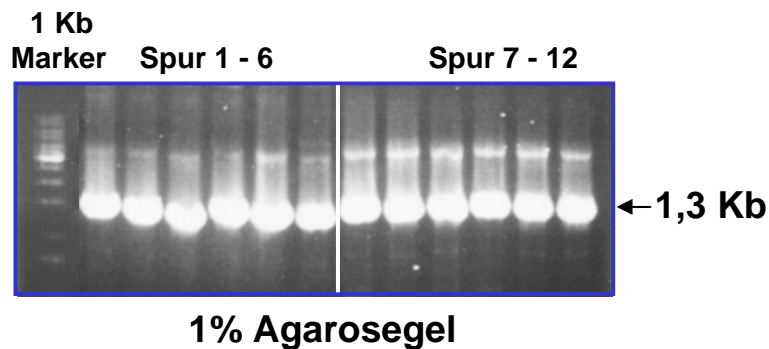


Abb. 35: Darstellung eines Agarosegels mit Test-PCRs für mit dem SiglecG Kontrollvektor transfizierten ES-Zelllysaten (Erklärung der einzelnen Spuren im folgenden Text).

Mit allen drei Primerkombinationen (mit oben angegebenen Primern) wurden zuerst Einzel-PCRs von der äußeren bis zur inneren Primerkombination durchgeführt. Die Gelspuren 1-6 zeigen diese Ergebnisse einmal mit 55 °C (Spur 1-3) und mit 58 °C (Spur 4-6) Annealingtemperatur. Daraufhin wurde aus der äußeren PCR die geschachtelte PCR etabliert. Auf den Spuren 7 und 8 sieht man die mittlere Primerkombination, und auf den Spuren 9-12 die innere Primerkombination jeweils als geschachtelte PCR. Man kann somit diesem Agarosegel die Funktionalität der verschiedenen Primerkombinationen entnehmen.

3.2.1 Gene Targeting Experimente mit der Balb1 ES-Zelllinie

Für die eigentlichen Gene Targeting Experimente wurde die Balb1 ES-Zelllinie (Noben-Trauth et al. 1996) (Passagenzahl 18) aufgetaut und über zwei Passagen hinweg auf eine Fläche von zwei 175 cm² Zellkulturflaschen expandiert. Alle verwendeten Zellkulturflächen waren mit inaktivierten (durch Mitomycin C) embryonalen Fibroblasten (EMFIs) bewachsen. Diese große Anzahl von ES-Zellen für die eigentliche Targetvektor Elektroporation ergab sich aus der Empirie mit der Balb1-ES-Zelllinie, die besagt, daß für diese Art von Experimenten diese große Anzahl (mind. 1×10^8 ES-Zellen) von Balb1 ES-Zellen einzusetzen sind, um genügend ES-Zellklone nach einer Doppelsektion mit G418 und Gancyclovir zu erhalten.

Vor der Elektroporation wurden 30 µg des vorher durch Restriktionsanalysen bestätigten Targetvektors mit der Restriktionsendonuklease NotI linearisiert. Hierzu wurde ein Bio-Rad-Elektroporationsgerät auf 250 V, 500 µF und $\infty \Omega$ eingestellt, um den Ansatz nach 5 minütiger Inkubationszeit bei RT so zu elektroporieren. Nach einer 5 minütigen Ruhephase wurden die ES-Zellen dann in 20 ml ES-Zellmedium aufgenommen. Die ES-Zellen wurden schließlich mit einer Dichte von $2-4 \times 10^4$ pro Zellkulturpetrischale (mit EMFI-Nährschicht) ausplattiert. Nach einer eintägigen Regeneration wurden die Zellkulturpetrischalen 10 Tage lang einer Doppelsektion mit G418 und Gancyclovir unterzogen (mit täglichen Medienwechsel). Laut der ursprünglichen Publikation von Mansour et al. sollte mit der Methode der Positiv-Negativ Selektion eine bis zu 2000-fache Anreicherung für korrekt getargete ES-Zellklone möglich sein. Es zeigte sich jedoch, daß diese Werte von anderen Arbeitsgruppen (z.B. am MPI für Immunologie in Freiburg) nie erreicht werden konnten. Auf jeden Fall sollten laut Theorie nach einer Doppelsektion von so langer Zeitdauer vor allem ES-Zellklone überleben, die das Neomycinphosphotransferasegen integriert haben und das HSV-Thymidinkinasegen verloren haben. Zur Berechnung der Anreicherung von korrekt getargeten ES-Zellklonen in dieser Art von Experimenten benötigt man eine Zellkulturschale, die nur mit G418 Medium kultiviert wird. Die Anzahl der G418 resistenten ES-Zellklone dividiert durch die Anzahl an ES-Zellklonen auf einer Zellkulturschale unter Doppelsektion ergibt den Anreicherungsfaktor. Bei den von mir durchgeführten Targetexperimenten mit dem SiglecG Targetvektor lag dieser Anreicherungsfaktor bei 20.

Es wurden zwei größere Gene Targeting Experimente mit der Balb1 ES-Zelllinie und dem SiglecG Targetvektor durchgeführt, die nach genau demselben hier beschriebenen Schema durchgeführt wurden. Einmal wurden nach der Doppelsektion 480 und einmal 600 ES-Zellklone auf 48-well Platten (mit inaktivierten EMFIs bewachsen) gepickt. Diese ES-Zellklone wurden wie in Material und Methoden beschrieben (M. u. M. 2.6.9) für die nun folgende geschachtelte Target-PCR aufbereitet. Ein Beispiel für eines der Agarosegele mit einem positiven geschachtelten Target-PCR Ergebnis sei hier gezeigt:

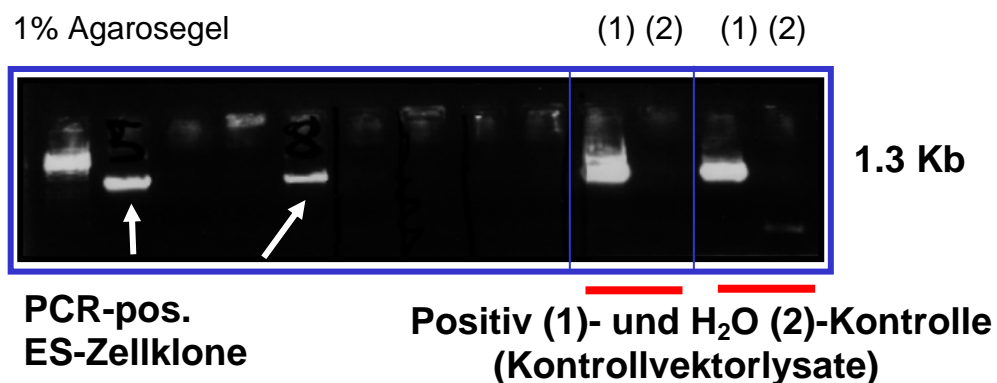


Abb. 36: Darstellung eines 1 %igen Agarosegels eines geschachtelten Target-PCR Screens. Auf der linken Seite sind zwei für die Target-PCR positive Balb1 ES-Zellklone zu sehen. Rechts sind jeweils zwei H₂O (2) und positiv (1) Kontrollen aus Kontrollvektorlysaten zu sehen.

Alle geschachtelten Target-PCRs wurden mit den Primerkombinationen 10control5'(1) und 10pgkprom(3), sowie 10control5'(3) und 10pgkprom(1) durchgeführt. Das dafür verwendete Thermocyclerprogramm und die PCR-Ansätze sind wie oben aufgeführt eingesetzt worden.

Bei dem Experiment mit 480 gepickten ES-Zellklonen wurden somit 15 ES-Zellklone mit der Target-PCR gewonnen. Von diesen Klonen konnte jedoch keiner mit einer weiteren PCR, gleich mit welcher Primerkombination, aus darauffolgenden Zellkulturstadien dieser ES-Zellklone verifiziert werden. Aus diesem Grund wurde das zweite Targetexperiment mit diesmal 600 gepickten ES-Zellklonen durchgeführt. In diesem Fall konnten beim ersten Targetscreen mit derselben Primerkombination und Experimentparametern 27 ES-Zellklone gewonnen werden.

Von diesen 27 ES-Zellklonen konnten mit einer zweiten Bestätigungs-PCR aus einem späteren Zellkulturstadium sieben ES-Zellklone mit der Target-PCR abermals verifiziert werden. Diese sieben ES-Zellklone sind auf dem nächsten Agarosegel zu sehen:

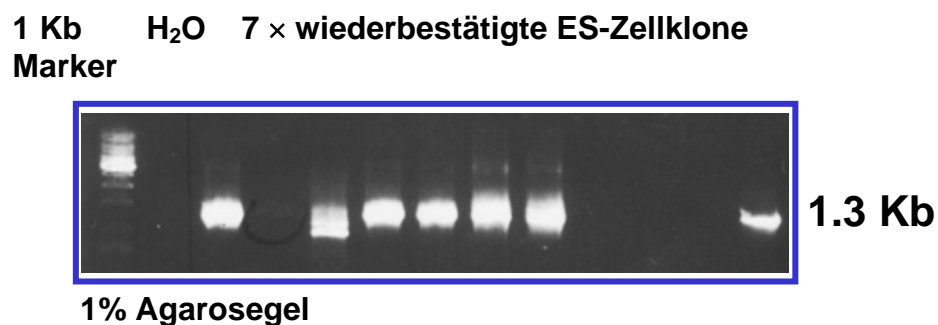


Abb. 37: Abbildung eines 1 %igen Agarosegels mit sieben Balb1 ES-Zellklonen, die mit der Target-PCR (aus einem späteren Zellkulturstadium) wiederbestätigt wurden.

In diesem Fall wurde auf eine positiv Kontrolle verzichtet, um jegliche Kontamination der PCR-Ergebnisse zu vermeiden. Aus diesem Grund ist auf dem oben gezeigten Agarosegel nur eine H₂O negativ Kontrolle und keine positiv Kontrolle zu sehen.

Die schnellste und zuverlässigste Methode nun eine korrekte homologe Integration eines ES-Zellklones festzustellen ist die Durchführung eines Southern-blots. Zu diesem Zweck wurden die sieben entsprechenden Balb1 und mehrere negative ES-Zellklone bis auf eine Zellkulturfläche von 175 cm² weiterkultiviert. Bei jeder neuen Passage wurde ein genügend großer Teil der ES-Zellen weggefroren. Von einer 80 cm² Zellkulturfläche mit 0,5 % Gelatine beschichtet (zur Reduzierung des EMFI-Anteils) wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, genomische ES-Zell-DNA angefertigt, die für die Southern-blots verwendet wurde.

3.2.2 Bestätigung der Target-PCR positiven ES-Zellklone mittels Southern-blot

Zur Entwicklung einer geeigneten Southern-blot Strategie gehört die Wahl eines geeigneten Restriktionsverdau und einer außerhalb des Targetvektors positionierten (externen) DNA-Sonde. Im Fall des SiglecG Gens und des SiglecG-Targetvektors boten sich hier zwei Restriktionsendonukleasen für den genomischen Verdau an: EcoRI und PstI. Für die ersten Souther-blots wurde ein EcoRI-Restriktionsverdau gewählt. Die Position der angesprochenen Restriktionsschnittstellen innerhalb der wildtypischen SiglecG Sequenz und der Targetvektorsequenz sieht wie folgt aus:

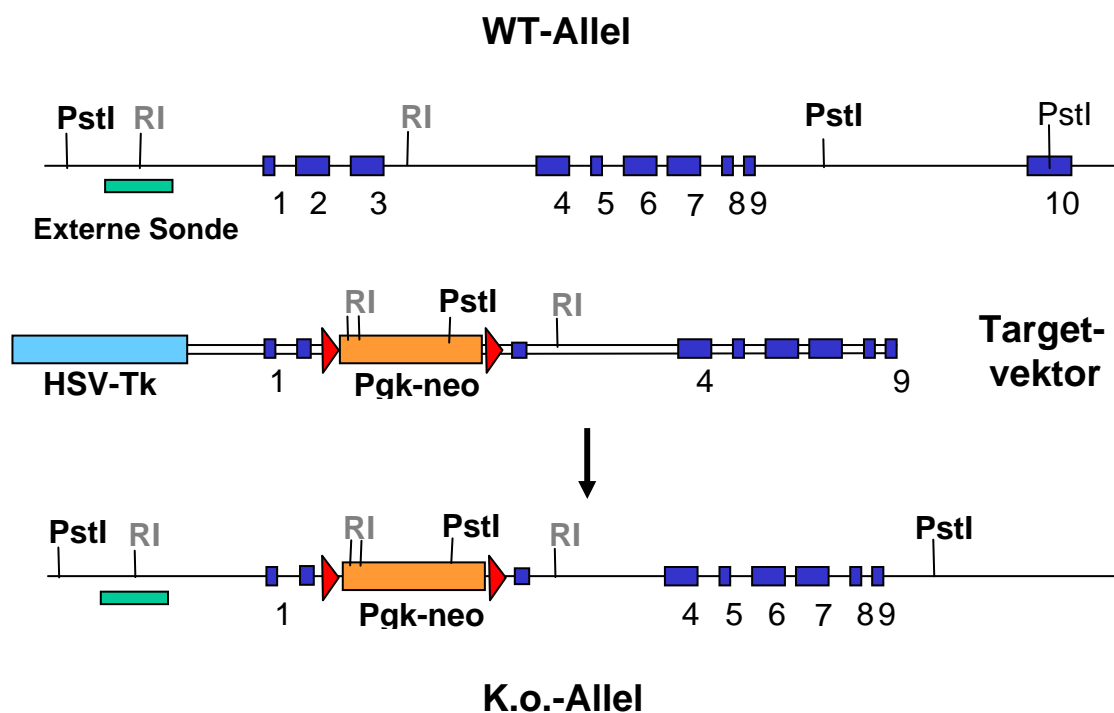


Abb. 38: Darstellung der SiglecG genomischen, wildtypischen Sequenz, des SiglecG Targetvektors und des K.o. Allels. Vermerkt sind die Positionen der Restriktionsschnittstellen für EcoRI (RI) und PstI (PstI), sowie die Lage der externen DNA-Sonde (als grüner Balken).

Bei der Analyse zu den EcoRI-Restriktionsschnittstellen des SiglecG Gens und des Targetvektors ergab sich ein 3,45 Kb großes Wildtypfragment und ein 2,9 Kb großes spezifisches k.o. Allel Fragment.

Für die Wahl einer DNA-Sonde, die außerhalb der Targetvektorsequenz liegt, aber das errechnete EcoRI K.o. Fragment detektieren kann kam nur die genomische Region 5' aufwärts der Targetvektorsequenz in Frage. Aufgrund repetitiver Sequenzen, die direkt 5' aufwärts der Targetvektorsequenz liegen, blieb nur eine sehr kurze Sequenz bis zur nächsten EcoRI-Schnittstelle (Bp 5141 der genomischen Wildtypsequenz) übrig. Hier wurden zwei Primer ausgesucht, um von einer vorhandenen genomischen Sequenz (in den Bluescript-Vektor KSII kloniert) eine

genomische Sonde durch eine PCR zu gewinnen. Die Sequenz dieser beiden Primer setzt sich wie folgt zusammen:

Sonde5': 5'-TCG AGG TAG TGG ATA GAT ACG ATC AGT GTA CAT TG-3'

Sonde3': 5'-GTG TGT TCG TGC ATA TAA GTG TAG CTG TAG CTG CCC T-3'

Mittels dieser Primer wurde ein reproduzierbares, sauberes 568 Bp großes DNA-Fragment (Bp 4842-5410 der wildtypischen genomischen Sequenz) als Grundlage für eine genomische radioaktive DNA-Sonde gewonnen. Diese Sonde wurde, wie in Material und Methoden beschrieben durch Random-Priming mit dem Radioisotop α -P³² radioaktiv markiert. Die eigentlichen Southern-blot Experimente wurden auf die klassische schon in dieser Arbeit beschriebene Methode durchgeführt. Aufgrund der ursprünglichen Theorie wurden von den sieben oben erwähnten durch eine Bestätigungs-PCR verifizierten Balb1 ES-Zellklonen mehrere EcoRI-Southern-blots angefertigt. Es konnte jedoch auf keinem dieser Southern-blots andere Fragmente als die wildtypischen detektiert werden. Ein Beispiel eines solchen Ergebnisses sei hier gezeigt:

EcoRI Southern-blot von Target-PCR positiven SiglecG getargeten Balb1 ES-Zellklonen

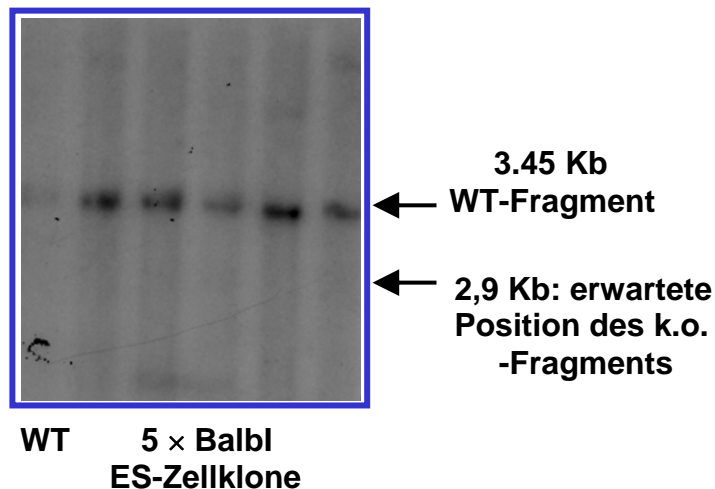


Abb. 39: Darstellung eines EcoRI Southern-blots von fünf Balb1 ES-Zellklonen, die mehrfach durch Target-PCRs aus verschiedenen Zellkulturstadien bestätigt wurden.

Man erkennt auf dem oben gezeigten EcoRI Southern-blot sehr gut das erwartete 3,45 Kb große Wildtypfragment (relativ schwache wildtypische Positivkontrolle ganz links). Es sind allerdings keinerlei Fragmente in der Region des berechneten K.o. Allels zu sehen. Dieses exemplarische Ergebnis war bei allen angefertigten Southern-blots der sieben Target-PCR positiven ES-Zellklone gleich.

Alle angefertigten EcoRI Southern-blots wurden zudem (nachdem die alte zuvor verwendete Sonde gewaschen worden war) mit der schon erfolgreich für das CD22R130E knock in-Projekt verwendeten Neomycinphosphotransferasegen-Sonde hybridisiert. Doch auf diesen Southern-blots war keinerlei Signal auf dem

Autoradiogramm für die Neo-Selektionskassette zu identifizieren (hier nicht gezeigt). Somit konnte mit der EcoRI Strategie kein ES-Zellklon mit einer korrekten homologen Integration des SiglecG Targetvektors isoliert werden.

Dieses Projekt wurde nach der Beendigung meiner praktischen Arbeit von der mir nachfolgenden Doktorandin Anja Hoffmann, basierend auf den von mir durchgeführten existierenden Vorarbeiten, weiterverfolgt. Von ihr wurden mit aus neuen SiglecG Targetexperimenten gewonnenen Balb ES-Zellklonen (gemeinsame Arbeiten von Dr. Lars Nitschke, Carolin Dix und Anja Hoffmann) PstI Southern-blots laut oben erwähnter Theorie durchgeführt. Von den durch aus verschiedenen Zellkulturstadien durch die Target-PCR verifizierten ES-Zellklonen konnten durch diese PstI Southern-blots zwei Balb ES-Zellklone mit einer korrekten homologen Integration des SiglecG Targetvektors detektiert werden. Die erfolgreiche Durchführung dieses Targetexperiments zeigte, daß die ursprüngliche Targeting-Strategie mit dem von mir verwendeten Targetvektor und der „Screening-PCR“ funktionierte.

Diese zwei positiven ES-Zellklone mit der Bezeichnung 9B6 und 4E1 wurden nun für die nachfolgenden Blastocysteninjektionen herangezogen. Die Blastocystenisolierungen, die Blastocysteninjektionen und die Transfers in die Leihmütter wurden von Dr. Burkhard Kneitz und seiner Technischen Assistentin Martina Döhler durchgeführt.

Alle ab diesem Zeitpunkt durchgeführten Experimente wurden nach Beendigung meiner praktischen Arbeit als Projekt von Anja Hoffmann durchgeführt.

3.2.3 Überblick über Blastocysteninjektionsexperimente und Ergebnisse

Die Balb ES-Zellklone (BALB/c entspricht einer weißen Fellfarbe) wurden in C57BL/6 Blastocysten (C57BL/6 entspricht einer schwarzen Fellfarbe) injiziert und diese Blastocysten in CD1 (weiße Fellfarbe) Leihmütter transferiert. Alle auf diese Art durchgeführten Experimente mit den Balb ES-Zellklonen 9B6 und 4E1 führten bis zum Februar 2004 zu 15 chimären Nachkommen. Der Ausgang der weiteren Experimente war zu diesem Zeitpunkt noch nicht absehbar. Diese chimären Tiere werden nachfolgend mit BALB/c Tieren verpaart, um schließlich die Keimbahntransmission zu erzielen (dann vollkommen weiße Tiere).

Zudem wurden schon Expressionsexperimente (FACS-Experimente) mit einem neu generierten polyklonalen Schaf-anti-Siglec Antikörper (aus dem Labor von Dr. Paul Crocker) durchgeführt. Es zeigte sich, daß SiglecG auf pro, pre, unreifen und reifen B Zellen exprimiert wird. Zudem auf transitionellen B-Zellen Typ1 und Typ2, sowie CD4 und CD8 T-Zellen in der Milz. Nicht exprimiert hingegen wird SiglecG auf CD4, CD8, doppelt negativen, oder doppelt positiven T-Zellen im Thymus, wie auch nicht auf Granulozyten und Monozyten.

Außerdem wurde damit begonnen funktionale Assays zu testen, zum Beispiel, ob SiglecG den Calciumfluß von B-Zellen beeinflussen kann. Bei diesen Experimenten trat bisher jedoch kein Unterschied bei der Verwendung des polyklonalen anti-Siglec

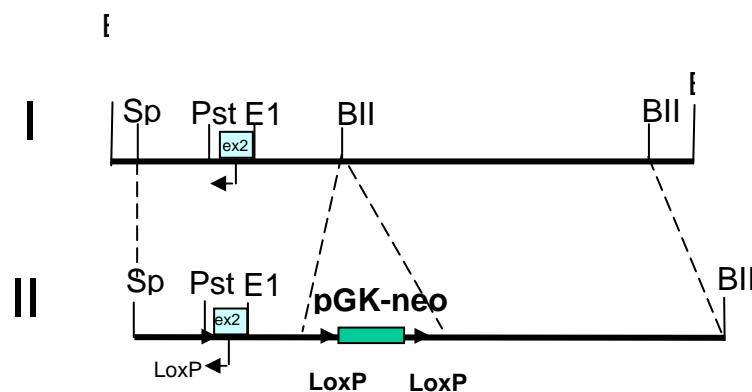
Antikörpers zu Tage. Weitere Experimente, die zum Beispiel den Calciumfluß und Phosphoylierungsmuster der ITIM-Motive von SiglecG nach B-Zellstimulierung betreffen werden weiterhin von Anja Hoffmann bearbeitet werden.

3.3 Generierung einer B-Zell spezifischen SMAD2 k.o. Maus

3.3.1 Gene Targeting- und Southern-blotstrategie

Ein weiteres Projekt der Doktorarbeit wurde gemeinsam mit Dr. Burkhard Kneitz durchgeführt, auf dessen Vorarbeiten die weiterführenden Experimente basierten. Die grundlegende Idee bestand darin den TGF- β (Transforming growth factor)/SMAD2 Signalweg im Immunsystem, und speziell in B-Zellen, zu untersuchen. Da Dr. Burkhard Kneitz Zugang zu einer Smad2/Exon2 geflochten Maus (Leihgabe von von Erwin Böttiger, Raju Kucherlappati) besaß, war die Möglichkeit gegeben, diese in vivo mit einer CD19-Cre Maus (Rickert und Roes 1995;1997) zu kreuzen, um eine B-Zell spezifische k.o. Maus zu generieren. Das Gene Targeting, um die SMAD2/Exon2 geflochte Maus zu generieren, und die Theorie über das in vivo Kreuzen mit der CD19-Cre Maus sieht dabei wie folgt aus:

Genomische Organisation des Smad2-Locus in der Exon2 Region



Smad2 Targetvektor (Smad2loxP)

Abb. 40: Schematische Darstellung des Smad2-Locus in der Exon2 Region (I) und der Veränderung zu einem Targetvektor (II) mit drei LoxP-Sequenzen und Neomycinphosphotransferasegen-Selektionskassette (mit einem pGK-Promoter). Der Targetvektor wurde aus genomischer 129/ola DNA generiert und das Gene Targeting mit der WW6 ES-Zelllinie durchgeführt.

Der Targetvektor (aus 129/ola DNA) wurde nach einem Gene Targeting mit der WW6 ES-Zelllinie (75% 129/Sv, 20% C57BL/6, 5% SLJ) (Ioffe et al. 1995) in vitro über Cre-Transfektion deletiert, so daß nur ein geflochtenes Exon2 ohne Selektionskassette übrigblieb. Mit diesen ES-Zellklonen wurden C57BL/6 Blastozysten injiziert und nach Rückkreuzung der F1-Generation eine geflochte Smad2 Maus (mit einem C57BL/6-III/129ola Hintergrund) generiert. Diese wurde mit einer CD19-Cre Maus gekreuzt. Somit entstand eine B-Zell spezifische SMAD2 k.o. Maus (bSmad2^{-/-}). Die CD19-Cre Maus (Rickert et al. 1997), die nur einem mutiertes Allel besitzt (also hemizygoten Tiere), exprimiert cre unter Kontrolle des B-Zell spezifischen endogenen CD19-Gens (Zhou et al. 1991). Wird diese Maus mit einer

anderen Maus gekreuzt, die eine LoxP flankierte Sequenz im Genom trägt, wird diese mit einer Effizienz von bis zu 95 % (bei Milzzellen) deletiert (Rickert et al. 1997). Diese Strategie die Rolle des TGF- β Signalmediators SMAD2 zu untersuchen ergab sich auch aus der Tatsache, daß die SMAD2 knock out Mäuse (Weinstein et al. 1998; Heyer et al 1999) schon im Embryonalstadium lethal sind.

Smad2 Targetvektor

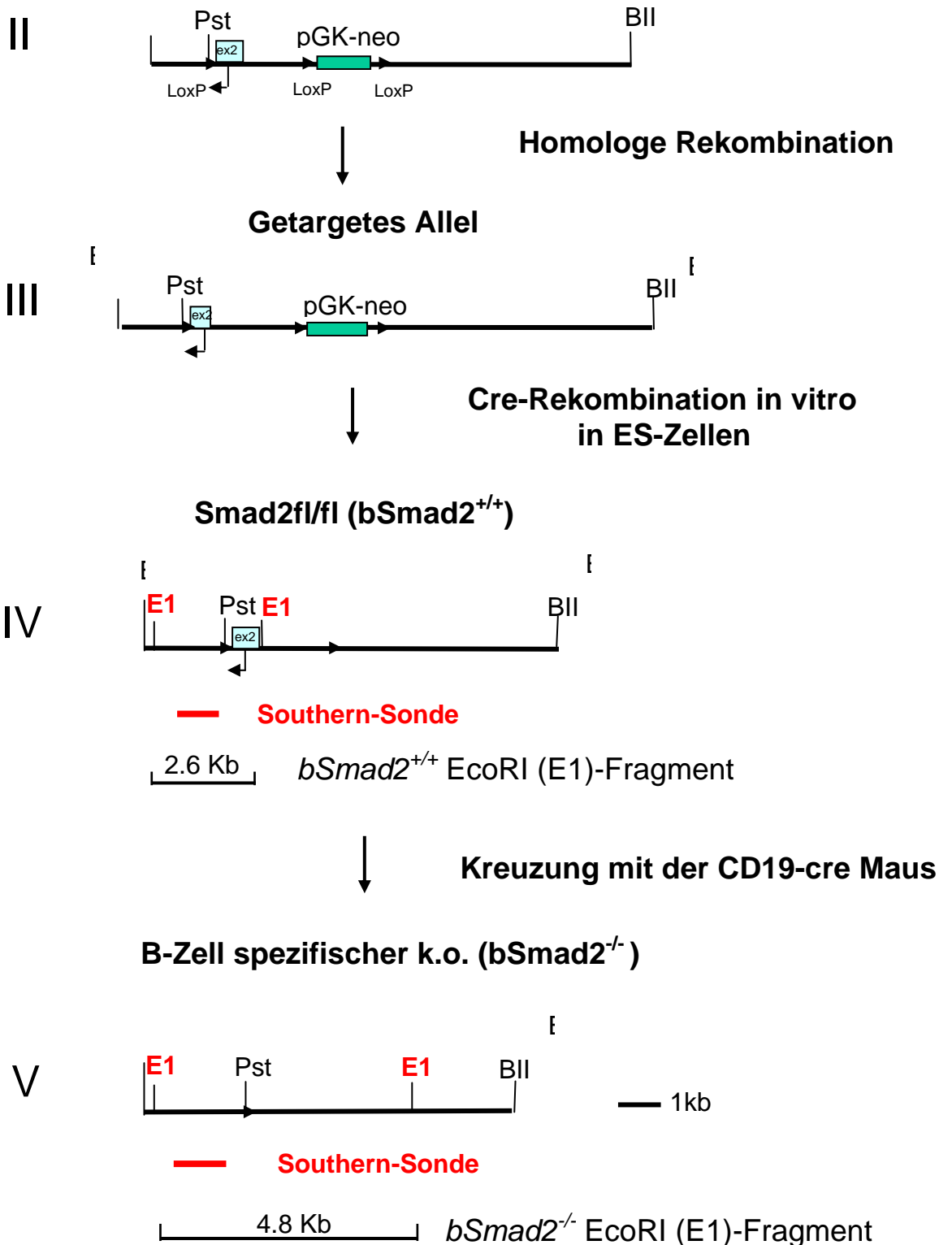


Abb. 41: Schematische Darstellung der Ereignisse des Gene Targeting mit dem Smad2 Targetvektor (II) und Generierung der B-Zell spezifischen Smad2 k.o. Maus ($bSmad2^{-/-}$, durchgeführt von Dr. B. Kneitz). In IV und V ist die genomische DNA-Sonde zur Verifizierung der $bSmad2^{-/-}$ Tiere eingezeichnet und darunter die Fragmente, die in einem EcoRI-Southern-blot zu erwarten sind.

Anhand des folgenden Southern-blots sieht man den Grad der Smad2 Deletion der $bSmad2^{-/-}$ Tiere in vier unterschiedlichen Zellpräparationen. Zu sehen sind das wildtypische 2,6 Kb Fragment und das 4,8 Kb $bSmad2^{-/-}$ (B-Zell spezifischer knock out) Fragment. Mittels Abschätzung kann man diesem Southern-blot eine ca. 90 %ige Deletion von Smad2 in den beiden unabhängigen B-Zellpräparationen entnehmen. Aufgrund der B-Zellspezifität durch die Kreuzung mit der CD19-cre Maus ist die Deletion nicht in der T-Zellpräparation zu sehen (Spur2). In der gemischten Zellpopulation der Milz sind beide Banden zu sehen aufgrund der Existenz von T- und B-Zellen.

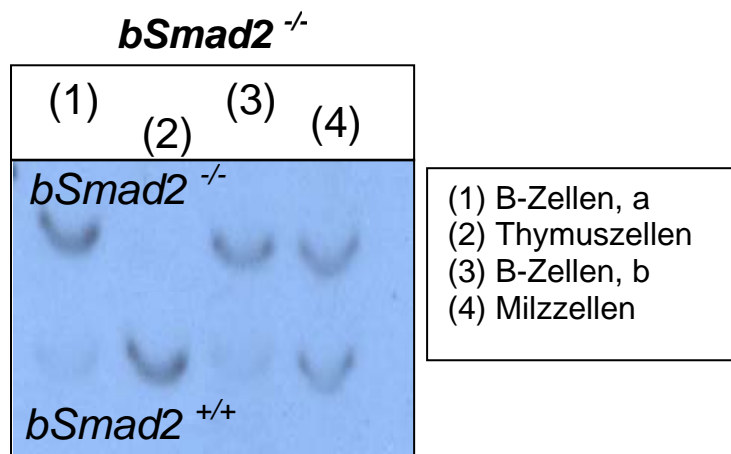


Abb. 42: EcoRI-Southern-blot mit genomischer DNA von zwei unterschiedlichen B-Zell- (1 und 3), einer Gesamthymuszellen- (2) und einer Gesamtmilzzellen- (4) Präparation aus $bSmad2^{-/-}$ Mäusen (durchgeführt von Dr. B. Kneitz).

Um zu zeigen, daß das Smad2 Protein in den $bSmad2^{-/-}$ Tieren nicht exprimiert wird wurde als funktionaler Assay ein Western-Blot mit LPS/ TGF- β stimulierten Milzzellen von $bSmad2^{+/+}$ und $bSmad2^{-/-}$ Tieren durchgeführt.

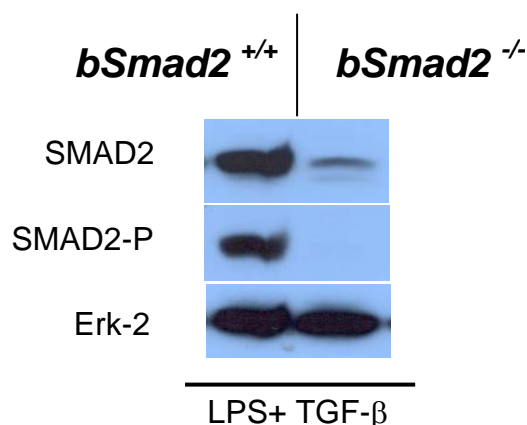


Abb. 43: Westernblotanalyse mit Milzzellen von Kontroll- und k.o. Tieren, die zuvor jeweils LPS (Lipopolysaccharid) und TGF- β stimuliert wurden. Die Membran wurde nacheinander mit Antikörpern gegen SMAD2 und Phospho-SMAD2 behandelt. Als Protein-Ladekontrolle wurde die Membran mit einem AK gegen Erk-2 gefärbt (durchgeführt von Dr. B. Kneitz).

3.3.2 Proliferationsassays

Schon seit Mitte 1980 ist bekannt, daß TGF- β die Fähigkeit besitzt die Proliferation von aktivierten Lymphozyten zu hemmen (Kehrl et al. 1986; 1989; 1991). Diesen Untersuchungen zeigten auch, daß TGF- β die Proliferation von B-Zellen inhibieren kann. Aus diesem Grund testete Dr. B. Kneitz mit einem Thymidin-Proliferationsassay die inhibierende Wirkung von TGF- β auf von T-Zellen getrennten und durch LPS (Lipopolysaccharid) aktivierte B-Zellen aus der Milz und den Peyerschen Plaques von Kontrolltieren und $bSmad2^{-/-}$ Tieren.

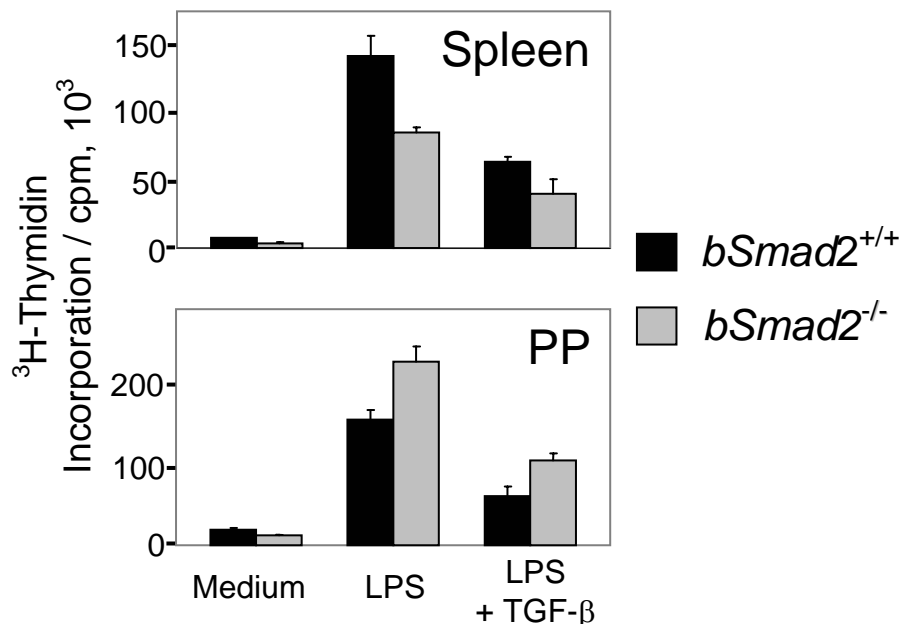


Abb. 44: Darstellung des Säulendiagramms eines Thymidinproliferationsassays. Angegeben ist die Thymidineinlagerung in cpm (counts per million). Die angegebenen Werte sind mit 10^3 zu multiplizieren. Man sieht aufgereinigte Milz und Peyersche Plaque Zellen. Analysiert sind Medienkontrollen, LPS stimulierte Zellen, und LPS und TGF- β stimulierte Zellen.

Man erkennt bei Kontroll- und $bSmad2^{-/-}$ Mäusen sowohl in der Milz, als auch den Payerschen Plaques eine deutliche Inhibition der B-Zellproliferation bei Zugabe von TGF- β . Sogar der Unterschied in der Proliferationstendenz der LPS-Stimulationen wird hierbei beibehalten.

3.3.3 FACS-Analyse von B-Zellpopulationen

Mit klassischen FACS-Anfärbungen der peripheren Zellpopulationen in Lymphknoten (LN), wie auch im Knochenmark (BM) zeigte sich keine Veränderung in der B-Zellfrequenz bei $bSmad2^{-/-}$ Mäusen. Diese Angaben beziehen sich auf pro-B Zellen ($CD43^+$, $B220^+$, IgM^-), pre-B Zellen ($CD43^-$, $B220^+$, IgM^-), unreife B Zellen (IgM^+B220^{lo}) und reife B Zellen (IgM^+B220^{hi}). Doch bei weiteren Analysen der $bSmad2^{-/-}$ Tiere zeigten sich klare Veränderungen dieser Tiere im Vergleich zu Kontrolltieren (wenn nicht angegeben immer $bSmad2^{+/+}$ Mäuse).

Es wurden unter anderem Zellpopulationen der Peyerschen Plaques (engl. Payer's Patches; PP), wie auch des Peritoneums (engl. peritoneal cavity; PC) untersucht. Aus den Daten der Arbeit über die B-Zell spezifische TGF- β -Rezeptor Typell knock out Maus (Cazac und Roes 2000) war bereits bekannt, daß in verschiedenen B-Zellpopulationen dieser beiden Organe (PP und PC) deutliche Veränderung zutage treten. Die Gesamtzellzahlen der untersuchten Organe sind vorab in der nächsten Graphik zu sehen (Durchschnitt aus jeweils sechs verschiedenen Tieren).

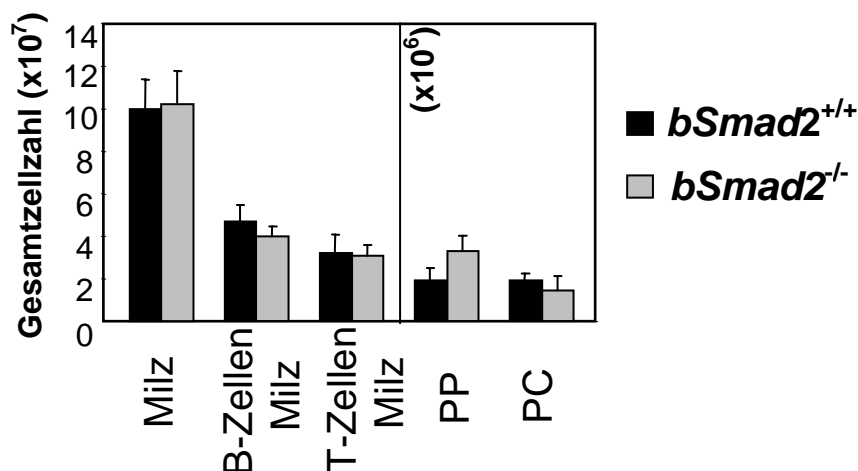


Abb. 45: Darstellung der Gesamtzellzahlen der Milz, PP und PC, sowie B-Zellen und T-Zellen in der Milz. Der Durchschnitt und die Standardabweichung beziehen sich auf $n=6$.

Hierbei ist festzustellen, daß die Gesamtzellzahlen zwischen den Vergleichsgruppen kaum Unterschiede aufweisen. Ausgenommen davon sind lediglich die Zellen der Peyerschen Plaques. Bei der Analyse der Zellen der Peyerschen Plaques fiel schon im Forward Scatter der FACS-Experimente auf, daß ein Großteil der Zellen eine Hyperplasie aufwies. Bei einem Vergleich der absoluten B-Zellzahlen in den Peyerschen Plaques durch FACS-Anfärbung mit anti-B220 sieht man bei den $bSmad2^{-/-}$ Mäusen eine circa um das dreifache erhöhte Anzahl von B-Zellen (Abb. 46). Dieses Phänomen ging einher mit einer erhöhten Anzahl aktivierter B-Zellen, was deutlich wird in einer FACS-Anfärbung mit anti-B220 und zusätzlich mit anti-IgM und anti-IgD (Abb. 47).

Abb. 46: Absolute Zellzahl B220+ Zellen der PP von $bSmad2^{+/+}$ und $bSmad2^{-/-}$ Tieren (n=6).

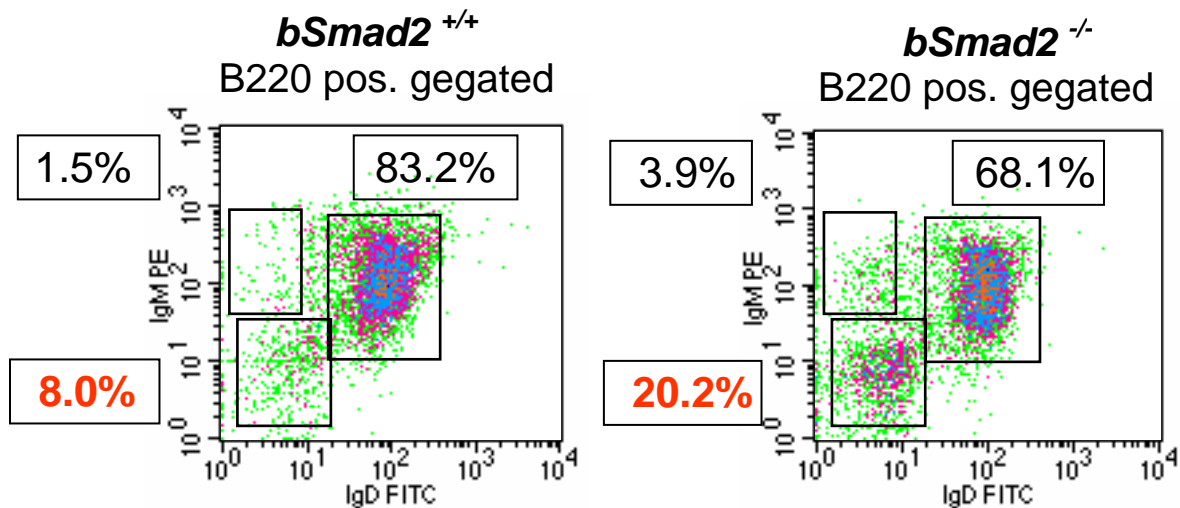
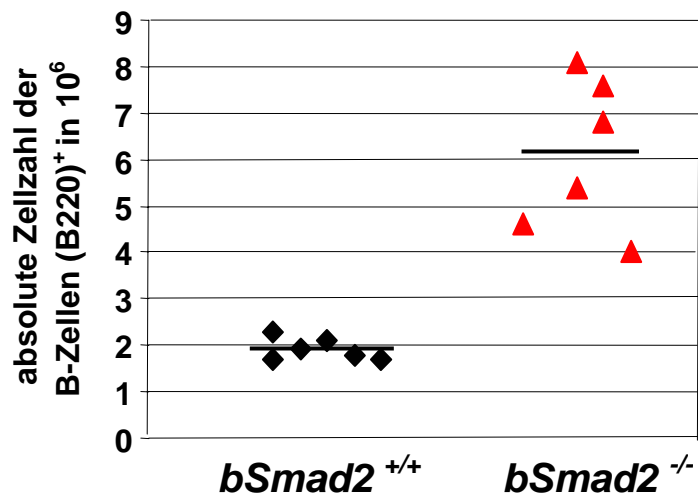


Abb. 47: FACS-Experiment (n=3) von PP-Zellen, B220⁺ Zellen sind mit anti-IgM und anti-IgD angefärbt. Man sieht einen B220+, IgM-, IgD- Zellpool bei den $bSmad2^{-/-}$ Tieren, der auf mehr als das doppelte angewachsen ist (durchgeführt von Dr. B. Kneitz).

Der in der letzten FACS-Abbildung zu sehende vergrößerte B220+, IgM-, IgD- Zellpool weist auf einen aktivierten Status dieser PP-Zellen ohne einen externen Einfluß (z.B. einer Immunisierung) hin. Somit scheint Smad2, wie schon für TGF- β gezeigt (Cazac und Roes 2000), einen Einfluß auf die Inhibition von B-Zellantwort in dem Mikrokompartment der Payer's Plaques zu haben.

3.3.4 B1-Zellen des Peritoneums

Aus der schon erwähnten Arbeit von Cazac und Roes (2000) war auch eine klare Erhöhung des B-1 Zellpools im Peritoneum bei den TGF- β -Rezeptor Typell defizienten Tieren zu erkennen. Daher wurde zusätzlich ein verstärktes Augenmerk auf die B-Zellpopulationen des Peritoneums von $bSmad2^{-/-}$ Tieren gerichtet.

Aus den Gesamtzellzahlen (siehe Abb. 45) der Peritoneen von $bSmad2^{+/+}$ und $bSmad2^{-/-}$ Tieren war eine leichte Reduktion in der zweiten Gruppe zu beobachten. Betrachtet man jedoch die B-1a und B-1b Zellpopulationen des Peritoneums, die z.B. durch eine FACS-Färbung mit anti-IgM und anti-CD5 zu unterscheiden sind, so entdeckt man klare Unterschiede bei den $bSmad2^{-/-}$ Tieren.

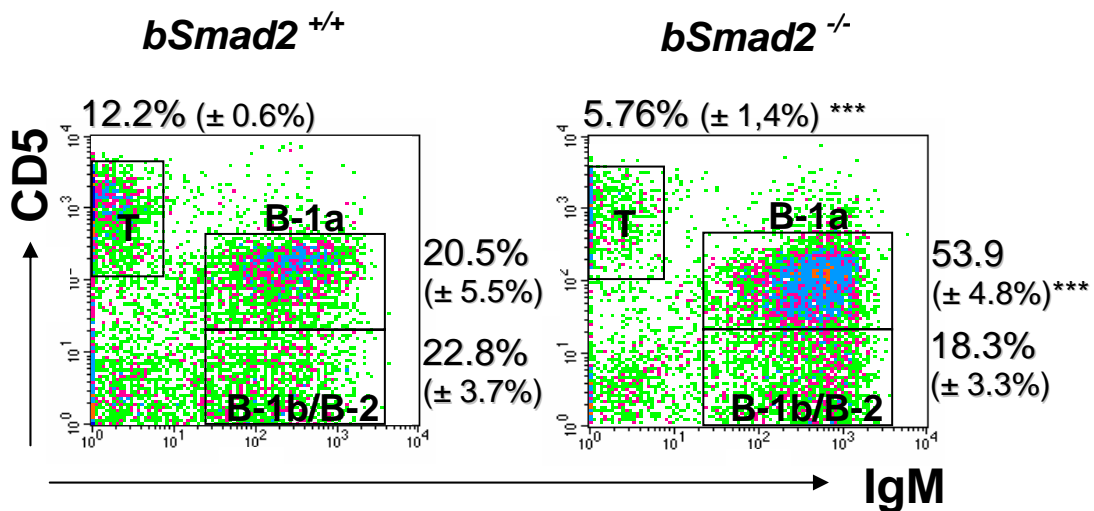


Abb. 48: FACS-Anfärbung peritonealer Zellen von Kontroll und k.o. Tieren (n=5) mit IgM und CD5 mit Prozentangaben, Standardabweichung. B-1a-, B-1b/B-2- und T-Zellpopulationen sind durch Rechtecke markiert.

Durch diese für die angegebenen Zellpopulationen typische FACS-Anfärbung sieht man eine signifikante Reduktion des T-Zellpools und eine gleichzeitiges Anwachsen des B-1a Zellpools. Diese Ergebnisse konnten durch FACS-Anfärbungen mit anti-B220 und anti-CD5 bestätigt werden (nicht dargestellt). Die Ergebnisse von acht FACS-Anfärbungen mit anti-IgM und anti-CD5 unterschiedlicher Mäuse beider Gruppen sind in der nächsten Graphik mit dem Verhältnis zwischen B-1a und konventionellen B-2 und B-1b Zellen zusammengefaßt.

Verhältnis von B-1a zu konventionellen B-2 und B-1b-Zellen

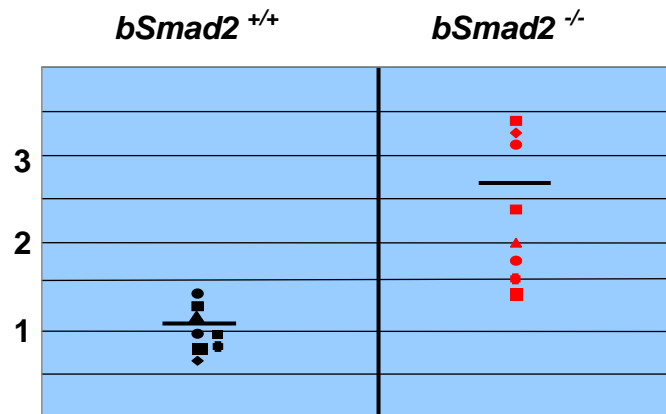
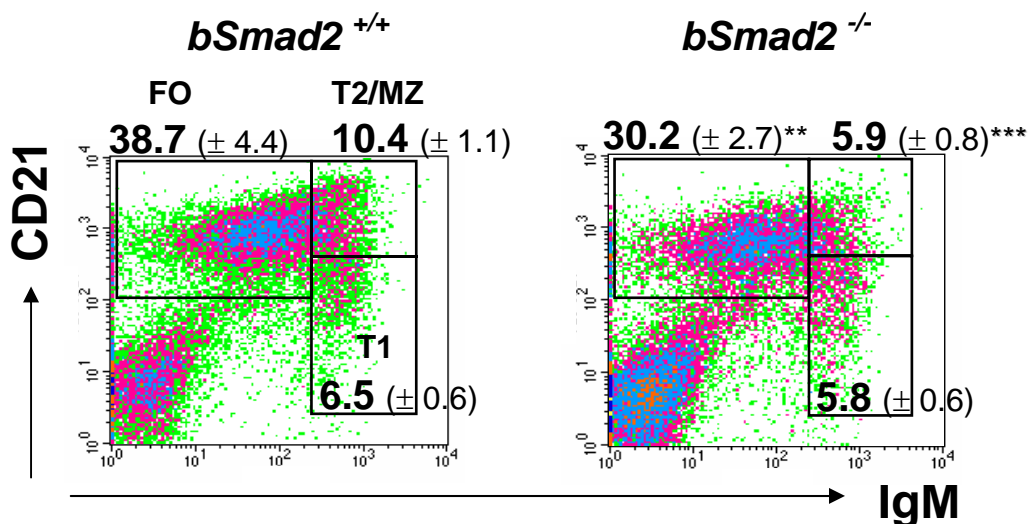


Abb. 49: Darstellung des Verhältnis von B-1a zu B-2 und B-1b Zellen aus acht Kontroll und acht k.o. Mäusen.

Man sieht anhand vorheriger Abbildung, daß das Verhältnis der angegebenen Zellpopulationen von 1,1 auf 2,7 angewachsen ist. Hierbei ist anzumerken, daß nur fünf der acht *bSmad2*^{-/-} Tiere eine klare phänotypische Ausprägung zeigten.

3.3.5 B-Zellen der Milz und B-Zellreifung

Aufgrund einer Idee von Dr. Lars Nitschke wurde im zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit an der *bSmad2*^{-/-} Maus nochmals ein Augenmerk auf bestimmte Milzzellpopulationen gerichtet. Hierbei ging es um die Auflösung von folliculären B-Zellen (FO), Marginalzonen B-Zellen (MZ) und transitionellen B-Zellpopulationen (T1 und T2), also somit um die B Zellreifung. Es wurden zwei reproduzierbare Färbungen durchgeführt, einmal mit anti-IgM und anti-CD21, und zum anderen mit anti-CD21 und anti-CD23 (vorher auf B220 gated).



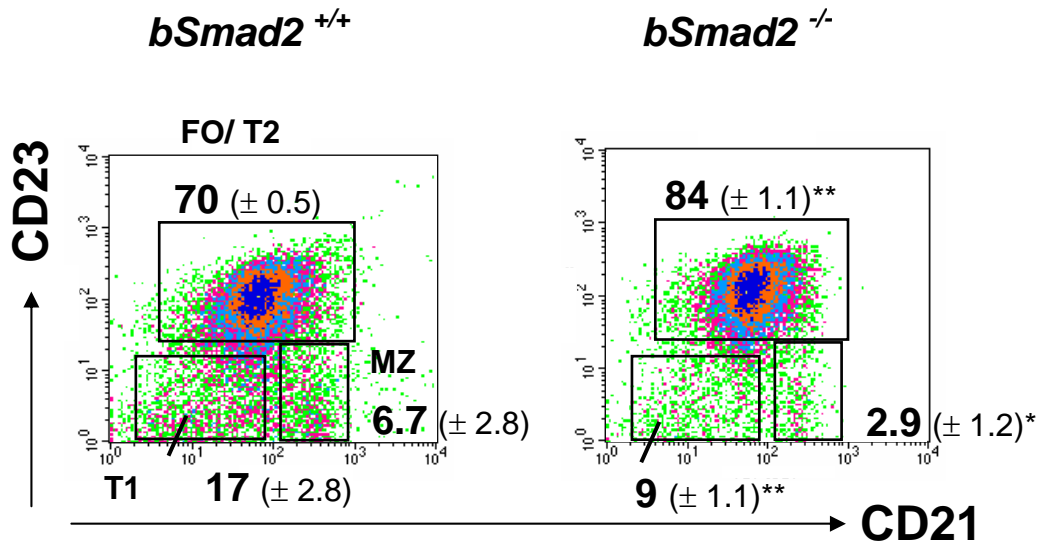


Abb. 53: Milz-FACS-Anfärbungen von *bSmad2*^{+/+} und *bSmad2*^{-/-} Mäusen (n=3). Obere Abbildung anti-CD21 versus anti-IgM (a), untere Abbildung anti-CD23 versus anti-CD21 (b), wobei hier diese Zellen zuerst auf anti-CD19 angefärbt wurden. Follikuläre (Fo; reife), Transitionale (T1 und T2) und Marginalzonen B-Zellen (MZ) sind in der jeweils linken Anfärbung gekennzeichnet. Standardabweichung und Signifikanz sind mit angegeben (durchgeführt von Dr. Lars Nitschke).

Bei der anti-IgM, anti-CD21 Anfärbung sieht man eine Reduktion der T2 Zellen. Dies wurde in einer zusätzlichen anti-IgM, anti-IgD Färbung bestätigt (nicht gezeigt). Vorallem ist aber eine klare Reduktion der Marginalzonen B-Zellen in den *bSmad2*^{-/-} Mäusen zu beobachten. Dieser Unterschied ist noch deutlicher in der Anfärbung mit anti-CD23 und anti-CD21 zu sehen, in der nur anti-B220 gefärbte Zellen dargestellt sind. Auch dieses Ergebnis wurde durch eine zusätzliche Anfärbung mit anti-CD1d, anti-B220 bestätigt (nicht gezeigt).

3.3.6 Totaler Serum Ig-Basislevel

Zudem wurde der Immunstatus der *bSmad2*^{-/-} Tiere untersucht. Der totale Serum Ig-Basislevel (IgM, IgG1, IgG2b, IgG3 und IgA) wurde mit einem Plattenelisa bestimmt. Die Ig-Basislevel wurden von Tieren bestimmt, die 3 Monate, 6-8 Monate und 1 Jahr alt waren.

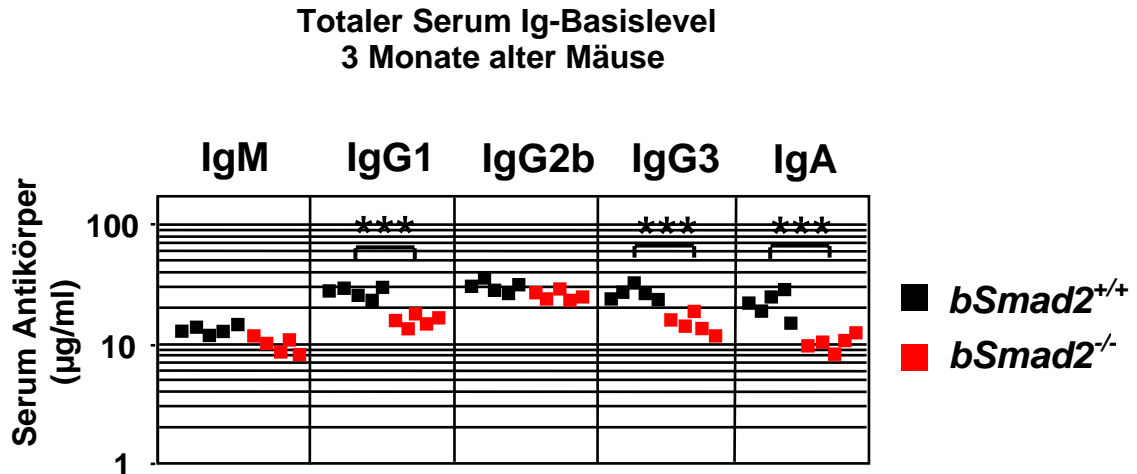


Abb. 50: Endauswertung eines Plattenelisas mit je fünf 3 Monate alter $bSmad2^{+/+}$ und $bSmad2^{-/-}$ Tieren. Es wurden die Ig-Basislevel der Ig-Isotypen IgM, IgG1, IgG2b, IgG3 und IgA im Vergleich zu einem Standard-Ig-X bekannter Konzentration gemessen. Signifikante Unterschiede (nach dem Students t-Test) sind durch Sterne gekennzeichnet (***: $p < 0,001$).

Die Serum Basislevel der analysierten Immunglobuline drei Monate alter Mäuse unterscheiden sich, was IgM und IgG2b angeht nahezu nicht. Die $bSmad2^{-/-}$ Tiere zeigen jedoch eine signifikante Reduktion von IgG1, IgG3 und IgA. Diese Situation stellt sich bei älteren Tieren (jeweils 5 Kontrolltiere und 5 k.o.Tiere analysiert 6-8 Monate und 1 Jahr alt) ähnlich dar. Der einzige Unterschied ist eine Angleichung des IgG1 Basislevels der $bSmad2^{-/-}$ Tiere an die Kontrolltiere. Insgesamt stieg der Grundlevel aller Immunglobuline auf der logarithmischen Skala auf 200-600 µg/ml an.

3.3.7 Immunantwort auf TNP-Ovalbumin

Um die Immunantwort der $bSmad2^{-/-}$ Tiere zu untersuchen, wurden diese und Kontrolltiere nach einem klassischen Immunisierungsprotokoll mit TNP-Ovalbumin, einem thymusabhängigen Antigen, immunisiert. Die Immunantwort der Immunglobulinisotypen IgM, IgG1, IgG3 und IgA wurden mit einem Plattenelisa bestimmt. Die Tiere wurde intraperitoneal mit 100 µg TNP₁₃-Ova an Tag 0 und Tag 14 (boost) immunisiert.

Während der Immunisierung wurde jedem Tier aus der Schwanzvene an den Tagen 0, 7, 14 und 21 Blut entnommen. Aus diesem Blut wurden Seren extrahiert und mit diesen ein TNP-spezifische Plattenelisa durchgeführt. Als Standard dienten hier gepoolte Seren von Tag 7-21.

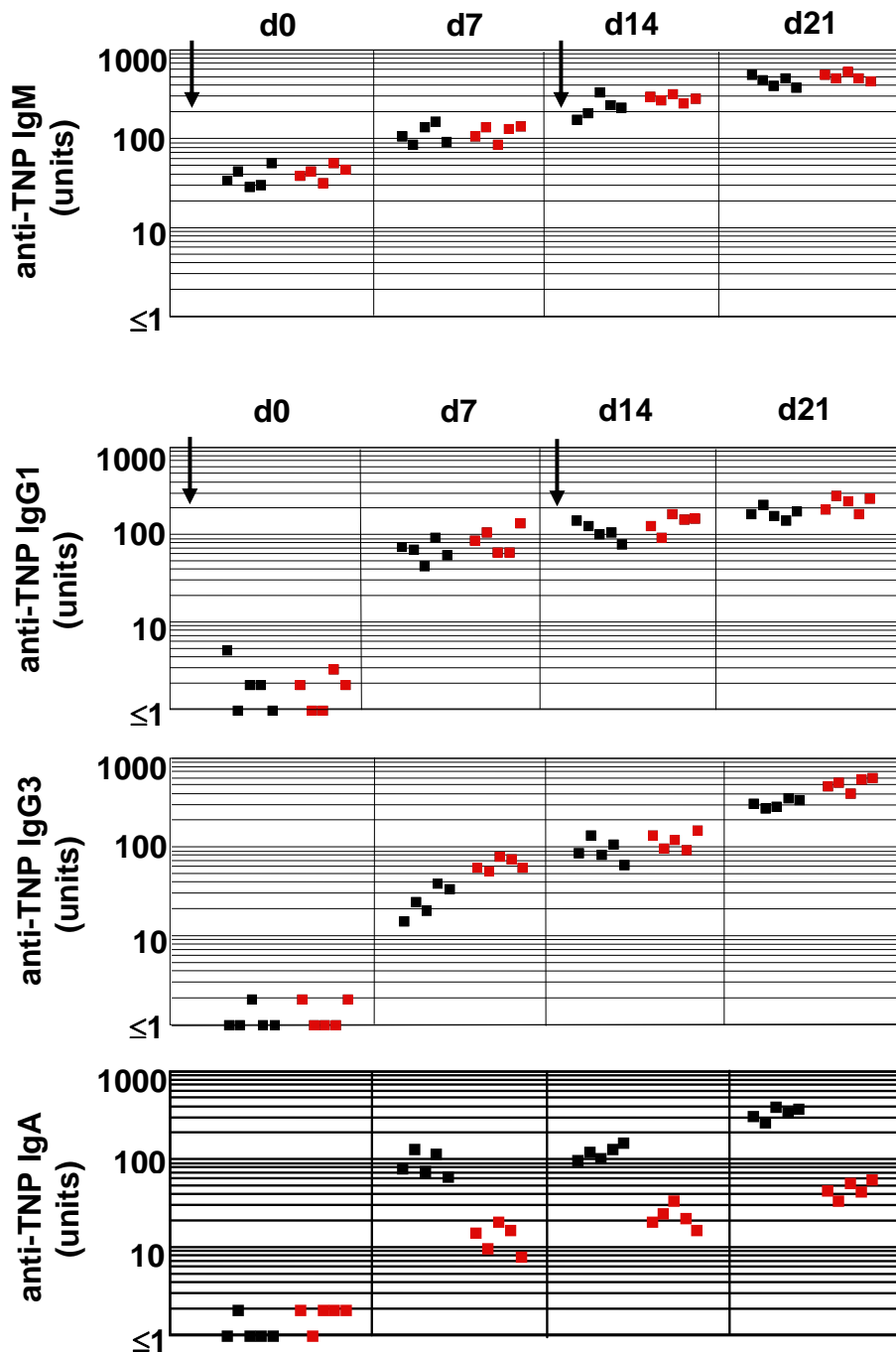


Abb. 51: Anti-TNP-spezifische Plattenelisas von an Tag 0 zwölf Wochen alter Mäuse. Je fünf $bSmad2^{+/+}$ (schwarze Quadrate) und $bSmad2^{-/-}$ (rote Quadrate) Tiere wurden analysiert. Die Tage an denen die Tiere intraperitoneal mit TNP₁₃-Ova immunisiert wurden sind mit einem schwarzen Pfeil markiert. Auf der y-Achse sind willkürlich gewählte Einheiten (units) aufgetragen, die sich nach den als Standard gewählten Serenpools orientieren.

Man erkennt anhand dieser TNP-spezifischen Plattenelisas ein ähnliches Verhalten der IgM und IgG1 Immunantworten. IgG3 zeigt bei den $bSmad2^{-/-}$ eine leicht erhöhte Immunantwort auf TNP₁₃-Ovalbumin. Im Gegensatz dazu ist die IgA Immunantwort der $bSmad2^{-/-}$ Tiere um das ca. 10-fache niedriger, als das der $bSmad2^{+/+}$ Tiere.

Die Mäuse, die bereits zweimal gegen TNP₁₃-Ovalbumin immunisiert wurden, wurden ein halbes Jahr nach dieser ersten Immunisierung abermals mit demselben Antigen immunisiert, um die Tertiärantwort der bSmad2^{-/-} Tiere zu analysieren. Wie zu erwarten steigen die AK-Titer auf einmalige intraperitoneale Verabreichung des Antigens sofort stark an. Dies trifft bei IgM und IgG1 für bSmad2^{+/+} und bSmad2^{-/-} Tiere gleichermaßen zu. IgG3 zeigt eine insgesamt wesentlich schwächere Immunantwort, während bei IgA wieder ein deutlicher Unterschied zwischen Kontrolltieren und k.o. Tieren zu beobachten ist (ca. 7-fach niedriger bei bSmad2^{-/-} Mäusen).

2. boost mit TNP₁₃- Ova nach sechs Monaten

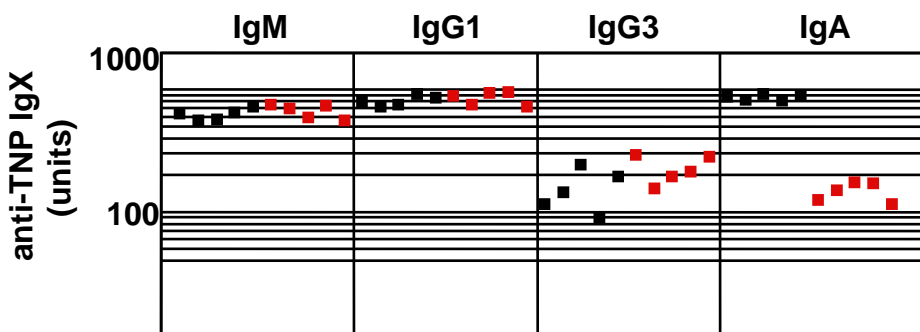


Abb. 52: Jeweils fünf bSmad2^{+/+} (schwarze Quadrate) und bSmad2^{-/-} Mäuse (rote Quadrate) wurden ein halbes Jahr nach den ersten beiden Immunisierungen mit TNP₁₃-Ovalbumin abermals mit diesem thymusabhängigen Antigen immunisiert (geboosted). Mit einem standardisierten TNP-spezifischen Plattenelisa wurden die IgM, IgG1, IgG3 und IgA Immunreaktionen abgefragt. Auf der y-Achse sind willkürlich gewählte Einheiten (units) aufgetragen, die sich nach den als Standard gewählten Serenpools orientieren

3.3.8 IgA Produzenten in den Peyer's Patches

Aufgrund der Reduktion der IgA-Immunantwort von bSmad2^{-/-} Mäusen erschien es sinnvoll den Status der IgA-Produzenten in den PP zu untersuchen. Umso mehr, da bekannt ist das diese normalerweise ein Ort hoher Anreicherung von IgA sezernierenden B-Zellen sind (Butcher et al. 1982). Diese Fragestellung wurde mit einem ELISPOT-Experiment angegangen, durch das man Antikörper sezernierende Zellen bestimmen kann. Milzzellen und PP-Zellen von je fünf bSmad2^{+/+} und bSmad2^{-/-} Mäusen wurden in einer Anfangsverdünnung von 1×10^6 Zellen in den ELISPOT eingebracht. Es wurden die Immunglobulinisotypen IgM und IgA analysiert.

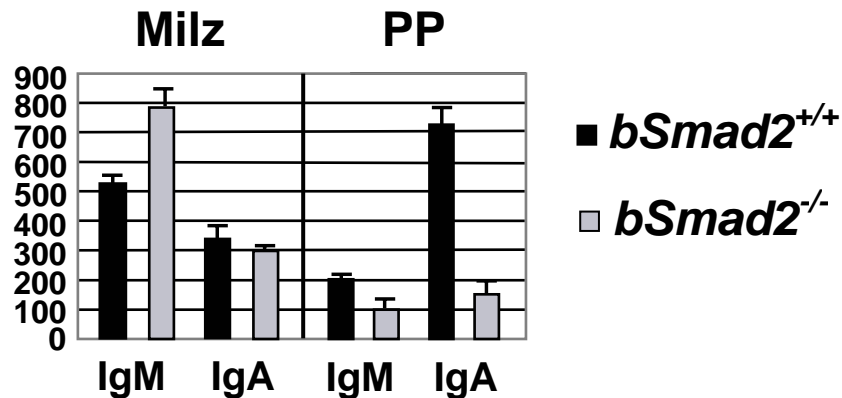


Abb.54: ELISPOT-assay mit Milz und PP-Zellen von *bSmad2*^{+/+} und *bSmad2*^{-/-} Mäusen (n=5). Analysiert wurden IgM und IgA Produzenten. Aufgetragen sind die AK sezernierenden Zellen in 10⁶ eingesetzten Zellen.

Man erkennt in Kontroll und k.o. Tieren einen deutlich höheren Anteil IgM sezernierender B-Zellen in der Milz, als in den Peyer's Patches (PP). Wobei der Anteil IgM sezernierender B-Zellen bei den *bSmad2*^{-/-} Mäusen in der Milz höher liegt. IgA sezernierende B-Zellen in der Milz sind in beiden Fällen niedriger als der Anteil IgM sezernierender Zellen. Im Vergleich dazu liegt der Anteil IgA sezernierender B-Zellen in den PP der *bSmad2*^{-/-} Tiere circa 7-fach niedriger als bei den Kontrolltieren. Aufgrund der Ergebnisse aus dem ELISPOT-assay stellte sich nun die naheliegende Frage nach Oberflächen-IgA positiven B-Zellen in den Payerschen Plaques (PP). Daher wurden FACS-Anfärbungen von PP-Zellen mit anti-B220 und anti-IgA durchgeführt. Es erwies sich als schwierig diese Art von Anfärbungen durchzuführen, da die verschiedenen kommerziell zu erwerbenden Antikörper sich als qualitativ schlecht herausstellten (nachgewiesen durch verschiedene Kontrollfärbungen, hier nicht gezeigt).

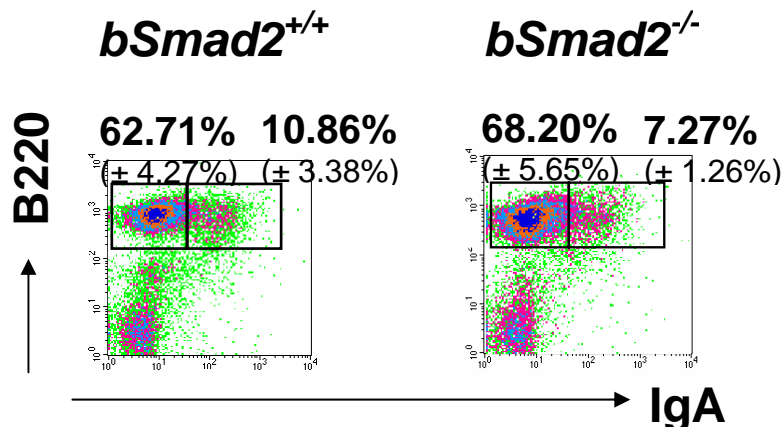


Abb. 55: FACS-Anfärbung von je einer Payerschen Plaques Präparationen aus *bSmad2*^{+/+} und *bSmad2*^{-/-} Tieren mit anti-B220 und anti-IgA Antikörpern, mit der dazugehörigen Standardabweichung aus insgesamt fünf Experimenten.

Man erkennt bei dieser repräsentativen FACS-Anfärbung keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und knock out Tieren was Oberflächen-IgA positive B-Zellen angeht.

3.3.8 Analyse des Klassenwechsels zu IgA

Um den Klassenwechsel (engl. CSR; class switch recombination) zu IgA genauer zu untersuchen wendete Dr. B. Kneitz eine Methode, die erfolgreich im Labor von Tasuku Honjo (Kinoshita et al. 2001) etabliert wurde, zur Identifikation von sogenannten „circle transcripts“ an. Es ist bekannt, daß Zellen, die einen Klassenwechsel durchlaufen und AID (engl. activation-induced cytidin deaminase, welche ein essentieller Faktor für die CSR ist) exprimieren, diese „circle transcripts“ generieren. Diese wiederum gehen zurück auf zirkuläre DNA, die bei einem Klassenwechsel aus dem schwere Ketten Locus entfernt wird. Diese zirkuläre DNA enthält einen noch aktiven I-Promoter, wodurch I-C μ Transkripte entstehen, die sogenannten „circle transcripts“. Zudem degenerieren diese Transkripte schneller als die zirkuläre DNA und scheinen somit ein guter Marker für das Auftreten eines Klassenwechsels zu sein, da eine enge zeitliche Kopplung zwischen diesen Ereignissen gewährleistet ist.

Durch Anwendung von RT-PCR (engl. reverse transcription PCR) wurde cDNA aus Milzzellen von bSmad2 $^{+/+}$ und bSmad2 $^{-/-}$ Tieren gewonnen. Von dieser cDNA wurde mit einem I α -Transkript spezifischen Primer (I α F) und einem C (engl. constant region exon) μ spezifischen Primer (C μ R) eine PCR für die Detektion von „circle transcripts“ durchgeführt. Als interne Ladekontrolle diente eine GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) PCR.

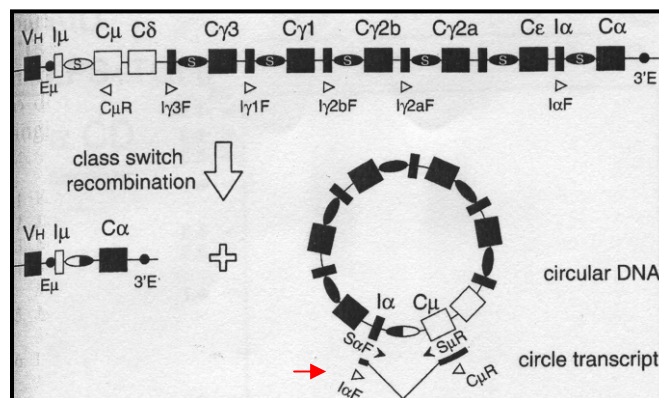


Abb. 56: Schematische Darstellung der Vorgänge eines IgA Klassenwechsels im murinen IgH (engl. Immunglobulin heavy chain locus) nach dem VDJ Rearrangement (oberer Teil). Dargestellt sind unter anderem die dann entstehende zirkuläre DNA und das Primerpaar I α F und C μ R, welches für die α zirkulären Transkripte (roter Pfeil) spezifisch ist. Die eingefügte V-förmige Linie steht für das alternative Spleißprodukt (Kinoshita et al. 2001).

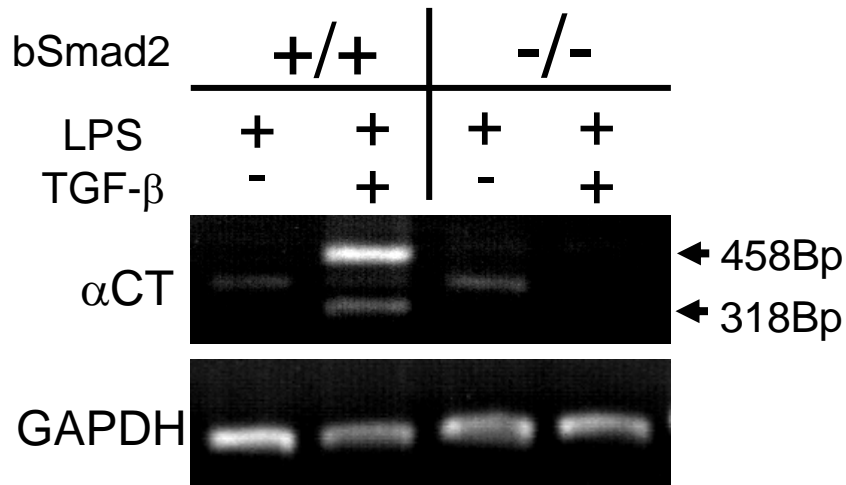


Abb. 57: Agarosegel von PCR-Ergebnissen aus cDNA, die durch RT-PCR aus Milzzellen von bSmad2^{+/+} und bSmad2^{-/-} Tieren gewonnen wurde. Die Milzzellen wurden wie angegeben in vitro mit LPS und TGF- β stimuliert. Die α CT ($I\alpha$ spezifische „circle transcripts“) PCR wurde mit dem Primerpaar $I\alpha$ F und C μ R (Kinoshita et al. 2001) und die GAPDH-PCR mit GF und GR (Kinoshita et al. 1998) von Dr. Burkhard Kneitz durchgeführt.

Man erkennt in der Abbildung 57, daß sich in Kontrolltieren durch Stimulation mit LPS und TGF- β spezifische „circle transcripts“ für einen IgA Klassenwechsel induzieren lassen. Die beiden Fragmente, die 318 Bp und 458 Bp groß sind, zeigen die zwei erwarteten alternativen Spleißvarianten im $I\alpha$ Exon. Diese Fragmente lassen sich jedoch nicht in den B-Zell spezifischen knock out Tieren (bSmad2^{-/-}) induzieren. Also läßt sich auch auf der molekularen Ebene ein klarer Einfluß von SMAD2 auf den IgA Klassenwechsel zeigen. Die GAPDH-PCR zeigt, daß die cDNA-Template Mengen einander entsprechen.

An dieser Stelle möchte ich einen Überblick über die bis zum Zeitpunkt des Endes meiner praktischen Arbeit von den bSmad2^{-/-} Mäusen gewonnenen Daten geben.

Die B-Zell spezifische Deletion des Smad2 Genes war in über 90 % der B-Zellen zu beobachten.

Aufgrund der Daten der B-Zell spezifischen TGF- β RII defizienten Maus (in der TGF- β Einleitung näher beschrieben; Cazac und Roes 2000), wie zum Beispiel ein erhöhter B1-Zellpool, ein aktivierter Status von PP Zellen und ein kaum messbarer IgA Level (auch nach Immunisierungsexperimenten) wurde ein Hauptaugenmerk auf diese Charakteristika gelegt.

Mit klassischen FACS-Anfärbungen der peripheren Zellpopulationen in Lymphknoten (LN), Milz (spl), wie auch im Knochenmark (BM) zeigte sich keine Veränderung in der B-Zellfrequenz bei bSmad2^{-/-} Mäusen.

Die Zellen der PP der bSmad2^{-/-} Tiere hingegen wiesen schon bei ersten FACS Experimenten eine Hyperplasie auf. Desweiteren zeigte sich eine um das dreifache erhöhte Anzahl von B-Zellen, und zudem ein höherer Anteil B-Zellen mit einem aktivierten Status.

Im Peritoneum der bSmad2^{-/-} Tiere zeigte sich eine deutlich erhöhte Anzahl von B1-a Zellen, die durch unterschiedliche FACS Färbungen bestätigt werden konnten.

Zusätzlich wurde zu einem späteren Zeitpunkt nochmals ein Augenmerk auf B-Zellsubpopulationen der Milz gerichtet. Hierbei konnte eine Reduktion der Marginalzonen B-Zellen in bSmad2^{-/-} Tieren beobachtet werden (Dr. Lars Nitschke).

Bei der Bestimmung der Immunglobulinbasislevel der bSmad2^{-/-} Tiere konnte eine signifikante Reduktion von IgG1, IgG3 und IgA festgestellt werden.

Zusätzlich wurden die Mäuse mit dem thymusabhängigen Antigen TNP-Ovalbumin (TNP-Ova) immunisiert. Bei der Analyse der Immunantworten zeigte sich vor allem eine stark reduzierte IgA Antwort, auch nach einer abermaligen Immunisierung derselben Tiere ein halbes Jahr später.

Aufgrund der FACS-Ergebnisse von PP-Zellen, also zum Beispiel der erhöhte Anteil an aktivierten B-Zellen, und der Reduktion der IgA-Immunantwort von bSmad2^{-/-} Mäusen erschien es sinnvoll den Status der IgA-Produzenten in den PP zu untersuchen. Umso mehr, da bekannt ist das diese normalerweise ein Ort hoher Anreicherung von IgA exprimierenden B-Zellen sind (Butcher et al. 1982). Bei ELISPOT Experimenten zu dieser Fragestellung erwies es sich tatsächlich, daß bei den bSmad2^{-/-} Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren weniger IgA produzierende Zellen vorhanden sind.

Um den Klassenwechsel (CSR; class switch recombination) zu IgA genauer zu untersuchen wendete Dr. B. Kneitz eine Methode, die erfolgreich im Labor von Tasuku Honjo (Kinoshita et al. 2001) etabliert wurde, zur Identifikation von sogenannten „circle transcripts“ an. Diese „circle transcripts“ für einen IgA Klassenwechsel lassen sich nicht in den B-Zell spezifischen knock out Tieren (bSmad2^{-/-}) induzieren. Also läßt sich auch auf der molekularen Ebene ein klarer Einfluß von SMAD2 auf den IgA Klassenwechsel zeigen.

Der für TGF- β beschriebene Effekt der Proliferationshemmung von aktivierten B-Zellen (Kehrl et al. 1986; 1989; 1991) war auch bei aktivierten B-Zellen der bSmad2^{-/-} Mäuse zu sehen.

Faßt man alle gewonnenen Daten aus den hier generierten B-Zell spezifischen Smad2 defizienten Tieren zusammen, so kann man zu dem klaren Ergebnis kommen, daß der TGF- β Signalmediator Smad2 eine entscheidende Rolle bei der Weiterleitung von TGF- β Signalen in das Zellinnere von B-Zellen spielt.

4. Diskussion

4.1 Generierung einer CD22R130E Knock in Maus zur Deletion der CD22 Adhäsionsdomäne

4.1.1 Konstruktion des Targetvektors

Einer der ersten Schritte bei der Konstruktion eines Gene Targeting Vektors ist die Wahl des Templates von dem der Vektor kloniert werden soll. Hierbei scheint es erwiesen, daß es die beste Wahl ist denselben genetischen Hintergrund (isogene DNA) zu verwenden, den die ES-Zelllinie der Wahl besitzt (te Riele et al. 1992).

Bei der ersten Strategie zur Klonierung des CD22R130E Knock in-Vektors lag genau diese Überlegung zu Grunde. Als ES-Zelllinie wurde die C57BL/6-III ES-Zelllinie (Ledermann und Bürki 1991) gewählt, um denselben genetischen Hintergrund mit dem die CD22 Knock out Maus (Nitschke et al. 1997) generiert wurde, beizubehalten, damit spätere vergleichende Studien auf demselben Hintergrund basieren könnten. Aus diesem Grund wurden alle Klonierungsschritte für den CD22R130E Knock in-Vektor von genomischer DNA aus Zellen von C57BL/6-III Mäusen durchgeführt (diese Arbeit wurde von Christina Piperi aus dem Labor von Dr. Anton van der Merwe durchgeführt; Oxford).

Die nächste zu treffende Entscheidung ist die, welche Art von Targetvektor man verwendet. Hierbei unterscheidet man zwischen „replacement“ (Austausch) und „insertion“ (Insertions) Vektor. Ein Austauschvektor wird in der Regel linearisiert, so daß die Vektorsequenz mit der genomischen Targetsequenz kollinear zu liegen kommt. Im Fall des CD22R130E Knock in-Vektors wurde mit der Restriktionsendonuklease PvuI linearisiert, indem ein ca. 1 Kb großes Fragment inmitten der Sequenz des pBluescriptSKII Vektors entfernt wurde. Es werden nun die chromosomalen Sequenzen durch ein doppeltes Crossoverereignis von den homologen Regionen der Vektorsequenzen ersetzt. Bei einem Insertionsvektor wird der Vektor innerhalb der homologen Region linearisiert und durch ein homologes Integrationsereignis wird die genomische Sequenz partiell dupliziert. Bisher wurden, was zumindestens Nullmutanten angeht, die meisten Mäuse durch Austauschvektoren generiert.

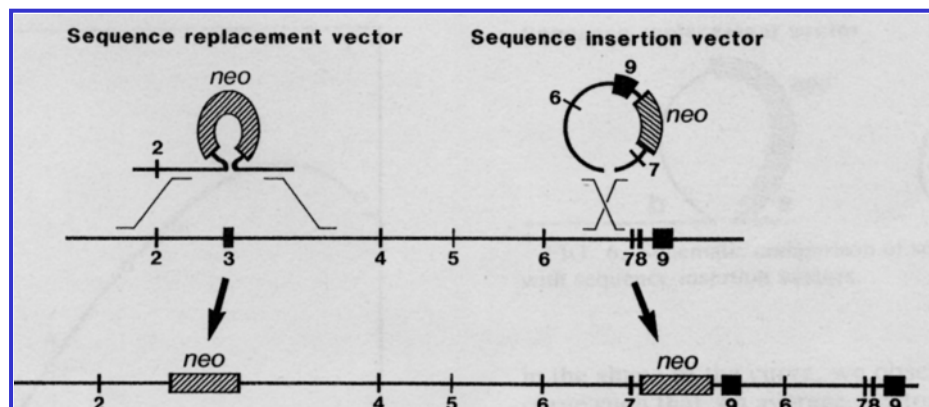


Abb. 58: Darstellung zweier Gene Targeting Strategien innerhalb des HPRT (Hypoxanthin-Guanin Phosphorybosyltransferase) Genlocus. Die oben beschriebenen Mechanismen sind links für einen Austauschvektor (das Neo-Gen wurde in Exon3 eingefügt) und rechts für einen Insertionsvektor (das Neo-Gen und der komplette Vektor werden eingefügt) zu erkennen (Deng und Capecchi 1992).

Im Fall des CD22R130E Knock in-Vektors wurde ebenfalls die Variante eines Austauschvektors mit einem Neomycinphosphotransferasegen und einem HSV-Thymidinkinasegen als Selektionskassette und zwei Armen für die homologe Rekombination gewählt. Die Parameter, welche die Frequenz der homologen Rekombination beeinflussen sind von eminenter Wichtigkeit. Hierbei wurden im Laufe der Jahre, in denen die Gene Targeting Strategie mit Maus ES-Zellen angewandt wurde, einige wichtige Punkte definiert: Zum einen steigt die Rekombinationswahrscheinlichkeit mit dem Anwachsen der Homologiebereiche bis auf 10 Kb zwischen Vektor- und Targetsequenz stetig an, wobei eine Minimallänge des kurzen Arms der homologen Rekombination von 0,5 Kb ermittelt wurde (Hasty et al. 1991; Deng und Capecchi 1992). Desweiteren kann, wie schon oben erwähnt, die Rekombinationsrate mit dem Anteil an isogener Vektorsequenz anwachsen (te Riele et al. 1992). Außerdem scheint die absolute Frequenz der homologen Rekombination auch vom genomischen Locus und zudem von dessen Chromatinstruktur, sowie dessen Zugänglichkeit für enzymatische Maschinerie der homologen Rekombination abhängig zu sein. Eine weitere Annahme ist, daß die Frequenz der homologen Rekombination von der Exon/Intron Struktur und repetitiven Sequenzen innerhalb des Gens der Wahl abhängig ist. Hierüber sind jedoch bis jetzt keine gesicherten statistischen Vergleichsdaten vorhanden.

Zum einen ist zu betonen, daß die gesamte Sequenz des CD22R130E Knock in-Vektors auf isogener C57BL/6-III genomischer Sequenz beruht. Somit wurde für die ursprüngliche Planung für die Verwendung von C57BL/6-III ES-Zellen (Ledermann und Bürki 1991) die optimale Ausgangsbedingung geschaffen.

Zum anderen wurden im Laufe der Doktorarbeit zwei Targetkonstrukte verwendet: der kurze Arm der homologen Rekombination war hierbei jeweils 1 Kb lang, lag also um das Zweifache über der empfohlenen Mindestlänge von 0,5 Kb aus der Arbeit von te Riele et al.. Der lange Arm der homologen Rekombination wurde von 2,4 Kb auf 4,7 Kb verlängert. In diesem Fall allerdings mit einem 129/ola Template, da ein größerer Anteil an isogener Sequenz für die spätere Verwendung der E14Tg2a ES-Zelllinie (Kuehn et al. 1986) (129 Hintergrund) geschaffen werden sollte. Für die Versuche mit der C57BL/6-III ES-Zelllinie lag der isogene Anteil des langen Arms für die homologe Rekombination somit bei 2,4 Kb. Bei Gene Targetingexperimenten mit der Balb1 (Noben-Trauth et al. 1996) ES-Zelllinie erwies es sich als eminent wichtig mit isogener Targetvektor-DNA zu arbeiten. Man weiß schon seit 1993 (Law et al. 1993), daß das Cd22 Gen mindestens zwei Allele besitzt. Bei einem Vergleich von BALB/c und C57BL/6 Tieren wurde ein weiteres Allel vermutet (van der Merwe et al. 1996), welches dann 1999 identifiziert wurde (Lajaunias et al. 1999). Zudem ist durch einen Vergleich von Sequenzierung der kodierenden Region von Cd22 festzustellen, daß mindestens zehn Nukleotid- und sieben daraus folgende Aminosäuresubstitutionen zwischen dem C57BL/6-Stamm und dem BALB/c-Stamm existieren, wobei ein Aminosäureaustausch in Exon 4 (Val→Cys) und zwei in Exon 5 (Arg→Cys und Arg→His) positioniert sind und damit den Targetvektor betreffen.

Somit erwies es sich, daß diese Heterozygotie bzw. die Polymorphismen des Cd22-Gens offensichtlich eine Rolle spielen bei der Verwendung eines Targetvektors aus C57BL/6-III DNA in der BALB/c ES-Zelllinie, da bei den beiden Experimenten mit dieser Konstellation keine ES-Zellklone (obgleich 1900 ES-Zellklone mittels Target-PCR gescreent wurden) durch den Target-PCR-Screen detektiert werden konnten. Also muß man davon ausgehen, daß kein homologes Integrationsereignis mit dem C57BL/6-III DNA basierenden Targetvektor mit der BALB/c ES-Zelllinie aufgetreten ist, da die verwendete Target-PCR schon mehrfach zuvor erfolgreich getestet wurde.

Innerhalb des Exon4 auf dem langen Arm beinhaltet der jeweilig verwendete Targetvektor die R130E Mutation, die zu einem kompletten Verlust der Adhäsionsfähigkeit von CD22 zu Sialinsäure führen soll.

An dieser Stelle sei nochmals eine Darstellung des CD22R130E Gene Targetvektors1 (Christina Piperi) gezeigt, der für die Experimente mit der C57BL/6-III ES-Zelllinie (Ledermann und Bürki 1991) verwendet wurde:

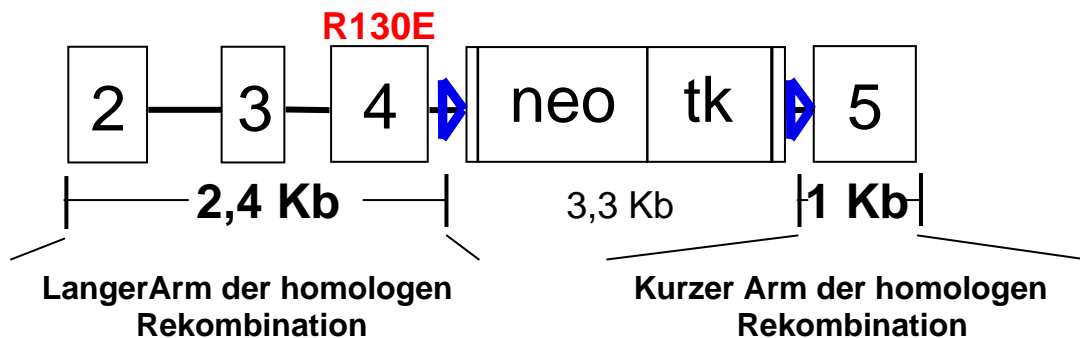


Abb. 59: Darstellung des Targetvektor1, der für die Gene Targeting Experimente mit der C57BL/6-III ES-Zelllinie verwendet wurde. Die R130E Mutation liegt am 3'-Ende des Exons 4. Blaue Pfeile deuten die gleichorientierten LoxP (locus of crossover x in P1) Sequenzen an. neo: Neomycinphosphotransferasegen; tk: Herpes Simplex Thymidinkinasegen.

Diese schematische Zeichnung des Targetvektor1 zeigt, daß es sich bei diesem Vektor um einen „Replacementvector“ zur Einführung einer Selektionskassette, die von zwei gleichorientierten LoxP Sequenzen flankiert ist („gefloxter“ Vektor), und der Aminosäuresubstitution R130E handelt. Diese mittlerweile sehr verbreitete Methode bedient sich des Cre/loxP Systems (Kilby 1993; Hoess und Abremski 1990; Sauer 1987; Sauer und Henderson 1988; Sauer 1993). Diese Arbeitsmethode beruht, wie schon vorher beschrieben, auf der Verwendung der Sequenz-spezifischen Rekombinase Cre des Phagen P1. Im Fall des CD22R130E Gene Targetvektors haben die LoxP-Sequenzen, die die beiden Selektionskassetten flankieren, die gleiche Orientierung. Somit ist ein transientes Cre-Plasmid (zB. pMC-Cre; Gu et al. 1993), welches durch Elektroporation in die ES-Zellklone eingebracht wird, in der Lage die Sequenz zwischen den beiden LoxP-Sequenzen so zu entfernen, daß in der intronischen genomischen Sequenz schließlich nur noch eine LoxP-Sequenz übrigbleibt.

Da die Frequenz eines korrekten Kotransfers der Selektionkassette und der einzuführenden Mutation (in diesem Fall die R130E-Mutation) über eine zunehmende Distanz abnimmt, sollte die Mutation nicht mehr als 10 Kb von der Kassette entfernt liegen (Torres und Kühn 1997). Im Fall des CD22R130E Gene Targetvektors liegt die R130E Mutation lediglich 700 Bp vom 5'-Ende der Selektionkassette entfernt. Somit sind optimale Voraussetzungen für einen korrekten Kotransfer der Selektionkassette und der R130E Mutation geschaffen.

Eine weitere offensichtliche Tatsache ist die geschickte Lokalisation der LoxP Sequenzen und somit der darin beinhalteten Selektionkassetten innerhalb einer intronischen genomischen Sequenz, so daß die schließlich übrigbleibende LoxP Sequenz sowenig Einfluß wie nur möglich auf die Transkription der veränderten Sequenz hat. Auch dieser Punkt ist bei der Konstruktion des CD22R130E Gene Targetvektors gegeben, bei dem die LoxP Bindungsstellen (welche die Selektionkassetten flankieren) innerhalb der intronischen Sequenzen zwischen Exon4 und Exon5 liegen.

Mit diesen Voraussetzungen sind die Bedingungen geschaffen das Cd22 Gen so zu verändern, daß ein „Gene Knock in“ generiert werden kann, bei dem möglichst wenig Interferenzen mit der Genregulation entstehen. In der Tat sind Fälle bekannt, bei denen diverse gravierende Probleme mit der Genregulation aufgrund noch vorhandener Selektionkassetten auftraten (zB. Fiering et al. 1999; Meyers et al. 1998).

4.1.2 Einschleusen des Targetvektors in die ES-Zellen

Ein weiterer wichtiger Punkt, der auch die Rekombinationswahrscheinlichkeit direkt beeinflußt und dennoch wenig erforscht ist, ist die Methode mit der Vektor-DNA in die ES-Zellen geschleust wird. In dieser Arbeit entschlossen wir uns durch einen definierten elektrischen Impuls (Elektroporation) die Targetvektoren der Wahl in die gewünschten ES-Zellen zu transportieren. Für diesen Zweck wurde ein Biorad Elektroporationsgerät mit den dazugehörigen Elektroporationsküvetten verwendet. Die Basisparameter für die Elektroporation waren jeweils 250 V, 500 μ F und $\infty \Omega$. Mittels jahrelanger Empirie wurden diese Werte als optimal für die Elektroporation von verschiedenen ES-Zelllinien getestet.

Frühe Experimente in dieser Richtung nutzten die Mikroinjektion, um die DNA in die Zellen zu befördern (zB. Thomas, Folger und Capecchi 1986). Bei dieser Vorgehensweise wurde eine Frequenz von einem korrekten Integrationsereignis auf 10 – 20 zufällige Integrationsereignisse erzielt, diese hohe Frequenz konnte von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden. Die Mikroinjektion für diese Art von Experimenten wurde jedoch, aufgrund des hohen Geräte – und Arbeitsaufwandes, sehr bald durch einfachere Methoden, wie zum Beispiel die Elektroporation ersetzt. Dies ging jedoch ganz klar auf Kosten der Targeteffizienz. Eine systemische Studie der Targeteffizienz des APRT-Locus in CHO (Chinese hamster ovary) Zellen zeigte zum Beispiel, daß die Effizienz der Mikroinjektion von 1:15 (Verhältnis von korrekten zu zufälligen Integrationen) bei der Elektroporation auf 1:2400 anwuchs.

Bei der Analyse dieser Daten wurden einige interessante Tatsachen ermittelt. Offensichtlich scheinen zufällige Integrationsereignisse extrem mit der Transfektionseffizienz einer DNA-Transportmethode zu korrelieren. Somit sieht es so aus, als seien zufällige Integrationsereignisse von der Anzahl der Moleküle, die in eine ES-Zelle gelangen, abhängig, während korrekte Targetereignisse davon unabhängig sind (Thomas und Capecchi 1987; Zheng und Wilson 1990). Nun ist Elektroporation offensichtlich die uneffizienteste Methode des DNA-Transfers und somit gelangen wenig Targetvektormoleküle in eine ES-Zelle. Will man also zufällige Integrationsereignisse (durch wenig Vektormoleküle pro Zelle) minimieren scheint die Elektroporation die einfachste und beste Methode für den DNA-Transfer zu sein.

4.1.3 Interpretation von PCR- und Southern-blotergebnissen

4.1.3.1 Target-PCR Ergebnisse:

Nach der oben besprochenen Konstruktion des Targetvektors und dazugehörigen Kontrollvektors, wurde, wie im Abschnitt 3.1.1 beschrieben, eine Screening-PCR mittels des Kontrollvektors entwickelt. Zu diesem Zweck wurden drei Primerpaare konstruiert. Die drei 5'-Primer lagen im Herpes Simplex Thymidinkinasegen, und die drei 3'-Primer 3' jenseits von Exon5, in der dem Targetvektor angrenzenden genomischen CD22 Wildtypsequenz. Zur Erinnerung sei hier noch einmal eine Skizze des Target-, Kontrollvektors und der Screening-Primer gezeigt:

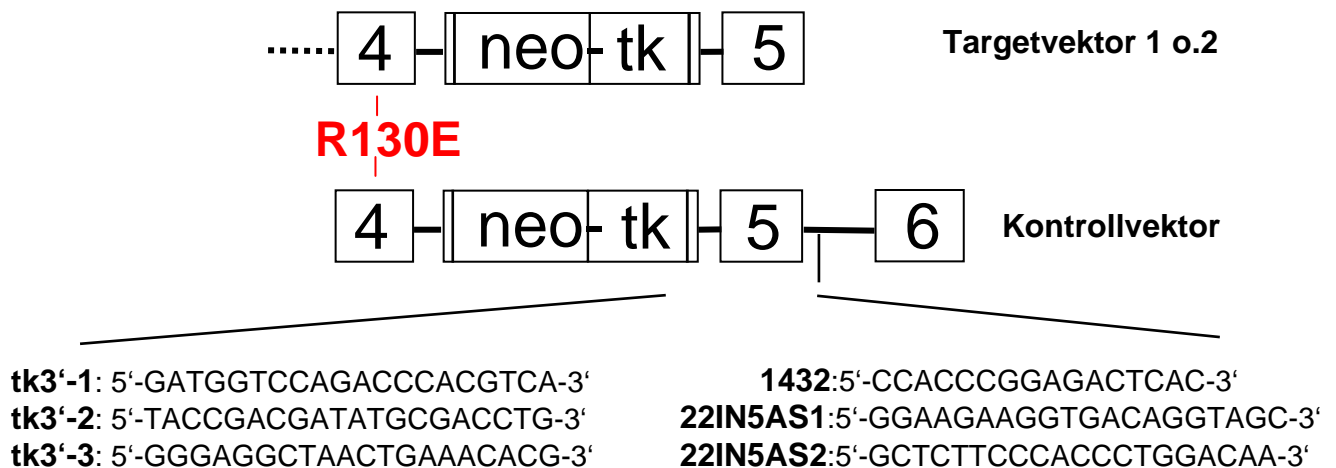


Abb. 60: Kontrollvektor mit 5'-Primern im Tk-Bereich und 3'-Primern jenseits Exon5 und somit des Targetvektors. Die Primer sind in ihrer 5'-3'-Orientierung angeordnet.

Wie beschrieben (3.1.1) wurde sowohl mit ES-Zelleinzelklonen, als auch mit ES-Zellgesamtlysat, die jeweils mit dem Kontrollvektor laut Standardprotokoll transfiziert wurden, jede mögliche Einzel-PCR und geschachtelte PCR etabliert. Die Ergebnisse dieser Kontroll-PCRs sollten somit realistisch nahe an einem Gene Targeting Experiment mit dem Targetvektor liegen. Alle der hierbei möglichen PCRs ergaben

bei diesen Test-PCRs immer die korrekten Fragmente, die Quote der ausgefallenen Spuren lag hierbei im Rahmen eines durchschnittlichen PCR Experiments.

Obgleich somit optimale Ausgangsbedingungen für die folgenden Gene Targetingexperimente mit dem eigentlichen Targetvektor geschaffen wurden, erwies es sich als trügerisch, den positiven Target-PCR Ergebnissen aus den ES-Zellscreens zu vertrauen. Alle mit der ES-Zelllinie C57BL/6-III durchgeführten Targetscreens stellten sich nämlich wie folgt dar: Die ersten vier Target Experimente wurden mit der Primerkombination tk3'1/CD22IN5AS2 und tk3'-3/1432 durchgeführt. Hierbei konnten aus 2800 untersuchten ES-Zellklonen von 52 Screen-Target-PCR ES-Zellklonen nur 19 durch abermalige Bestätigungs-PCR verifiziert werden und nur einer (IC1D8) von diesen durch verschiedene Southern-blots.

Bei den drei folgenden Target Experimenten wurden mit der Primerpaarung tk3'-2/CD22IN5AS1 und tk3'-3/1432 aus 2300 untersuchten ES-Zellklonen 5 PCR-positive Klone durch die Target-PCR identifiziert. Die darauf folgende Bestätigungs-PCR aus genomischer DNA konnte 4 dieser 5 ES-Zellklone verifizieren. Bei den durchgeführten Southern-blots konnte einer dieser ES-Zellklone (IB8) als ein eine korrekte homologe Rekombination durchlaufener ES-Zellklon bestätigt werden.

Somit besteht bei beiden Primerkombinationen eine große Diskrepanz zwischen erstmalig PCR positiven ES-Zellklonen, durch eine zweite PCR bestätigten ES-Zellklonen aus späteren Zellkulturstadien und den Ergebnissen aus den Southern-blots. Dennoch läßt sich die Aussage treffen, daß die Korrelation zwischen Target-PCR die Southern-blot im Fall der zweiten Primerkombination ungleich größer war, als mit der ersten Primerkombination. Somit scheint die Wahl der Primer, obgleich diese sehr eng beieinander liegen, durchaus einen großen Einfluß auf die Zuverlässigkeit der Target-PCR zu haben. Obgleich die Anwendung einer geschachtelten Target-PCR zuvor erfolgreich getestet wurde (Nitschke et al. 1993), wobei >95% der PCR positiven ES-Zellklone durch Southern-blot als Klone mit einer korrekten homologen Integration bestätigt werden konnten, schien diese Methode im Fall des CD22R130E Targetkonstruktes mit großen Schwierigkeiten verbunden zu sein.

Ein Großteil der falsch positiven PCR-Ergebnisse mag auf Kontaminationen durch zuvor verwendete Plasmide und PCR-Fragmente herrühren. Diese Möglichkeiten sind jedoch nie ganz auszuschließen und können die PCR-Ergebnisse nur zum Teil erklären, umso mehr, da eigentlich immer darauf geachtet wurde die PCR-Utensilien von Kontaminationen frei zu halten.

Somit ist das Phänomen der falsch positiven PCR-Klone nur schwierig zu erklären. Vielleicht trifft für die Anwendung der geschachtelten PCR Ähnliches zu, wie für die Frequenz der homologen Rekombination: eine Abhängigkeit des Gelingens mag vom genomischen Locus und zudem von dessen Chromatinstruktur, sowie dessen Zugänglichkeit für die Taq-Polymerase abhängig sein. Dennoch ist dies eine reine Annahme, und durch keinerlei weiteren Daten von anderen Arbeitsgruppen stützbar.

4.1.3.2 Southern-blot Ergebnisse:

Zudem könnte es möglich sein, daß einige mehrfach durch PCR bestätigte ES-Zellklone nicht durch die Southern-blots detektiert werden konnten. Zu allen durchgeführten Southern-blot Experimenten sei folgendes angemerkt: Mit der jeweils neu aus den entsprechenden ES-Zellklonen hergestellten genomischen DNA, die immer mehrfach mit Phenol/Chloroform gereinigt wurde, wurde ein Testverdau mit dem entsprechenden Restriktionsenzym durchgeführt, um für den folgenden Southern-blot die Qualität und die Funktion des Restriktionsenzym mit dieser DNA zu testen.

Die Menge der aufgetragenen genomischen DNA war nie geringer als 15 µg. Bei Southern-blots, die zu Testzwecken für die Mindestmenge an detektierbarer genomischer DNA im Fall von CD22 angefertigt wurden, erwies es sich, daß mit den in dieser Arbeit verwendeten Experiment-Parametern wildtypische Fragmente aus 3 µg genomischer DNA noch gut nachweisen ließen. Diese Tests machen vorallem Sinn im Hinblick darauf, daß das Cd22 Gen ein „single copy“ Gen ist.

Bei der Durchführung des eigentlichen Southern-blots wurde vorallem darauf geachtet, daß der Großteil der verdauten DNA auch tatsächlich auf die Nylonmembran transferiert wurde (mit dem UV-Transilluminator getestet). Auch die bei der Hybridisierung verwendete DNA-Sonde wurde zuvor jeweils noch einmal auf ein Agarose-Testgel aufgetragen, um die Qualität und Menge der DNA nochmals zu überprüfen. Unter der Berücksichtigung der eben erwähnten Details zu den durchgeführten Southern-blots kann man sagen, daß die Ausgangsbedingungen im Rahmen der vorhandenen praktischen Möglichkeiten optimal waren. Dennoch ist wie gesagt durchaus die Möglichkeit gegeben, daß nicht alle ES-Zellklone mit einem korrekten homologen Integrationsereignis detektiert werden konnten. Somit ist dies ein zusätzlicher Parameter, der die gegebene Diskrepanz zwischen PCR positiven ES-Zellklonen und Southern-blot positiven ES-Zellklonen erklären könnte.

4.1.4 Zur Verwendung der verschiedenen embryonalen Stammzelllinien

Die homologe Rekombination bei embryonalen Stammzellen ist heutzutage eine Routinetechnik. Schon 1981 isolierten zwei verschiedene Arbeitsgruppen pluripotente ES-Zellen (Evans und Kaufmann 1981; Martin et al. 1981) aus Mausblastocysten. Durch diese Experimente wurde es möglich durch homologe Rekombination das Genom von ES-Zellen zu verändern. Dies wurde erstmals durch die gezielte Veränderung des HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase)-Locus gezeigt (Doetschman et al. 1987; Thomas und Capecchi 1987).

ES-Zellen werden aus pluripotenten, nicht differenzierten Zellen der inneren Zellmasse von Blastozysten gewonnen. Sie können, nachdem sie wieder in Blastozysten injiziert wurden, zu Körperzellen und Keimbahnzellen differenzieren. Diese Kapazität hängt jedoch entscheidend von den Kulturbedingungen ab (Joyner 1993; Hogan et al. 1994; Torres und Kühn 1997), die die ES-Zellen in ihrem pluripotenten und undifferenzierten Zustand halten sollen. Diese die Differenzierung inhibierenden Signale können durch Nährzellen (zum Beispiel embryonale

Fibroblasten (EMFIs) und durch die Zugabe des „Leucaemia inhibitory factor“ (LIF) zum Kulturmedium (Williams et al. 1988; Pease und Williams 1990) bereitgestellt werden.

In dieser Doktorarbeit wurde bei allen ES-Zellarbeiten eine EMFI-Zellschicht, welche immer bei der Kultivierung von ES-Zellen als Grundlage diente, verwendet. Alle Targetexperimente wurden mit Targetvektoren durchgeführt, die ein Neomycinresistenzgen trugen. Damit diese Zellen mit Geneticin (G418) selektioniert werden können, sollte die EMFI-Nährschicht auch G418-Resistenz besitzen. Daher wurden die EMFIs aus Mäusen isoliert, die schon ein Neomycinresistenzgen im Genom integriert hatten.

Zusätzlich zu dem endogen von den EMFIs produzierten LIF wurde dem ES-Zellmedium LIF zugegeben. LIF als ES-Zellmediumzusatz wurde am Anfang dieser Arbeit aus einer CHO (chinese hamster ovary)-Zelllinie, die mit einem Expressionsvektor für das LIF-Gen stabil transfiziert worden war, gewonnen (CHO-LIF). Die optimale Verdünnung für die meisten CHO-Lif Überstände lag bei 1:100 oder 1:200, in diesen Mengen wurden diese Überstände dann auch dem ES-Zellkulturmedium zugesetzt. Später wurde LIF kommerziell als ESGRO (Chemicon) erworben und pro 500 ml ES-Zellmedienflasche 5×10^5 Units eingesetzt. Bei Testreihen zum Potenzial von CHO-LIF-Überständen die Differenzierung von ES-Zellen zu inhibieren wurde klar deutlich, daß eine Kombination aus EMFIs und exogener LIF Zugabe in oben angegebenen Mengen (gleich aus welcher der beiden erwähnten Quellen) die Ausdifferenzierung der ES-Zellen effizient unterbunden werden konnte.

Aufgrund anfänglicher Problemen bei den Injektionsversuchen mit der C57BL/6-III ES-Zelllinie (keine Nachkommen, nicht chimäre Nachkommen und Trächtigkeit, bei denen die Embryonen offensichtlich wieder resorbiert wurden) lag die Überlegung nahe, die Kulturbedingungen für ES-Zellen zu optimieren. Durch persönliche Information aus verschiedenen Quellen (z.B. Phillip Yu; ehemals MPI in Freiburg) wurde uns mitgeteilt, daß Medien und Medienzusätze, die in mit Spülmitteln (z.B. Tensiden) behandelten Glasgefäßen gelagert werden, nicht für die Kultur von ES-Zellen geeignet seien und eventuell sogar essentielle Faktoren (Pluripotenz, Potenzial Keimbahntransmission zu bewirken) negativ beeinflussen könnten. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde für die Kultur von ES-Zellen und EMFIs nur Medien und Zusätze aus hauseigenen Mitteln verwendet. Nun entschlossen wir uns DMEM-Medium, PBS, Glutamin, β -Mercaptoethanol, Penicillin und Streptomycin von Gibco/Invitrogen zu beziehen. Die Medien für die Zellkultur wurden nur in Plastikgefäßen, die original von Gibco/Invitrogen geliefert wurden hergestellt. Somit konnte eine Kontamination mit Spülmittelzusätzen oder Ähnlichem vermieden werden.

Traditionelle knock out Experimente wurden meist mit ES-Zellen des 129 Mausstamms durchgeführt, um danach mit dem stabileren C57BL/6 Mausstamm zurückgekreuzt zu werden. Dies hatte historische und praktische Gründe, da 129 Mäuse sich in der Regel nicht gut fortpflanzen, teils eine abnorme Anatomie (Wahlsten et al. 1992), Immunologie (Crawley et al. 1997) und Verhalten (Hospital 2001) zeigen. Daher ist die oben angesprochene Rückkreuzung Usus geworden. Diese Strategie birgt allerdings diverse Nachteile: die Mäuse haben nach der Rückkreuzung einen gemischten genetischen Hintergrund aus 129 und C57BL/6.

Zudem werden die Experimente durch die Rückkreuzung um mehrere Monate bzw. Jahre verzögert. Aus all diesen Gründen ist es sinnvoll einen einheitlichen genetischen C57BL/6 Hintergrund durch alle Experimente zu wahren. Genau dieses Anliegen verfolgte unsere Arbeitsgruppe, und zudem hat die CD22 defiziente Maus (Nitschke et al. 1997), die für spätere vergleichende Studien herangezogen werden sollte, diesen C57BL/6 Hintergrund. Daher war die ursprüngliche Planung die C57BL/6-III ES-Zelllinie (Ledermann und Bürki 1991) zu verwenden.

Doch auch die C57BL/6-III ES-Zelllinie besitzt verschiedene Nachteile: sie benötigt eine sehr sorgfältige Zellkulturbehandlung, die Generation von chimären Tieren ist wenig effizient und die Verwendung koisogener Blastocysten scheint ein wichtiger Punkt zu sein (Seong et al. 2004). Alle diese Nachteile, die in der Arbeit von Seong et al. ausführlich getestet wurden, können aus eigener Erfahrung durch die Gene Targeting Experimente mit dieser ES-Zelllinie in dieser Arbeit bestätigt werden. Obgleich die C57BL/6-III ES-Zellen, die anfänglich für die Experimente mit dem CD22R130E Konstrukt verwendet wurden, zum Beispiel am M.P.I. für Immunologie in Freiburg mit Erfolg für die Generation von knock out Mäusen verwendet wurden, erwiesen sie sich in unseren Experimenten als problematisch in der Handhabung. Wie in den Abschnitten 3.1.6 und 3.1.7 beschrieben konnten aus allen Gene Targeting Experimenten mit der C57BL/6-III ES-Zelllinie zwei ES-Zellklone mit einer korrekten homologen Integration verifiziert werden (IC1D8 und IB8). Die geringe Anzahl aus 5100 getesteten ES-Zellklonen wurde schon unter 4.1.3.1 und 4.1.3.2 diskutiert.

Die Aufschlüsselung der einzelnen Ergebnisse aller Injektionsexperimente wurde schon im Ergebnisteil unter 3.1.9 aufgeführt. Hierbei sind drei Punkte getrennt voneinander zu behandeln. Die Injektionen mit den zwei unterschiedlichen ES-Zellklonen, die Injektionen mit Mutterklonen oder Cre-Subklonen und die unterschiedlichen Injektoren bzw. dadurch bedingten Injektionsbedingungen. Wie man der Tabelle unter 3.1.9 entnehmen kann wurden, weder mit dem Mutterklon IC1D8, noch mit dessen Cre-Subklonen gleich welcher Passagenzahl chimäre Nachkommen generiert. Eben diese Tatsache trifft auch für die Injektionsexperimente zu, welche von Birgit Ledermann am Institut für Versuchstierkunde in Zürich/Irchel durchgeführt wurden.

Hier nun wiederum muß man einen weiteren Punkt aus der Arbeit von Seong (Seong et al. 2004) aufnehmen: der Vorschlag der Verwendung von koisogenen Blastozysten bei Experimenten mit der C57BL/6 ES-Zelllinie. Die Injektionen bei Birgit Ledermann wurden in FVB/NJ-Blastozysten vorgenommen. Es wurde gezeigt, daß der Grad an Chimerismus und Keimbahntransmission von C57BL/6 ES-Zellen deutlich ansteigt, wenn koisogene C57BL/6-Tyr(c)-2J (c2J) anstelle von FVB/NJ (FVB) Blastozysten verwendet werden. Der Chimerismus kann bei Injektion von B6-Zellen in c2J Blastozysten aufgrund der Fellfarbe beurteilt werden, da es sich bei C57BL/6-Tyr(c)-2J (c2J) um einen Albinostamm handelt (Schuster-Gossler et al. 2001). Für künftige Experimente mit BL/6 ES-Zellen könnte die Verwendung dieses Wirtsstammes in Betracht gezogen werden.

Bei den drei durchgeführten Injektionsexperimenten mit Cre-Subklonen des Mutterklons IB8 hingegen konnten aus einem Experiment (mit dem Cre-Subklon CreS4) sechs chimäre Mäuse gewonnen werden. Burkhard Kneitz verwendete für seine Experimente BALB/c Blastozysten, welche auch nicht koisogen zu den

C57BL/6 ES-Zellen sind. Somit kann man hier die Aussage treffen, daß nur mit dem Cre-Subklon Cre-S4 des ES-Zellmutterklons IB8 chimäre Tiere generiert werden konnten. Der Tatsache, daß die Generation von chimären Tieren mit der C57BL/6-ES-Zelllinie wenig effizient ist (Seong et al. 2004) kann durch die Ergebnisse dieser Arbeit auch zugestimmt werden.

Ein weiterer eminent wichtiger Punkt ist das Alter der injizierten ES-Zellklone, das direkt mit der Passagenzahl (und somit der Zeit in Zellkultur) korreliert. Verschiedene Studien zeigen, daß die Eigenschaft von ES-Zellen zu chimären Tieren und Keimbahntransmission beizutragen mit zunehmendem Alter der Zellen in Kultur abnimmt. In einer Studie wurde diese Tatsache mit der Zunahme an Aneuploidie von lange Zeit in Kultur gehaltenen ES-Zellen korreliert (Longo et al. 1997). Dieser Aspekt würde für eine Karyotypanalyse vor den aufwendigen Gene Targeting Experimenten sprechen. Diese Möglichkeit bestand jedoch nicht in unserem Labor. Eine weitere Studie ging auch auf die altersabhängige Abnahme des Potenzials von ES-Zellen zu Chimärismus und Keimbahntransmission beizutragen ein (Fedorov et al. 1997). Dieser Punkt scheint den Ergebnissen aus den in dieser Arbeit durchgeführten Injektionsexperimenten zu widersprechen. Es wurden drei Injektionen mit ES-Zellklonen durchgeführt, die eine niedrigere Passagenzahl, als Cre-S4 von P₂₇ hatten, die jedoch keine chimären Tiere zum Ergebnis hatten. Zudem besaßen die beiden anderen Cre-Subklone aus dieser Injektionsreihe eine niedrigere Passagenzahl (P₂₅ und P₂₆), dennoch konnten nur mit dem P₂₇ Cre-Subklon chimäre Tiere generiert werden. Solche scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse wurden schon in anderen Studien beobachtet (Fedorov et al. 1997, Nagy et al. 1993). Hier wurde belegt, daß durch das Herausgreifen einzelner Subklone diese bei höheren Passagenzahl ihr Potenzial zu Chimärismus und Keimbahntransmission beizutragen wieder gewannen. Dieser Punkt beruht wahrscheinlich auf der Heterogenität der einzelnen ES-Zellkolonien, der zur Folge haben mag, daß einige ES-Zellen angereichert werden, die noch einen korrekten euploiden Chromosomensatz besitzen.

Der Grad des Chimärismus bei Verwendung der C57BL/6 Zelllinie ist laut verschiedenen Studien eher niedrig anzusiedeln (Seong et al. 2004, Schuster-Gossler et al. 2001, Auerbach et al. 2000). Bei dem einen Wurf, der aus der Injektion des Cre-Subklons S4 hervorging war der Chimärismus jedoch hoch. Vier von diesen Tieren waren Weibchen und zwei Männchen, wobei der Grad des Chimärismus von 50-90 % variierte. Das Geschlechterverhältnis hingegen liegt sogar unter einem als für diese ES-Zelllinie als normal angenommenen Wert von 1:1 (Männchen zu Weibchen). Die Tatsache, daß C57BL/6 Tiere sich gut verpaaren lassen, und eine hohe Anzahl von Nachkommen haben (Seong et al. 2004) konnte durch diese chimären Tiere, die mit hauseigenen C57BL/6 Tieren verpaart wurden, bestätigt werden. Aus allen Verpaarungen mit diesen Tieren gingen über 120 Nachkommen hervor, von denen jedoch kein einziges Keimbahntransmission aufwies. Somit können die Erfahrungen aus der Studie von Seong et al. über eine gute Keimbahntransmission bei Verwendung der C57BL/6 ES-Zelllinie nicht bestätigt werden.

Aus diesem Grund beschloß unsere Arbeitsgruppe weitere in unserem Labor vorhandene (BALB/c), oder leicht zu organisierende ES-Zelllinien (E14Tg2a, von Dr. Kai Schuh bezogen) zu verwenden. Wie unter 3.1.12 beschrieben führten die Targetexperimente mit dem ursprünglichen CD22R130E Targetvektor und der Balbl

ES-Zelllinie (Noben-Trauth et al. 1996) zu keinem einzigen PCR positiven ES-Zellklon aus 1900 gescreenten ES-Zellklonen. Die möglichen Ursachen für dieses Ergebnis wurden schon unter 4.1.1 näher erläutert. Ein weiterer Kandidat war die E14Tg2a (Kuehn et al. 1987) ES-Zelllinie. Alle Experimente mit der E14Tg2a ES-Zelllinie (genetischer Hintergrund 129/ola) wurden mit dem verlängerten R130E-Targetvektor (Targetvektor 2), der mit einem 129/ola DNA-Template um 2,3 Kb in 5'-Richtung verlängert wurde, um den isogenetischen Anteil des Targetvektors zu erhöhen, durchgeführt (siehe 3.1.13). Durch von mir durchgeführte Sequenzvergleiche des Cd22-Gens stellte es sich heraus, daß das Cd22-Gen der E14Tg2a ES-Zelllinie dem der C57BL/6 Zelllinie näher verwandt ist als der BALB/c Zelllinie. Somit erschien die E14Tg2a ES-Zelllinie als ein geeigneter Kandidat für neue Targetexperimente. Trotz des anderen genetischen Hintergrundes korrelierte bei den drei hierbei durchgeführten Targetexperimenten die Zahl der PCR positiven Klone und schließlich durch Southern-blot als korrekt, im Sinne eines richtig integrierten Targetvektors, bestätigten ES-Zellklone weitaus besser, als bei den Experimenten mit der C57BL/6-III ES-Zelllinie. Beim dritten Targetexperiment wurden dann tatsächlich aus 830 gescreenten Klonen zwei ES-Zellklone (VA6 oder XVA4) durch eine zweite Target-PCR und darauffolgende Southern-blots bestätigt, womit für diesen einen Fall eine 100 %ige Korrelation auftrat.

Die folgenden Blastozysteninjektionen wurden von Dr. Burkhard Kneitz und Bettina Holtmann (Labor Prof. Sendtner) durchgeführt. Die verwendeten Blastozysten stammen hierbei jeweils von C57BL/6 Weibchen, wobei die Verwendung von koisogenen Blastozysten bei nicht C57BL/6 ES-Zellen nicht als zwingend angesehen wird. In den ersten sechs Experimenten beschloßen wir Cre-Subklone (P₂₃₋₂₅), die schon als korrekt charakterisiert vorhanden waren, der beiden Mutterklone zu injizieren. Doch gleich von welchem Injektor diese Experimente durchgeführt wurden, ergaben sie keinerlei chimäre Nachkommen. Aus diesem Grund lag die Überlegung nahe auf die weniger durch Zellkultur belasteten Mutterklone (P₁₈₋₂₀) zurückzugreifen. Für das Alter der ES-Zellen und die damit verbundenen Nachteile treffen hier natürlich die gleichen Aspekte, wie für die C57BL/6 ES-Zelllinie zu. Bei den nun folgenden vier Injektionsexperimenten gingen tatsächlich aus drei verschiedenen Versuchen insgesamt fünf chimäre Tiere hervor. Im Vergleich zur C57BL/6 ES-Zelllinie war der Grad des Chimarismus tatsächlich höher, wie es für eine 129 ES-Zelllinie vorhergesagt wird. Drei der Tiere besaßen 80 %, eines 70 % und eines 50 % Chimarismus. Auch das Geschlechterverhältnis von drei Männchen zu zwei Weibchen entspricht dem, welches man für eine 129 ES-Zelllinie erwarten würde.

Bei den folgenden Verpaarungen mit hauseigenen C57BL/6 Tieren ergab es sich, daß das Männchen und das Weibchen (je 80 % Chimarismus) aus dem ersten Injektionsexperiment (mit dem Mutterklon XVA4) keinerlei Nachkommen generierten. Das Weibchen aus dem zweiten (50 % Chimarismus aus dem Mutterklon VA6) und die Männchen aus dem vierten Injektionsexperiment ergaben bei ersten Verpaarungen mit C57BL/6 Tieren 21 schwarze Nachkommen (keine Keimbahntransmission!). Nur das 80 % chimäre Tier aus dem letzten Injektionsexperiment brachte dann doch noch 15 agouti Nachkommen hervor. Da E14Tg2a (agouti Fellfarbe) zusammen mit C57BL/6 (schwarze Fellfarbe) verwendet worden waren, bedeutet dies eine erfolgreiche Keimbahntransmission.

Der nächstliegende Schritt war nun die verwendeten Target-PCRs mit genomischer Schwanz-DNA dieser Tiere zu testen. Zusätzlich wurden interne PCRs für das

Neomycinphosphotransferase-Gen ausgetestet. In der Tat konnten einige positive PCR-Ergebnisse gewonnen werden. Bei weiteren Versuchen diese PCR Ergebnisse zu reproduzieren stellte es sich heraus, daß dies nicht möglich war. Somit ist die Möglichkeit gegeben, daß es sich bei den positiven PCR Ergebnissen um Artefakte aufgrund von Kontaminationen handelte. Nach diesen unklaren PCR-Ergebnissen beschloß die mir nachfolgenden Doktorandin Anja Hoffmann, sowohl die F1 Generation, als auch die F2 Generation mit der Primerpaarung tk3'-2/CD22IN5AS1 und tk3'-3/1432 (entsprechend der verwendeten Target-PCR) zu testen. Auch diese PCR Experimente ergaben keine positiven Resultate. Zudem beschloß Anja Hoffmann nochmals mit Schwanz-DNAs der agouti Tiere den ursprünglichen BamHI Southern-blot (mit der 1,6Kb/HindIII-Sonde) zur Bestätigung der ursprünglichen Mutterklone zu wiederholen. Dieser Southern-blot zeigte jedoch nur das 6 Kb wildtypische Fragment bei allen getesteten agouti Tieren. Als letzter Test wurde von der Technischen Assistentin Carolin Dix ein FACS-Experiment mit Tieren der F2 Generation (vermeintlicher Genotyp: CD22R130E/CD22^{-/-}) durchgeführt. Bei diesem FACS-Experiment wurden Knochenmark- und Milzzellen mit einer α 2,6 Sialinsäure-SA Probe angefärbt, um im Vergleich zu entsprechenden Wildtypzellen die Mutation, die zu einem Bindungsverlust für α 2,6Sialinsäure führen sollte, zu bestätigen. Es war hierbei jedoch kein Unterschied der F2 Generation zu Wildtypmäusen zu sehen.

Alle diese Ergebnisse zusammengenommen lassen nur eine Vermutung zu. Die verwendeten E14Tg2a ES-Zellmutterklone (VA6 oder XVA4) wurden durch mehrmalige Screen-Target-PCR, Bestätigungs-PCR aus verschiedenen Zellkulturstadien, Southern-blot und auch spezifische Mutations-PCR und Sequenzierung der R130E-Mutation mit Hilfe einer für die Selektionskassette spezifischen und geschachtelten PCR bestätigt (siehe 3.1.13 und 3.1.14). Vor den Injektionsexperimenten waren diese ES-Zellklone somit sehr gut verifiziert. Daher ist der ungewöhnliche Fall eingetreten, daß der in den ES-Zellen korrekt integrierte Targetvektor bis zur Generierung der chimären Tiere wieder verloren gegangen ist. Dieser Fall ist in der Literatur eher weniger berichtet, da dies zum einen ungewöhnlich ist, und zum anderen natürlich kein berichtenswertes Ergebnis darstellt.

An welcher Stelle und wodurch der Verlust eines korrekt in das ES-Zellgenom integrierten Targetvektors zustande kommt, darüber kann hier nur spekuliert werden. Eine durchaus wahrscheinliche Möglichkeit mag in der Heterogenität einer jeden ES-Zellkolonie liegen. Wie schon oben für die Euploidie beschrieben, könnte auch hier der Fall auftreten, daß ausgerechnet eine gewisse Anzahl von ES-Zellen zur Injektion ausgewählt wurden, die einen wildtypischen Genotyp hatten. Wenn diese Zellen dann zudem noch in die Keimbahn gewandert sind, könnten eventuell nur Wildtyptiere aus solch einem Experiment resultieren. Dennoch kann wenigstens die Aussage getroffen werden, daß die Wahl der E14Tg2a ES-Zelllinie, was die Kultivierbarkeit, die Generierung von chimären Tieren und die Keimbahntransmission angeht, eine gute Wahl war.

4.1.5 Neuere Ergebnisse über die Funktion der Ligandenbindung von CD22

Während der Anfertigung dieser Doktorarbeit wurden verschiedene Studien zum Einfluß von CD22 auf ein Knochenmark-homing Effekt veröffentlicht. Es muß jedoch betont werden, daß es sich hierbei immer um in vitro Versuche oder in vivo Versuche mit rekombinatem CD22-Fc Protein handelte, und somit die Generierung einer CD22R130E knock in Maus immer noch von hoher Wichtigkeit ist.

Schon bei ersten Analysen der CD22 defizienten Mäuse war die spezifische Reduktion von reifen B-Zellen (IgD^{hi}) im Knochenmark dieser Tiere ein bis dahin unerwartetes Ergebnis, obgleich die Zellzahl in den anderen peripheren lymphatischen Organen normal war (Nitschke et al. 1997). Die ersten konkreten Hinweise darauf, daß die fehlende B-Zellpopulation im Knochenmark von CD22 defizienten Mäusen tatsächlich auf einen „homing“ Effekt zurückzuführen ist (und nicht auf andere Mechanismen, wie z.B. eine reduzierte Lebensspanne CD22 defizienter B-Zellen) resultierte aus adoptiven Transferstudien. Das Knochenmark von RAG2 defizienten Mäusen wurde nach Injektion von wildtypischen B-Zellen im Vergleich zu CD22 defizienten B-Zellen von ersteren zweifach höher wiederbesiedelt (Nitschke et al. 1997). Falls nun CD22 direkt mit dem homing in das Knochenmark zu tun hätte, war der Rückschluß, daß im Knochenmark Liganden für CD22 exprimiert sein müßten. Dies wurde erstmals, auch schon zu Beginn dieser Doktorarbeit, mit rekombinanten CD22-Fc Protein durch färben von Gewebeschnitten gezeigt. Hierbei zeigte es sich, daß sialysierte Liganden auf Endothelzellen sinusoider Strukturen des Knochenmarks, aber nicht auf den Endothelzellen anderer Gewebe zu finden waren (Nitschke et al. 1999). In dieser Studie konnte auch durch in vivo Injektion des CD22-Fc Proteins folgendes gezeigt werden: das Knochenmark wurde nach 24h um 50% weniger von reifen B-Zellen besiedelt, während diese B-Zellzahlen in der Milz nicht verändert waren (Nitschke et al. 1999).

Durch zwei weitere Studien wurde ein direkter Zusammenhang zwischen einer Cis-Interaktion von CD22 mit Sialinsäureliganden und dessen Signalleitung hergestellt. Einmal wurde ein CD22 Protein mit einer mutierten α 2,6 Sialinsäure bindenden Domäne in einer CD22 defizienten Zelllinie exprimiert (Jin et al. 2002), und zum anderen wurde ein CD22 spezifisches Sialinsäureanalogon, daß mit hoher Spezifität Ligandenbindung inhibiert, verwendet (Kelm et al. 2002). In beiden Fällen war CD22 weniger Tyrosin phosphoryliert, konnte weniger SHP-1 rekrutieren und das Calciumsignal war nach IgM Stimulation höher. Somit läßt dies den Schluß zu, das Ligandenbindung in cis CD22 Tyrosin Phosphorylierung stimuliert und die Signalleitung inhibiert.

Welche Liganden auf der B-Zelloberfläche kommen nun als potentielle Liganden für CD22 in Frage? Bisher lag die Betonung bei der Antwort dieser Frage auf der Ligandenbindung in der Hauptfunktion als Isolation des CD22 Moleküls von IgM. Eine Störung einer solchen Interaktion würde allerdings zu einer erhöhten Phosphorylierung von CD22 führen. Somit würden vielleicht eher die als positive Regulatoren bekannten Moleküle, wie IgM und CD45 (welches Lyn dephosphoryliert und aktiviert), als Hauptliganden für CD22 in Frage kommen. Tatsächlich gibt es Hinweise darauf, daß CD22 eine Sialinsäure abhängige Interaktion mit IgM eingeht (Gerlach und Nitschke, unveröffentlicht). Die Einflußnahme von in trans-gebundenen

Liganden wurde 2002 durch eine Studie von Lanoue et al. gezeigt. Hierbei wurden B-Zellen mit Hilfe einer Zielzelle mit Antigen auf der Oberfläche aktiviert. Wurde nun zusätzlich 2,6 Sialinsäure auf der Zielzelle koexprimiert war diese Aktivierung vermindert. Eine Interpretation wäre, daß durch den Zell-Zellkontakt in die Mikroumgebung von IgM mehr CD22 angesammelt werden würde. Eine mögliche Funktion einer CD22-Sialinsäure Interaktion dieser Art könnte die Dämpfung des B-Zellsignals durch Autoantigen auf der Zielzelle sein (Lanoue et al. 2002). Dies wiederum könnte in einem Mikromilieu auftreten in dem gehäuft B-Zellen aufeinandertreffen, wie zum Beispiel primäre Follikel. Diese Idee wird noch dadurch unterstützt, daß in der Regel von den meisten Mikroorganismen keine Sialinsäure exprimiert wird (Crocker und Varki 2001).

4.2 Generierung einer SiglecG knock out Maus

Die Parameter, die für die Generierung der CD22R130E Maus diskutiert wurden, was die Konstruktion des Targetvektors und die Verwendung von ES-Zellen angeht, treffen zum Großteil auch für die Generierung der SiglecG knock out Maus zu. Im Labor von Paul Crocker wurde das Gen für das murine SiglecG kloniert. In dessen Labor (von Sheena Kerr) wurde auch auf der Basis des pKStkneoloxp-Vektors ein Kontroll- und ein Targetvektor ausgehend von einer BALB/c-DNA kloniert (isogene DNA zu der verwendeten Balb ES-Zelllinie; te Riele et al. 1992), letzterer sollte dann für die folgenden Gene Targeting Experimente verwendet werden. Die Strategie für die Gene Targeting Experimente für einen SiglecG knock out basierten auf der Verwendung der Balb (Noben-Trauth et al. 1996) ES-Zelllinie (aus BALB/c Mäusen), da hiermit sehr gute Erfahrungen vorlagen, was die Stabilität ihrer Pluripotenz und Keimbahntransmissionspotenzials angeht.

Der SiglecG Targetvektor (und zusätzlicher Kontrollvektor) wurde von Sheena Kerr als klassischer knock out Austauschvektor (Replacement vector) kloniert (s. 3.2). Hierbei wurde ein kurzer Arm der homologen Rekombination (1,2 Kb) zwischen die Herpes Simplex Thymidinkinase-Gen (Tk) und die Neomycinphosphoglycerinkinase-Gen (Neo), und ein langer Arm der homologen Rekombination (3,2 Kb) 3' aufwärts des Neo-Gens, welches von zwei gleichorientierten LoxP Sequenzen flankiert ist, in den pKStkneoloxp-Vektor kloniert. Somit addieren sich die homologen Bereiche auf eine Gesamtlänge von 4,4 Kb. Durch die dann ein Abschnitt von Exon2 und den größten Abschnitt von Exon3 ersetzenden Neo-Kassette sollte die extrazelluläre V-set Ig-Domäne, die die Bindungseigenschaften von SiglecG mit Sialinsäure ausmachen, eliminiert werden. Somit liegt der Gesamthomologiebereich innerhalb der empfohlenen Länge von 10 Kb, und der kurze Arm der homologen Rekombination deutlich über der Mindestlänge von 0,5 Kb (Hasty et al. 1992, Deng und Capecchi 1992).

Im Fall des SiglecG knock outs wurde im Gegensatz zu der Strategie, die bei der CD22/R130E knock in Maus angewandt wurde, die Methode der Positiv-Negativ-Selektion (Mansour et al. 1988) gewählt. Diese Methode stellt sicher, daß ES-Zellklone die das Targetkonstrukt korrekt homolog integriert haben, durch das Vorhandensein des Neomycin-Phosphotransferasegens und Verlust des HSV-Tk-Gens positiv selektioniert (durch G418- und Gancyclovir-Resistenz) werden können. Die ES-Zellklone, welche einer zufälligen Integration unterworfen waren hingegen

beinhalten noch beide Selektionskassetten, da diese Art der Integration über die linearisierten Enden des Vektors vonstatten geht, und können somit einer negativen Selektion durch Zugabe von Gancyclovir unterworfen werden, wodurch diese ES-Zellklone sterben. Zur Berechnung der Anreicherung von korrekt getargeten ES-Zellklonen in dieser Art von Experimenten benötigt man eine Zellkulturschale, die nur mit G418 Medium kultiviert wird. Die Anzahl der G418 resistenten ES-Zellklone dividiert durch die Anzahl an ES-Zellklonen auf einer Zellkulturschale unter Doppelselektion ergibt den Anreicherungsfaktor. Bei den von mir durchgeführten Targetexperimenten mit dem SiglecG Targetvektor lag dieser Anreicherungsfaktor bei 20.

Mit Hilfe des klonierten Kontrollvektors wurde vor den eigentlichen Gene Targeting Experimenten eine zuverlässige Target-Screen-PCR entwickelt (s. 3.2). Die jeweiligen Einzeltest-PCRs, sowie alle möglichen geschachtelten Kombinationen, funktionierten unter den gewählten PCR-Bedingungen auf Anhieb sehr gut (s. 3.2). Daher wurde nun mit den Targetexperimenten begonnen. Beim ersten Targetexperiment wurden 480 Balb1 ES-Zellklone gescreent, von denen 15 durch die gewählte geschachtelte Target-PCR als positiv identifiziert wurden. Diese Klone konnten jedoch nicht durch weitere PCRs aus anderen Zellkulturstadien bestätigt werden. Daher wurde ein zweites Targetexperiment mit 600 gescreenten Balb1 ES-Zellklonen durchgeführt. Hier nun konnten 27 PCR positive ES-Zellklone identifiziert werden. Von diesen wiederum konnten sieben durch weitere PCRs aus anderen Zellkulturstadien bestätigt werden. Somit trifft auch für die Experimente mit dem SiglecG Targetvektor dasselbe zu, wie für die PCR-Ergebnisse mit dem CD22R130E Vektor: die Korrelation zwischen den PCR Ergebnissen aus einem ersten Screen und der weiteren Bestätigung dieser ES-Zellklone ist relativ schlecht. Dies mag, wie schon beim CD22R130E Konstrukt erläutert, unter Umständen mit dem Genlocus, dessen Struktur, sowie der Zugänglichkeit desselben abhängen. Wobei diese Erklärungen sich nicht durch die Erfahrung anderer Arbeitsgruppen untermauern lassen. Ein Großteil der falsch positiven PCR-Ergebnisse mag auch auf Kontaminationen durch zuvor verwendete Plasmide und PCR-Fragmente herrühren. Diese Möglichkeiten sind jedoch nie ganz auszuschließen und können die PCR-Ergebnisse nur zum Teil erklären, umso mehr, da eigentlich immer darauf geachtet wurde die PCR-Utensilien von Kontaminationen frei zu halten.

Mit aus den sieben bestätigten ES-Zellklonen isolierter genomischer DNA wurden nun Southern-blots durchgeführt (s. 3.2.2). Auf allen Autoradiogrammen dieser Southern-blots war lediglich das wildtypische Fragment zu sehen. Das bedeutet, dass die untersuchten ES-Zellklone keine korrekte Integration des Targetvektors durchlaufen hatten. Das die übrigen Versuchsvoraussetzungen (Target-PCR, Wahl der Southern-blot Sonde) dennoch korrekt waren, bewahrheitete sich durch die Versuche, die von der mir nachfolgenden Doktorandin Anja Hoffmann durchgeführt wurden. Bei hier durchgeführten Targetexperimenten, wie sie ursprünglich von mir geplant wurden, konnten zwei ES-Zellklone (aus 480 gescreenten ES-Zellklonen) mit einer korrekten homologen Integration isoliert werden. In diesem Fall wurde ein PstI-Southern-blot für die finale Analyse dieser ES-Zellklone verwendet. Bei den folgenden Injektionsexperimenten konnten dann auch chimäre Tiere generiert werden.

Somit verliefen die nach meiner Doktorarbeit durchgeführten Folgeexperimente an dem SiglecG Projekts bis zu diesem Zeitpunkt erfolgsversprechend.

4.3 Generierung einer B-Zell spezifischen SMAD2 k.o. Maus

Ein weiteres großes Projekt dieser Doktorarbeit entstand in einer Zusammenarbeit mit Dr. Burkhard Kneitz (Physiologische Chemie I, Biozentrum). Die grundlegende Idee bestand darin den TGF- β (Transforming growth factor)/SMAD2 Signalweg im Immunsystem, und speziell in B-Zellen, zu untersuchen. Dr. Burkhard Kneitz hatte Zugang zu einer durch Gene Targeting generierten Smad2/Exon2 geflochtenen Maus (Leihgabe von Erwin Böttinger, Raju Kucherlappati) und zu einer CD19-Cre Maus (Rickert und Roes 1995;1997), daher besaß er die Möglichkeit durch konditionelle Mutagenese mittels des Cre-LoxP Systems eine B-Zell spezifische SMAD2 knock out Maus (bSmad2^{-/-}) zu generieren. Durch diese Vorgehensweise wird ein Einfluß von anderen Geweben und Organen ausgeschlossen, der den Phänotyp oder die Dateninterpretation beeinflussen könnte.

Die Analyse der bSmad2^{-/-} Maus zeigte eine klar definierte Rolle von SMAD2 innerhalb des TGF- β Signalweges. Klare Veränderungen der bSmad2^{-/-} Maus zeigten sich, im Vergleich zu Kontrolltieren, bei Zellen der Payerschen Plaques (PP), B1-Zellen in peritonealen Lavagen und auch im IgA Level dieser Tiere, auch nach Immunisierungsexperimenten. Der für TGF- β beschriebene Effekt der Proliferationshemmung von aktivierten B-Zellen (Kehrl et al. 1986; 1989; 1991) war bei aktivierten B-Zellen der bSmad2^{-/-} Mäuse auch zu sehen.

Die bSmad2^{-/-} Maus hat einen gemischten genetischen C57BL/6 / 129 Hintergrund. Diese Tatsache ist durch die Generierung der Smad2/Exon2 geflochtenen Maus mit der WW6 ES-Zelllinie (75% 129/Sv, 20% C57BL/6, 5% SLJ) (Ioffe et al. 1995) unter Verwendung eines 129/ola λ basierenden Targetingvektors, und nachfolgender Rückkreuzung mit C57BL/6 Mäusen, bedingt. Diese wurde in vivo mit einer CD19-Cre Maus gekreuzt. Somit entstand eine B-Zell spezifische SMAD2 k.o. Maus (bSmad2^{-/-}). Die CD19-Cre Maus (Rickert und Roes. 1997), die nur einem mutierten Allel besitzt (also hemizygoten Tiere), exprimiert cre unter Kontrolle des B-Zell spezifischen endogenen CD19-Gens (Zhou et al. 1991). Wird diese Maus mit einer anderen Maus gekreuzt, die eine LoxP flankierte Sequenz im Genom trägt, wird diese mit einer Effizienz von bis zu 95 % (bei Milzzellen) deletiert (Rickert und Roes 1997). Diese Strategie für die Untersuchung der Rolle des TGF- β Signalmediators SMAD2 ergab sich auch aus der Tatsache, daß die SMAD2 Defizienz in Mäusen (Weinstein et al. 1998; Heyer et al 1999) schon im Embryonalstadium lethal ist.

Mittels Southern-blots verschiedener B-Zellpräparationen aus bSmad2^{-/-} Mäusen konnte eine circa 90 %ige Deletion von Smad2 in diesen festgestellt werden (durchgeführt von Dr. Burkhard Kneitz). Dies liegt im Rahmen der Werte, die in der Originalveröffentlichung von Rickert und Roes angegeben wurden (Rickert und Roes. 1997). Auch die Expression des Smad2 Proteins in den bSmad2^{-/-} Tieren ist nahezu unterdrückt. Als funktionaler Assay wurde hierfür ein Western-Blot mit LPS/ TGF- β stimulierten Milzzellen durchgeführt.

Eines der auffälligsten Charakteristika der bSmad2^{-/-} Tiere ist ein reduzierter Basislevel von IgA (wie auch von IgG1 und IgG3). Auch nach Immunisierungsexperimenten mit TNP-Ova, einem thymusunabhängigen Antigen, ist die Reduktion der IgA Antwort sehr deutlich (10 –fach niedriger als bei Kontrolltieren). Die IgG1 und IgG3 Antwort hingegen ist sogar leicht erhöht. Diese Befunde

bestätigen die Ergebnisse der TGF- β 1 defizienten Maus (van Ginkel et al. 1999), bei denen ein partieller Block in der IgA Produktion berichtet wurde. Zudem wurde schon berichtet, daß andere Faktoren, wie IL-2 oder IL-5, einen synergistischen Effekt zu TGF- β für die IgA Produktion besitzen (Coffman et al. 1989, Sonoda et al. 1998). Somit paßt die Teilreduktion der IgA Produktion der bSmad2^{-/-} Tiere genau zu diesen Befunden. Somit scheint SMAD2, wie schon für TGF- β berichtet (Cazac und Roes 2000), eine kritische Schaltstelle in der frühen Phase der Entwicklung von IgA produzierenden Plasmazellen zu sein. Die oben erwähnten synergistischen Faktoren IL-2 und IL-5 würden dann eher eine Rolle bei der Stimulation der Reifung zu IgA sekretierenden Plasmazellen spielen, wie es schon in früheren Studien vorgeschlagen wurde (Coffman et al. 1989, Sonoda et al. 1989).

Die Analyse von B-Zellsubkompartimenten ergab auch diverse Unterschiede der bSmad2^{-/-} Tiere im Vergleich zu Kontrolltieren. Schon bei den absoluten Zellzahlen der bSmad2^{-/-} Tiere fiel eine Erhöhung der Zellzahlen der Payerschen Plaques (PP) auf. Bei darauf folgenden FACS-Experimenten zeigten diese Zellen schon im Forwardscatter eine Hyperplasie. Auch die absoluten B-Zellzahlen (anti-B220 Färbungen) der PP waren um das circa dreifache erhöht. Dieses Phänomen ging einher mit einer erhöhten Anzahl aktivierter B-Zellen, was deutlich wird in einer FACS-Anfärbung mit anti-B220 und zusätzlich mit anti-IgM und anti-IgD (von 8 % auf >20 %). Dieser Befund einer vergrößerten B220+, IgM-, IgD- Zellpopulation weist auf einen aktivierten Status dieser PP-Zellen ohne einen externen Einfluß (z.B. einer Immunisierung) hin. Somit scheint Smad2, wie schon für TGF- β gezeigt (Cazac und Roes 2000), einen Einfluß auf die Inhibition von B-Zellantwort in dem Kompartiment der Payer's Plaques zu haben. Aufgrund der Reduktion des IgA-Serumlevels und der IgA Immunantwort von bSmad2^{-/-} Mäusen erschien es sinnvoll zusätzlich den Status der IgA-Produzenten in den PP zu untersuchen. Umso mehr, da bekannt ist das diese normalerweise ein Ort hoher Anreicherung von IgA sezernierenden B-Zellen sind (Butcher et al. 1982). Diese Fragestellung wurde mit einem ELISPOT-Experiment von Milzzellen und PP-Zellen angegangen, durch das man Antikörper sezernierende Zellen bestimmen kann. Es wurden IgM und IgA sezernierende Zellen bestimmt. Wie zu erwarten gab es mehr IgM sezernierende Zellen in der Milz als in PP, wohingegen aus PP mehr IgA sezernierende Zellen gewonnen wurden. Bemerkenswert war, daß der Anteil IgA sezernierender Zellen in den PP der bSmad2^{-/-} Tiere um das circa 7-fache niedriger als bei den Kontrolltieren ist. Die Erniedrigung von IgA sezernierenden Plasmazellen in den PP paßt in die Theorie, daß SMAD2 (wie auch für TGF- β gezeigt) eine wichtige Schlüsselfunktion bei der Generierung von IgA sezernierenden Plasmazellen besitzt. Zur Weiterverfolgung der Reduktion von IgA sezernierenden Plasmazellen in den PP war eine weitere Idee, die Expression von Oberflächen-IgA auf B-Zellen in den PP festzustellen. Bei FACS-Färbungen von PP-Zellen mit anti-B220 und anti-IgA konnte jedoch hier kein signifikanter Unterschied zwischen bSmad2^{-/-} Tieren und Kontrolltieren festgestellt werden. Diese Ergebnisse sind allerdings schwer zu interpretieren, da die kommerziell erworbenen IgA Antikörper sehr schlecht funktionierten, was durch diverse Kontrollanfärbungen bestätigt werden konnte.

Auch das B-Zellsubkompartiment des Peritoneums mit Augenmerk auf die B1 Zellen wurde analysiert. Aus der Arbeit von Cazac und Roes (2000) war auch eine klare Erhöhung des B1 Zellpools im Peritoneum der TGF- β -Rezeptor Typell defizienten Tiere zu erkennen. Die Gesamtheit der B1-Zellen stellt den Hauptanteil der Zellen im Peritoneum. Es existieren verschiedene Theorien zur Herkunft und Entwicklung von

B1 Zellen. Eine ist, daß sie im Gegensatz zu konventionellen B-Zellen ontogenetisch schon früh aus der fötalen Leber gebildet werden und in höherem Lebensalter sich selbst erneuern. Doch es existieren auch Daten darüber, daß auch die Milz bei der Generation und vorallem auch dem Überleben der B1 Zellen eine entscheidende Rolle spielt (Wardemann et al. 2002). Dies würde dann eher dafür sprechen, daß die B1 Zellen eventuell doch von konventionellen Vorläufer-B-Zellen aus der Milz abstammen (Arnold et al. 2000), und sich durch eine positive Selektion nach Antigenstimulation aus diesen bilden würden (Hayakawa et al. 1999, Hardy et al. 2000). Diese Zellpopulation stellt einen beträchtlichen Anteil der Serumimmunglobuline (IgM, IgG3 und IgA) zur Verfügung, und sorgen für eine Art „natürliche“ angeborene Immunität (Kantor und Herzenberger 1993). Somit bilden sie einen Brückenschlag zwischen angeborener und erworbener Immunität. Zu dieser Art von Zellen gehören auch die NK T-Zellen, die $\gamma\delta$ T-Zellen und die Marginalzonen B-Zellen (MZ; marginal zone B-cells). All diese Zellen bieten einen frühen, aber nicht dauerhaften Schutz vor Erregern. Diese Lymphozyten besitzen allerdings ein eingeschränktes Rezeptorrepertoire. Wobei eine Theorie hierzu die Meinung vertritt, daß eine positive Selektion zum Beispiel der B1-Zellen durch ihren Antigenrezeptor für häufig vorkommende mikrobielle Strukturen und/oder Autoantigene auftritt (Hayakawa et al. 1999, Lam und Rajewsky 1999).

Betrachtet man die B-1a und B-1b Zellpopulationen des Peritoneums von $bSmad2^{-/-}$ Tieren, so entdeckt man klare Unterschiede bei den $bSmad2^{-/-}$ Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren: eine signifikante Reduktion des T-Zellpools und eine gleichzeitiges Anwachsen des B-1a Zellpools. Diese Ergebnisse konnten durch FACS-Anfärbungen mit anti-B220 und anti-CD5 bestätigt werden. Betrachtet man das reale Verhältnis von B1a-Zellen zu B1b/B2-Zellen so sieht man, daß dieses Verhältnis im Durchschnitt von 1,1 bei Kontrolltieren auf 2,7 bei $bSmad2^{-/-}$ Tieren angewachsen ist (siehe 3.3). Ein Effekt, der für TGF- β beschrieben wurde könnte hierfür mitverantwortlich sein: durch einen „feedback loop“ kann TGF- β die Apoptose von B-Zellen mit beeinflussen (Holder et al. 1992, Lomo et al. 1995), dieser Mechanismus könnte auch bei den $bSmad2^{-/-}$ Tieren gestört sein und somit zu den erhöhten B1a Zellzahlen beitragen.

Zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit an der $bSmad2^{-/-}$ Maus wurde nochmals ein Augenmerk auf bestimmte Milzzellpopulationen gerichtet. Hierbei ging es um die Auflösung von follikulären B-Zellen (FO), Marginalzonen B-Zellen (MZ) und transitionellen B-Zellpopulationen (T1 und T2). Bei den $bSmad2^{-/-}$ Tieren war hier bei den verschiedenen Anfärbungen vorallem eine signifikante Reduktion der Marginalzonen B-Zellen zu beobachten (um circa 50 %, siehe 3.3). Es ist bekannt, daß MZ B-Zellen, ähnlich den B1 Zellen, zu einer frühen Immunantwort auf thymusunabhängige Antigene beitragen (Guinamard et al. 2000, Martin et al. 2001, Martin und Kearney 2000). Erst kürzlich wurde berichtet, daß B1 Zellen bei der Antwort auf thymusunabhängige Antigene im Peritoneum dominieren, während MZ B-Zellen zu einer frühen Antwort gegen im Blut vorhandene thymusunabhängige Antigene beitragen (Martin et al. 2001). Somit könnte es sein, daß MZ B-Zellen bei einer späteren Phase einer Infektion, wenn Pathogene schon im Blut auftauchen, wichtig sind, während B1 Zellen eher eine Rolle bei der Einschränkung der frühen Phase einer Infektion von Bedeutung sind.

Die beiden Populationen der B1 und MZ B-Zellen sind unterschiedlich reguliert. Bei verschiedenen transgenen und knock out Mausmodellen wurde zum Beispiel bei

einer Erhöhung der BCR-Signalstärke eine Expansion der B1 Zellen bei gleichzeitiger Reduktion von MZ B-Zellen beobachtet (Niiri und Clark 2002). Ein ähnlicher Phänotyp scheint bei der bSmad^{-/-} Maus vorzuliegen.

Es ist bekannt, daß TGF- β über einen aktivierten SMAD-Protein-Komplex, der in der Lage ist zusammen mit CBFA3 den IgC α (Immunglobulin- α constant region)-Promoter zu erkennen, einen Klassenwechsel nach IgA in B-Zellen induzieren kann (Shi und Stavnezer 1998). Um nun den Klassenwechsel (CSR; class switch recombination) zu IgA in den bSmad2^{-/-} Tieren genauer zu untersuchen wendete Dr. B. Kneitz eine Methode, die erfolgreich im Labor von Tasuku Honjo (Kinoshita et al. 2001) etabliert wurde, zur Identifikation von sogenannten „circle transcripts“ an. Es ist bekannt, daß Zellen, die einen Klassenwechsel durchlaufen und AID (activation-induced cytidin deaminase, welche ein essentieller Faktor für die CSR ist) exprimieren, diese „circle transcripts“ generieren. Diese wiederum gehen zurück auf zirkuläre DNA, die bei einem Klassenwechsel aus dem schwere Ketten Locus entfernt wird. Diese zirkuläre DNA enthält einen noch aktiven I-Promoter, wodurch I-C μ Transkripte entstehen, die sogenannten „circle transcripts“. Zudem degenerieren diese Transkripte schneller als die zirkuläre DNA und scheinen somit ein guter Marker für das Auftreten eines aktiven Klassenwechsels zu sein, da eine enge zeitliche Kopplung zwischen diesen Ereignissen gewährleistet ist. Bei diesen Experimenten wurde cDNA aus Milzzellen von Kontrolltieren und bSmad2^{-/-} Tieren gewonnen. Die Milzzellen wurden wie in vitro mit LPS und TGF- β stimuliert. Mittels für die α zirkulären Transkripte spezifischen Primer wurden nun PCRs für die „circle transcripts“ angefertigt. Das Ergebnis ist hierbei eindeutig: der Klassenwechsel zu IgA, der durch die Zugabe von TGF- β induziert wird, ist bei den Kontrolltieren klar nachweisbar; die spezifischen Fragmente lassen sich jedoch nicht in den B-Zell spezifischen knock out Tieren (bSmad2^{-/-}) induzieren. Also läßt sich somit auch auf der molekularen Ebene ein klarer Einfluß von SMAD2 auf den IgA Klassenwechsel zeigen.

Faßt man alle gewonnenen Daten aus den hier generierten B-Zell spezifischen Smad2 knock out Tieren zusammen, so kann man zu dem klaren Ergebnis kommen, daß der TGF- β Signalmediator Smad2 eine entscheidende Rolle bei der Weiterleitung von TGF- β Signalen in das Zellinnere von B-Zellen spielt. Hierbei zeigten sich klare Veränderungen, im Vergleich zu Kontrolltieren, bei Zellen der Payerschen Plaques (PP), B1-Zellen in peritonealen Lavagen, im IgA Basislevel und IgA Immunantwort nach Immunisierung mit TNP-Ovalbumin bei den bSmad2^{-/-} Tieren. Der für TGF- β beschriebene Effekt der Proliferationshemmung von aktivierten B-Zellen (Kehrl et al. 1986; 1989; 1991) war bei aktivierten B-Zellen der bSmad2^{-/-} Mäuse hingegen nicht beeinträchtigt.

Da der Phänotyp der bSmad2^{-/-} Maus milder ausfällt, als bei der T β RII-defizienten Maus, könnte es sein, daß andere Smad-Proteine, oder Signalwege den Verlust von Smad2 ausgleichen können.

5. Zusammenfassung

Das Hauptthema der hier vorliegenden Arbeit befaßt sich mit dem B-Zell spezifischen Oberflächenprotein CD22, einem Mitglied der Siglec (Sialinsäure bindende Ig-ähnliche Lektine) Proteinfamilie. Dieses Transmembranprotein besitzt sieben extrazelluläre Immunoglobulin-ähnliche Domänen und kann über die äußerste V-set Domäne seine Liganden: α 2,6 verknüpfte Sialinsäuren binden. CD22 hat eine Transmembrandomäne und eine cytoplasmatische Domäne mit sechs potentiellen Tyrosin Phosphorylierungsstellen, von denen drei eine ITIM-Sequenz (engl. immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) aufweisen. CD22 defiziente Mäuse zeigten eindeutig, daß das Siglec CD22 ein negativer Regulator des BCR-Signals ist. Durch BCR-Kreuzvernetzung wird CD22 tyrosinphosphoryliert, die inhibitorische Tyrosinphosphatase SHP-1 gebunden, aktiviert, und ist nun in der Lage das BCR Ca^{2+} Signal zu inhibieren.

Um die Rolle der CD22Ligandenbindungsdomäne, in vivo zu untersuchen, sollte in dieser Arbeit eine CD22 knock -in Maus erzeugt werden (CD22R130E Maus), in der die Ligandenbindungsdomäne von CD22 durch eine Punktmutation funktionell ausgeschaltet ist. In der hieraus resultierenden Mauslinie sollte dann die B-Zellentwicklung, Signaltransduktion und der Immunstatus analysiert werden. Der Vergleich des Phänotyps der CD22R130E Maus und der CD22 defizienten Maus sollte dann zeigen, wie die Adhäsions- und Signalleitungseigenschaften von CD22 zusammenhängen.

Der „Targeting“ Vektor für die „Gene Targeting“ Experimente wurde von der Arbeitsgruppe Dr. Anton van der Merwe (von Christina Piperi) angefertigt. Ursprünglich wurde ein „Targeting“ Vektor aus genomischer C57BL/6-DNA verwendet, um den genetischen Hintergrund der CD22-defizienten Maus beizubehalten. Dieser Vektor wurde von mir für ES-Zell Transfektionen in der C57Bl/6 ES-Zelllinie verwendet. Aus den Gene Targeting Experimenten mit der C57Bl/6-III ES-Zelllinie konnten zwei ES-Zellklone isoliert werden, die eine korrekte homologe Integration des Targetvektors trugen. Aus einem Blastozysteninjektions-Experiment mit einem Cre-deletierten C57BL/6-III Subklon wurden sechs hochchimäre Mäuse erhalten, mit denen allerdings keine Keimbahntransmission erzielt werden konnte.

Nach Problemen mit Keimbahntransmission von Klonen aus der C57BL/6-III ES-Zelllinie, wurden noch die BALB/c und die E14Tg2a ES-Zelllinie für neue Gene Targeting Experimente verwendet. Die Experimente mit der BALB/c ES-Zelllinie ergaben keine ES-Zellklone mit korrekter homologer Integration, dies beruhte wahrscheinlich auf dem nicht isogenen Hintergrund. Alle folgenden Experimente mit der E14Tg2a ES-Zelllinie (genetischer Hintergrund: 129/ola) wurden mit dem verlängerten R130E-Targetvektor (Targetvektor 2), der mit 129/ola DNA um 2,3 Kb in 5'-Richtung verlängert wurde, um den isogenetischen Anteil des Targetvektors zu erhöhen, durchgeführt. Aus diesen Experimenten resultierten wiederum zwei ES-Zellklone, deren korrekte homologen Rekombination durch Southern Blot bestätigt werden konnten. Bei den darauffolgenden Blastozysten-Injektionsexperimenten mit diesen zwei E14Tg2a Klonen konnten fünf chimäre Tiere gewonnen werden. Ein 80 %ig chimäres Männchen erzeugte eine hohe Anzahl von Nachkommen mit

Keimbahntransmission. Bei der Analyse dieser Tiere trat das Resultat zutage, daß alle diese Tiere mit Keimbahntransmission einen wildtypischen Genotyp besaßen.

Ein weiteres Mitglied der Siglecproteinfamilie, das murine SiglecG (ein Ortholog zu humanem Siglec10), wurde in dieser Arbeit untersucht. In Zusammenarbeit mit dem Labor von Dr. Paul Crocker sollte eine SiglecG knock out Maus hergestellt werden. Die Strategie für die Gene Targeting Experimente für einen SiglecG knock out basierten auf der Verwendung der Balb ES-Zelllinie (aus BALB/c Mäusen), da hiermit sehr gute Erfahrungen vorlagen, was die Stabilität ihrer Pluripotenz und des Keimbahntransmissionspotenzials angeht. Daher wurde im Labor von Paul Crocker (von Sheena Kerr) ein Kontroll- und ein Targetvektor kloniert, mit dem große Teile der ersten und zweiten Ig-Domäne von SiglecG ausgeschaltet werden sollte. Mit diesem Vektor führte ich mehrere ES-Zell Transfektionsexperimente durch. Innerhalb der Zeitspanne meiner Doktorarbeit konnten keine ES-Zellklone mit einem korrekten homologen Integrationsereignis gewonnen werden. Mittels der ursprünglichen Strategie konnte die mir nachfolgende Doktorandin jedoch ES-Zell Klone isolieren, nach Blastozysteninjektion Keimbahntransmission erzielen und somit eine SiglecG-defiziente Maus generieren.

Eine andere Zusammenarbeit kam mit Dr. Burkhard Kneitz (Physiologisches Chemie I, Biozentrum, Universität Würzburg) zustande. Seine Intention war es, die Rolle des TGF- β Signalmediators SMAD2 auf B-Zellebene näher zu untersuchen. Von Erwin Böttinger bekamen wir eine Mauslinie, in der das Smad2-Gen gefloxt ist, die mit der CD19-Cre Maus gekreuzt wurde. So wurde eine B-Zell spezifische SMAD2 knock out Maus (bSmad2^{-/-}) erzeugt. Meine Aufgabe bestand darin, die B-Zellkompartimente und die Immunantworten der B-Zell spezifischen Smad2-defizienten Maus zu analysieren. Faßt man alle gewonnenen Daten aus den hier generierten B-Zell spezifischen Smad2 knock out Tieren zusammen, so kann man zu dem klaren Ergebnis kommen, daß der TGF- β Signalmediator Smad2 eine entscheidende Rolle bei der Weiterleitung von TGF- β Signalen in das Zellinnere von B-Zellen spielt. Hierbei zeigten sich klare Veränderungen, im Vergleich zu Kontrolltieren, eine Erhöhung der Zellzahl in den Peyerschen Plaques (PP), und der B1-Zellen im Peritoneum. Die IgA-Immunantwort war in bSmad2^{-/-} Tieren stark erniedrigt. Der für TGF- β beschriebene Effekt der Proliferationshemmung von aktivierten B-Zellen war bei aktivierten B-Zellen der bSmad2^{-/-} Mäuse hingegen nicht beeinträchtigt.

6. Summary

The main topic of this thesis dealt with the B cell-specific transmembrane protein CD22, a member of the Siglec (Sialic-acid binding Ig-like lectin) protein family. This transmembrane protein possesses seven extracellular domains and is capable to bind α 2,6 sialic acids via its most outer V-set domain. Furthermore there are one transmembrane domain and six potential tyrosine-based phosphorylation motifs, three of which match ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) consensus sequences. CD22 deficient mice clearly showed that the Siglec CD22 is a negativ modulator of BCR signalling. BCR engagement causes tyrosine phosphorylation of CD22, now the inhibitory tyrosine phosphatase SHP-1 is able to bind, is then getting activated and is thus inhibiting the BCR Ca²⁺ signal.

To elucidate the function of the CD22 adhesion domain *in vivo*, especially concerning the connection with CD22 signalling, one main topic of this work was to generate a CD22 knock in mouse (CD22R130E), in order to functionally eliminate the CD22 adhesion domain through a point mutation. The resulting new mouse line should give the opportunity to investigate B-cell development, signal transduction and the immune status of the CD22R130E mouse. The comparison between the phenotypes of the CD22R130E mouse and the CD22 deficient mouse should resolve the interplay of adhesion and signalling of CD22.

The cloning of the targeting vector for the gene targeting experiments was done in the laboratory of Dr. Anton van der Merwe (by Christina Piperi). Basically, the idea was to keep the C57BL/6 genetic background, which was already used to generate the CD22 deficient mouse by Dr. Lars Nitschke (Nitschke et al. 1997). This vector was used by me for the ES cell transfection experiments with the C57Bl/6-III ES cell line. Finally, two ES-cell clones could be identified from gene targeting experiments with the C57BL/6 ES-cell line, which carried a correct homologous integrated target vector. With one Cre-deleted C57BL/6 subclone it was possible to generate six chimaeric animals from one injection experiment, although none of these animals could give rise to germline transmission.

Since occurrence of crucial problems with the germline transmission of C57BL/6-III ES-cell clones, the BALB/c and E14Tg2a ES-cell lines were used for new gene targeting experiments. With the following gene targeting experiments using the BALB/c ES-cell line no homologous recombinants were obtained. This was probably due to the non-isogenic background. All following experiments performed with the E14Tg2a ES-cell line (genetic background: 129/ola) were carried out with the elongated R130E-targeting vector (targeting vector 2). This vector was created by using a genomic 129/ola template, in order to gain a new isogenic 2.3 kb 5'-fragment. These experiments gave rise to two ES-cell clones with a correct homologous recombination event confirmed by southern blot. It was now possible to generate five chimaeric animals out of three injection experiments with these two ES-cell clones. One male animal, with 80 % chimaerism, produced offspring with germline transmission. The analysis of these animals with germline transmission showed that all of them possessed a wildtype like genotype.

This thesis dealt with a further member of the Siglec protein family, the murine SiglecG (an ortholog to human Siglec10). In collaboration with the laboratory of Dr. Paul Crocker a SiglecG knock out mouse was to be generated. The strategy to do the gene targeting experiments was based on the usage of the BalbI ES-cell line (from BALB/c mice), since it possesses well known stability concerning pluripotential and germline transmission potential. In the laboratory of Paul Crocker (by Sheena Kerr) a control and target vector was cloned, which should eliminate a large part of the first and second Ig-domain of SiglecG. I performed different ES-cell transfection experiments with this vector. Within the timecourse of my work it was not possible to gain any ES-cell clones with correct homologous integration events. Later on ES-cell clones, germline transmission and generation of the SiglecG deficient mouse was achieved with the original strategy by the following Phd student.

Another collaboration was evolved by Dr. Burkhard Kneitz (Department of Physiological Chemistry I, Würzburg). His intention was to investigate the meaning of the TGF- β signalmediator SMAD2 in a B-cell specific manner. From Erwin Böttinger we received a mouse line with a floxed Smad2 gene, which was crossed with a CD19-Cre mouse line (Rickert et al. 1997). Thus a B-cell specific SMAD2 knock out mouse (bSmad2^{-/-}) was generated. I had to analyse the B-cell compartments and the immune responses of the B-cell specific SMAD2 knock out mouse. Taking together all data gained with the newly generated B-cell specific SMAD2 knock out mouse showed that the signalmediator SMAD2 is a crucial downstream component of TGF- β signalling in B-cell biology. The crucial differences of bSmad2^{-/-} animals in comparison to control animals were given in an increase of cells of Payers Patches (PP) and B1 cells of peritoneal lavages. The IgA immune response was strongly reduced in bSmad2^{-/-} animals. The well known effect of TGF- β concerning inhibition of proliferation with activated B-cells (Kehrl et al. 1986; 1989; 1991) was not impaired with activated B-cells of bSmad2^{-/-} animals.

7. Literatur

7.1 Originalartikel

Aizawa, H., et al. (2003). Molecular analysis of human Siglec-8 orthologs relevant to mouse eosinophils: identification of mouse orthologs of Siglec-5 (mSiglec-F) and Siglec-10 (mouse Siglec-G). Genomics 82:521-530.

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

Angata, T., and Varki, A. (2000). Cloning, characterization, and phylogenetic analysis of siglec-9, a new member of the CD33-related group of siglecs. Evidence for co-evolution with sialic acid synthesis pathways. J Biol Chem 275:22127-22135.

Arnold, L.W., et al. (2000). Identification of a precursor to phosphatidyl choline-specific B-1 cells suggesting that B-1 cells differentiate from splenic conventional B cells in vivo: cyclosporin A blocks differentiation to B-1 cells. J Immunol 164:2924-2930.

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

Baumann, G., et al. (1986). In vitro characterization of major ligands for Src homology 2 domains derived from tyrosine kinases, from the adaptor protein SHC and from GTPase-activating protein in Ramos B cells. Eur J immunol 24:1799-1807.

Bethesda research Laboratories (1986). BRL pUC host: E. coli DH5 α competent-cells. Bethesda Res Lab Focus 8(2):9.

Bouchard, C., et al. (1997). Effect of TGF-beta1 on cell cycle regulatory proteins in LPS-stimulated normal mouse B lymphocytes. J Immunol 159:4155-4164.

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

Brauweiler, A., et al. (2000). Differential regulation of B-cell development, activation, and death by the src homology 2 domain-containing 5' inositol phosphatase (SHIP). J Exp Med 191:1545-1554.

Burkhard, A. L., et al. (1991). Anti-immunoglobulin stimulation of B lymphocytes activates src-related protein tyrosine kinases. PNAS 191:88:7410-7414.

Butcher, E.C., Rouse, R.V., Coffman, R.L., Nottenburg; C.N., Hardy; R.R., and Weissman, I.L. (1982). Surface phenotype of PP germinal center cells: implications for the role of germinal centers in B cell differentiation. J Immunol 129:2698-2707.

Campbell, K. S. and Cambier, J. C. (1990). B Lymphocyte antigen receptor (mIg) are noncovalently associated with disulfid-linked, inducibly phosphorylated glycoprotein complex. EMBO J 9:2125-2132.

Campbell, K. S. et al. (1991). IgM antigen receptor complex contains phospho- protein products of B29 and mb-1 genes. PNAS 88:3982.

Campbell, M. A. and Klinman, N. R. (1995). Phosphotyrosine-dependent association between CD22 and protein tyrosine phosphatase 1C. Eur J Immunol 25(6):1573-1579.

Campbell, M. A. and Sefton, B. M. (1990). Protein tyrosine phosphorylation is induced in murine B lymphocytes in response to stimulation with anti-immuno-globulin. EMBO J 9:2125-2132.

Campbell, M. A. and Sefton, B. M. (1992). Association between B-lymphocyte membrane immunoglobulin and multiple members of the Src family of protein tyrosine kinases. Mol Cell Biol 12:2315-2321.

Carsetti, R., et al. (1995). Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. J Exp Med 181(6):2129-40.

Carter, R. H., et al. (1991). Tyrosine phosphorylation of phospholipase C induced by membrane immunoglobulin in B lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 88(7):2745-2749.

Cazac, B. B., Roes, J. (2000). TGF- β Receptor Controls B Cell Responsiveness and Induction of IgA In Vivo. Immunity 13:443-451.

Chen, Y. G., et al. (1996). A transcriptional partner of MAD proteins in TGF- β signaling. Nature 383:691-696.

Chen, Y. G., et al. (1998). Determinants of specificity in TGF- β signal transduction. Genes Dev 12:2144-2152.

Church, G. M., Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. Proc Natl Acad Sci U S A 81:1991-1995.

Clark, M. R., et al. (1992). The B-cell antigen receptor complex: association of Ig-alpha and Ig-beta with distinct cytoplasmatic effectors. Science 258:123-126.

Cohen, J. L., et al. (1998). Fertile homozygous transgenic mice expressing a functional truncated herpes simplex thymidine kinase delta TK gene. Transgenic Res 7(5):321-330.

Cornall, R. J., et al. (1998). Polygenic autoimmune traits: Lyn, CD22, and SHP-1 are limiting elements of a biochemical pathway regulating BCR signaling and selection. Immunity 8(4):497-508.

Cornish, A. L., et al. (1998). Characterization of siglec-5, a novel glycoprotein expressed on myeloid cells related to CD33. Blood 92:2132-2132.

- Crawley, J.N., et al. (1997).** Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. Psychopharmacology 132: 107-124.
- Crespo, P., et al. (1997).** Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogen product. Nature 385:169-172.
- Crocker, P. R. (2002).** Siglecs: sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins in cell-cell interactions and signalling. Curr. Opin. Struct. Biol 12:606-615.
- Crocker, P. R. and Varki, A. (2001).** Siglecs in the immune system. Immunology 103(2):137-45.
- Crocker, P. R. and Varki, A. (2001).** Siglecs, sialic acid and innate immunity. Trends Immunol. Vol.22(No.6):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(1):13-24.
- Datto, M. B., et al. (1995).** Functional analysis of the transforming growth factor β responsive elements in the WAF1/Cip1/p21 promoter. J Biol Chem 270:28623-8.
- Deng, C., Capecchi, M. (1992).** Reexamination of Gene Targeting Frequency as a Function of Extent of Homology between the Targeting Vector and the Target Locus. Mol. Cell. Biol. 12(8):3365-3371.
- de Wind, N., et al. (1995).** Inactivation of the mouse Msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer. Cell 82(2):321-30.
- Doody, G. M., et al. (1995).** A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP. Science 269(5221):242-4.
- Ellison, A. A., Bishop, J. O. (1998).** Herpesvirus thymidine kinase transgenes that do not cause male sterility are aberrantly transcribed and translated in the testis. Biochem Biophys Acta 1442(1):28-38.
- Engel, P., et al. (1993).** The same epitope on CD22 of B lymphocytes mediates the adhesion of erythrocytes, T and B lymphocytes, neutrophils and monocytes. J Immunol 150:4719-32.
- Engels, N., et al. (2001).** Association of SLP-65/BLNK with the B cell antigen receptor through a non-ITAM tyrosine of Ig-alpha. Eur J Immunol 31(7):2126-34.
- Evans, M.J., und Kaufmann (1981).** Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 292:154-156.

Fagarasan, S., et al. (2000). Alymphoplasia (aly)-type nuclear factor kappa B-inducing kinase (NIK) causes defects in secondary lymphoid tissue chemokine receptor signaling and homing of peritoneal cells to the gut-associated lymphatic tissue system. J Exp Med 191:1477-1486.

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

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

Fu, C., et al. (1998). BLNK: A central linker protein in B cell activation. Immunity 9:93-103.

Fujimoto, M., et al. (1999). Modulation of B Lymphocyte antigen receptor signal transduction by a CD19/CD22 regulatory loop. J Immunol 165:4453-4462.

Galvin, K. M., et al. (2000). SMAD6 in development and homeostasis of the cardiovascular system. Nature Genet 24:171-174.

Germain, S., et al. (1998). Homeodomain and winged-helix transcription factors recruit activated SMADs to distinct promoter elements via a common SMAD interaction motif. Genes Dev 14:435-451.

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

Gu, H., et al. (1993). Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through cre-loxP-mediated gene targeting. Cell 73:1155-1164.

Guinamard, R., et al. (2000). Absence of marginal zone B cells in Pyk-2-deficient mice defines their role in the humoral response. Nat Immunol 1:31-36.

Hanafusa, H., et al. (1999). Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor- β -induced gene expression. J Biol Chem 274:27161-27167.

Hanahan, D. (1983). Studies on Transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J Mol Biol 166:557-580.

Hanai, J., et al. (1999). Interaction and functional cooperation of PEBP2/CBF with SMADs. Synergistic induction of the immunoglobulin germline C α promoter. J Biol Chem 274:31577-31582.

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

- Hanasaki, K., et al. (1995).** CD22-mediated cell adhesion to cytokine-activated human endothelial cells. Positive and negative regulation by alpha 2-6-sialylation of cellular glycoproteins. J Biol Chem 270(13):7533-42.
- Hardy, R. R., et al. (2000).** B-cell commitment , development and selection. Immunol Rev 175:23-32.
- Hasty, P., et al. (1991).** The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. Mol Cell Biol 11(11):5586-91.
- Hata, A., et al. (1998).** SMAD6 inhibits BMP/SMAD1 signaling by specifically competing with the SMAD4 tumor suppressor. Genes Dev 12:186-197.
- Hata, A., et al. (2000).** OAZ uses distinct DNA- and protein-binding zinc fingers in separate BMP-SMAD and OLF signaling pathways. Cell 100:229-240.
- Hayakawa, K., et al. (1999).** Positive selection of natural autoreactive B cells. Science 285:113-116.
- Hennet, T., et al. (1998).** Immune regulation by the ST6Gal sialyltransferase. Proc Natl Acad Sci U S A 95:4504-9.
- Herzenberg, L. A. (2000).** B-1 cells: the lineage question revisited. Immunol Rev 175:9-22.
- Hocevar, B. A., et al. (1999).** TGF- β induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase –dependent pathway. EMBO J 18:1345-1356.
- Hombach, J., et al. (1990a).** Identification of the genes encoding the Ig-alpha and Ig-beta components of the IgM antigen receptor complex. Eur J Immunol 20:2795-2799.
- Hombach, J., et al. (1990b).** Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class. Nature 20:343:760.
- Hua, X., et al. (1999).** Specificity in transforming growth factor β -induced transcription of the *plasminogen activator inhibitor-1* gene: interactions of promoter DNA, transcription factor muE3, and SMAD proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 96:13130-13135.
- Ioffe, E., et al. (1995).** WW6: an embryonic stem cell line with an inert genetic marker that can be traced in chimeras. Proc Natl Acad Sci U S A 92(16):7357-61.
- Janeway, C. and Travers, P. (1999).** Immunobiology. The Immune System in Health and disease. Current Biology Ltd., London/Garland Publishing Inc., New York
- Jin, L., et al. (2002).** Sialic Acid Binding Domains of CD22 Are Required For Negative Regulation of B Cell Receptor Signaling. J Exp Med 195(9):1199-1205.

- Kabak, S., et al. (2002).** The direct recruitment of BLNK to immunoglobulin alpha couples the B- cell antigen receptor to distal signaling pathways. Mol Cell Biol 22(8):2524-35.
- Kelm, S. and Schauer, R. (1997).** Sialic acids in molecular and cellular interactions. Int Rev Cytol 175:137-240.
- Kelm, S., et al. (1994).** Modifications of cell surface sialic acids modulate cell adhesion mediated by sialoadhesin and CD22. Glycoconj J 11(6):576-85.
- Kelm, S., et al. (2002).** The Ligand-binding Domain of CD22 Is Needed for Inhibition of the B Cell Receptor Signal, as Demonstrated by a Novel Human CD22-specific Inhibitor Compound. J Exp Med 195(9):1207-1213.
- Kessler, C., Neumaier, P.S. and Wolf, W. (1985).** Recognition sequences of restriction endonucleases and methylases- a review. Gene 33:1-102.
- Kim, K. M., et al. (1993).** Differential signaling through the Ig-alpha and Ig-beta components of the B cell antigen receptor. Eur J Immunol 23:911-916.
- Kinoshita, K., et al. (2001).** A hallmark of active class switch recombination: Transcripts directed by I promoters on looped-out circular DNAs. Proc Natl Acad Sci U S A 98(22):12620-12633.
- Kornberg, A. (1974).** DNA-Replication. W.H. Freeman and Company New York: 333-336.
- Kretzschmar, M., et al. (1997).** Opposing BMP and EGF signalling pathway converge on the TGF- β family mediator SMAD1. Nature 389:618-622.
- Kuehn, M. R., et al. (1987).** A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice. Nature 326(6110): 295-8.
- Kulkarni, A. B., and Karlson, S. (1997).** Inflammation and TGF- β 1: lessons from the TGF- β 1 null mouse. Res Immunol 148:453-456.
- Kumar, S. and Simons, J. P. (1993).** The effects of terminal heterologies on gene targeting by insertion vectors in embryonic stem cells. Nucleic Acids Res 21(7): 1541-8.
- Lajaunias, F., et al. (1999).** Polymorphisms in the *Cd22* gene of inbred mouse strains. Immunogenetics 49:991-995.
- Lankester, A. C., et al. (1994).** B cell antigen receptor cross-linking induces tyrosine phosphorylation and membrane translocation of a multimeric Shc complex that is augmented by CD19 co-ligation . Eur J Immunol 24:2818-2825.
- Lanoue, A., et al. (2002).** Interaction of CD22 with α 2,6-linked sialoglycoconjugates: innate recognition of self to dampen Bcell autoreactivity? Eur J Immunol 32 :348-355.
- Law, C. L., et al. (1993).** Organization of the Murine Cd22 Locus. J Immunol 151(1):175-187.

- Law, C. L., et al. (1995).** Ig domains 1 and 2 of murine CD22 constitute the ligand-binding domain and bind multiple sialylated ligands expressed on B and T cells. J Immunol 155(7):3368-76.
- Law, C. L., et al. (1996).** CD22 associates with protein tyrosine phosphatase1C, Syk, and phospholipase C-gamma(1) upon B cell activation. J Exp Med 183:547-560.
- Ledermann, B. and Bürki, K. (1991).** Establishment of a germ-line competent C57BL/6 embryonic stem cell line. Exp Cell Res 197(2):254-8.
- Leprince, C., et al. (1993).** CD22 associates with the human surface IgM-B-cell antigen receptor complex. Proc Natl Acad Sci U S A 90(8):3236-40.
- Martin, F., and Kearney, J. F. (2000).** B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as a part of a "natural immune response". Immunol Rev 175:70-79.
- Martin, F., et al. (2001).** Marginal zone B-cell and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. Immunity. 14:617-629.
- Martin, G.R. (1981).** Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 78:7634-7638.
- Massagué, J. (2000).** How cells read TGF- β signals. Nat. Rev. Immunol. 1:169-178.
- May et al. (1998).** Crystal Structure of the N-Terminal Domain of Sialoadhesin in Complex with 3' Sialyllactose at 1.85 Å Resolution. Molecular Cell Vol.1:719-728.
- Mc Vicar, D.W., et al. (2002).** Aberrant DAB12 signaling in the 129 strain of mice: implications for the analysis of gene-targeted mice. J Immunol 169:1721-1728.
- Müller, U. (1999).** Ten years of gene targeting: targeted mouse mutant, from vector design to phenotype analysis. Mech. Developm. 82(1-2):3-21.
- Munday, J., et al. (2001).** Identification, characterization and leucocyte expression of Siglec-10, a novel human sialic acid-binding receptor. Biochem J 355:489-497.
- Nakao, A., et al. (1997).** Identification of SMAD7, a TGF β -inducible antagonist of TGF- β signaling. Nature 389:631-635.
- Nicoll, G., et al. (1999).** Identification and characterization of a novel Siglec, Siglec-7, expressed by human natural killer cells and monocytes. J Biol Chem 274:34098-34095.
- Nitschke, L., et al. (1997).** CD22 is a negative regulator of B-cell receptor signalling. Curr Biol 7(2):133-43.

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

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

Nomura, M., and Li, E. (1998). Smad2 role in mesoderm formation, left-right patterning and craniofacial development. Nature 95:9378-9383.

Ogura, K., et al. (1999). Solution structure of the SH2 domain of Grb2 complexed with the Shc-derived phosphotyrosine-containing peptide. J Mol Biol 289:439-445.

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

Orita, M., Suzuki, T., Sekiya, T., Hayashi, K. (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics 5:874-879.

Oshima, M., et al. (1996). TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. Dev Biol 179:297-302.

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

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

Paul, S. P., et al. (2000). Myeloid specific human CD33 is an inhibitory receptor with differential ITIM function in recruiting the phosphatases SHP-1 and SHP-2. Blood 96:483-490.

Pardali, E., et al. (2000). SMAD and AML proteins synergistically confer transforming growth factor β 1 responsiveness to human germ-line IgA genes. J Biol Chem 275:3552-3560.

Patel, N., et al. (1999). OB-BP1/Siglec-6, A leptin- and sialic acid-binding protein of the immunoglobulin superfamily. J Biol Chem 274:22729-22738.

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

Pease, S., et al. (1990). Dev Biol 141:344.

Peiper, S. C., et al. (1988). Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of a human gene encoding CD33 myeloid differentiation antigen. Blood 72:314-321.

- Pezzutto, A., et al. (1987).** Amplification of human B cell activation by a monoclonal antibody to the B cell-specific antigen CD22, Bp 130/140. J Immunol 138(1):98-103.
- Pezzutto, A., et al. (1988).** Role of the CD22 human B cell antigen in B cell triggering by anti- immunoglobulin. J Immunol 140(6):1791-5.
- Poe, J. C., et al. (2000).** CD22 forms a quaternary complex with SHIP, Grb2, and Shc. A pathway for regulation of B lymphocyte antigen receptor-induced calcium flux. J Biol Chem 275(23):17420-7.
- Powell, L. D., et al. (1995).** Characterization of sialyloligosaccharide binding by recombinant soluble and native cell-associated CD22. Evidence for a minimal structural recognition motif and the potential importance of multisite binding. J Biol Chem 270(13):7523-32.
- Rafferty, L. A., and Sutherland, D. J. (1999).** TGF- β family signal transduction in *Drosophila* development: from Mad to SMADs. Devel Biol 210:251-268.
- Rajewsky, K., et al. (1996).** Conditional gene targeting. J Clin Invest 98:600-603.
- Rao, A., et al. (1997).** Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. Annu Rev Immunol 15:707-47.
- Rahuel, J., et al. (1996).** Structural basis for specificity of Grb2-SH2 revealed by a novel ligand binding mode. Nat Struct Biol 3 :586-589.
- Razi, N. and Varki, A. (1998).** Masking and unmasking of the sialic acid-binding lectin activity of CD22 (Siglec-2) on B lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 95(13): 7469-74.
- Razi, N. and Varki, A. (1999).** Cryptic sialic acid binding lectins on human blood leukocytes can be unmasked by sialidase treatment. Glycobiology 9:1225-1234.
- Reth, M. and Wienands, J. (1997).** Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor. Annu Rev Immunol 15 :453-79.
- Rickert, R.C., et al. (1997).** B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. Nucleic Acids Research 25(6):1317-1318.
- Robertson (1987).** Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells, a Practical Approach.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.G., and Ehrlich, H.A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239:487-491.
- Salim, K., et al. (1996).** Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. EMBO J 15:6241-6250.

- Salomon, B., et al. (1995).** A truncated herpes simplex virus thymidine kinase phosphorylates thymidine and nucleoside analogs and does not cause sterility in transgenic mice. Mol Cell Biol 15(10):5322-5328.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, second edition.
- Sanchez, M., et al. (1993).** Signal transduction by immunoglobulin is mediated through Ig- α and Ig- β . J Exp Med 178:1049-1055.
- Sanchez, M., et al. (1993).** Signal transduction by immunoglobulin is mediated through Ig- α and Ig- β . J Exp Med 178:1049-1055.
- Sano, Y., et al. (1999).** ATF-2 is a common nuclear target of SMAD and TAK1 pathways in transforming growth factor- β signaling. J Biol Chem 274:8949-8957.
- Sato, S., et al. (1997).** CD19 and CD22 expression reciprocally regulates tyrosine phosphorylation of Vav protein during B lymphocyte signaling. Proc Natl Acad Sci U S A 94:13185-13162.
- Sauer, B. (1993).** Manipulating transgenes by site-specific recombination: use of cre recombinase. Methods Enzymol 225:890-900.
- Sauer, B., and Henderson, N. (1988).** Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. Proc Natl Acad Sci U S A 85:5166-5170.
- Sauer, B., and Henderson, N. (1990).** Targeted insertion of exogenous DNA into the eukaryotic genome by cre recombinase. New Biol 2:441-449.
- Saxton, T. M., et al. (1994).** B cell antigen receptor cross-linking induces phosphorylation of the p21ras oncoprotein activators SHC and mSOS1 as well as assembly of complexes containing SHC, GRB-2, mSOS1, and a 145-kDa tyrosine-phosphorylated protein. J Immunol 153(2):623-36.
- Schauer, R., and Kamerling, J. (1997).** Chemistry, biochemistry and biology of sialic acids. In Glycoproteins II: 243-402, Elsevier Science.
- Schulte, R. J., et al. (1992).** Tyrosine phosphorylation of CD22 during B cell activation. Science 258(5084):1001-4.
- Seong, E., et al. (2004).** To knockout in 129 or in C57BL/6 : that is the question. Trends in Genetics 20(2):59-62.
- Sgroi, D., et al. (1995).** Regulation of CD45 engagement by the B-cell receptor CD22. Proc Natl Acad Sci U S A 92(9):4026-30.
- Sharp, P.A., et al. (1973).** Detection of two restriction enzyme activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electro-phoresis. Biochemistry 12:3055-3063.

- Shull, M. M., et al. (1992).** Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. Nature 359:693-699.
- Shi, M.J., and Stavnezer, J. (1998).** CBF α 3 (AML2) is induced by TGF- β 1 to bind and activate the mouse germline Ig α promoter. J Immunol 161:6751-6760.
- Sicheri, F., et al. (1997).** Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. Nature 385:602-609.
- Silbernagl, S. und Despopoulos, A. (1991).** Taschenatlas der Physiologie. Thieme Verlag Stuttgart.
- Sirard, C., et al. (1998).** The tumor suppressor gene Smad4/Dpc4 is required for gastrulation and later for anterior development of the mouse embryo. Genes & Dev 12:107-19.
- Skolnik, E. Y., et al. (1994).** The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine-phosphorylated IRS1 and Shc: implications for insulin control of ras signaling. EMBO J 12:1929-1936.
- Smit, L., et al. (1994).** B cell antigen receptor stimulation induces formation of a Shc-Grb2 complex containing multiple tyrosine-phosphorylated proteins. J Biol Chem 269(32):20209-12.
- Smith, K. G., et al. (1998).** Inhibition of the B cell by CD22: a requirement for Lyn. J Exp Med 187(5):807-11.
- Southern, E.M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 98:503.
- Stamenkovic, I. and Seed, B. (1990).** The B-cell antigen CD22 mediates monocyte and erythrocyte adhesion. Nature 345(6270):74-7.
- Stryer, L. (1994).** Biochemie. Spektrum Akad. Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Su, B. and Karin, M. (1996).** Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. Curr Opin Immunol 8(3):402-11.
- Sun, B., et al. (1999).** SnoN and Ski protooncoproteins are rapidly degraded in response to transforming growth factor- β signaling. Proc Natl Acad Sci U S A 96:12442-12447.
- Takata, M. and Kurosaki, T. (1996).** A role for Bruton's tyrosine kinase in B cell antigen receptor-mediated activation of phospholipase C-gamma 2. J Exp Med 184(1):31-40.
- Taylor, V. C., et al. (1999).** The myeloid-specific sialic acid-binding receptor, CD33, associates with the protein-tyrosine phosphatases, SHP-1 and SHP-2. J Biol Chem 274:11505-11512.

- te Riele, H., et al. (1992).** Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. Proc Natl Acad Sci U S A 89(11):5128-32.
- Thomas, K. R. and Capecchi, M. R. (1987).** Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. Cell 51(3):503-12.
- Thomas, K. R., et al. (1992).** High-fidelity gene targeting in embryonic stem cells by using sequence replacement vectors. Mol Cell Biol 12(7):2919-23.
- Toker, A., and Cantley, L. C. (1997).** Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. Nature 387:673-676.
- Tooze, R. M., et al. (1997).** Counterregulation by the coreceptors CD19 and CD22 of MAP kinase activation by membrane immunoglobulin. Immunity 7(1):59-67.
- Torres, R. M., et al. (1992).** Identification and characterization of the murine homologue of CD22, a B lymphocyte-restricted adhesion molecule. J Immunol 149(8): 2641-9.
- Torres, R. M., Kühn, R. (1997).** Laboratory protocols for conditional gene targeting. Oxford University Press.
- Tsuneizumi, K., et al. (1997).** Daughters against dpp modulates dpp organizing activity in Drosophila wing development. Nature 389:627-631.
- Tuscano, J. M., et al. (1996).** Involvement of p72syk kinase, p53/56lyn kinase and phosphatidylinositol-3 kinase in signal transduction via the human B lymphocyte antigen CD22. Eur J Immunol 26(6):1246-52.
- Ulyanova, T., et al. (1999).** The sialoadhesin CD33 is a myeloid-specific inhibitory receptor. Eur J Immunol 29:3440-3449.
- van der Merwe, P. A., et al. (1996).** Localization of the putative sialic acid-binding site on the immunoglobulin superfamily cell-surface molecule CD22. J Biol Chem 271(16):9273-80.
- Varki, A., et al. (1999).** Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Vasquez, K.M., et al. (2001).** Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. PNAS 98(15):8403-8410.
- Venkitaraman, A. R., et al. (1991).** The B-cell antigen receptor of the five immunoglobulin classes. Nature 352:777.
- Wahlsten, D., et al. (1992).** Deficient corpus callosum in hybrids between ddN and three other abnormal mouse strains. Neurosci Lett 136:99-101.
- Waldrip, W. R., et al. (1998).** Smad2 signaling in extraembryonic tissues determines anterior-posterior polarity of the early mouse embryo. Cell 92:797-808.

- Wardemann, H., et al. (2002).** B-1a Cells that Link the Innate and Adaptive Immune Responses Are Lacking in the Absence of the Spleen. J Exp Med 195(6):771-780.
- Weinstein, M., et al. (1998).** Failure of egg cylinder elongation and mesoderm induction in mouse embryos lacking the tumor suppressor Smad2. Proc Natl Acad Sci U S A 95:9378-9385.
- Whitman, M. (1998).** SMADs and early developmental signaling by the TGF- β superfamily. Genes Dev 12:2445-2462.
- Wienands, J., et al. (1990).** Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of class IgD differ partly from those of IgM. EMBO J 9:449-455.
- Wienands, J., et al. (1995).** Tyrosine-phosphorylated forms of Ig-beta, CD22, TCR-zeta and HOSS are major ligands for tandem SH2 domains of Syk. Intern Immunol 7:1701-1708.
- Wienands, J., et al. (1996).** Evidence for a preformed transducer complex organized by the B cell antigen receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 93(15):7865-70.
- Wienands, J., et al. (1998).** SLP-65: a new signaling component in B lymphocytes which requires expression of the antigen receptor for phosphorylation. J Exp Med 188(4):791-5.
- Wilson, G. L., et al. (1991).** cDNA Cloning of the B Cell Membrane Protein CD22: A Mediator of B-B Cell Interactions. J Exp Med 173:137-146.
- Williams, R. L., et al. (1988).** Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. Nature 336(6200):684-7.
- Wotton, D., et al. (1998).** A SMAD transcriptional corepressor. Cell 97:29-39.
- Xu, W., et al. (1999).** Evidence for a role of SMAD6 in chickcardiac development. Dev Biol 215:48-61.
- Yamada, M., et al. (1996).** CD45 modulates phosphorylation of both auto-phosphorylation and negative regulatory tyrosines of Lyn in B cells. J Biol Chem 271:30487-30492.
- Yanagi, S., et al. (1996).** CD45 modulates phosphorylation of both auto-phosphorylation and negative regulatory tyrosines of Lyn in B cells. J Biol Chem 271:30487-30492.
- Yang, X., et al. (1999).** Angiogenesis defects and mesenchymal apoptosis in mice lacking Smad5. Development 126:1571-80.
- Yeo, C.Y., et al. (1996).** The role of FAST-1 and SMADs in transcriptional regulation by activin during early *Xenopus* embryogenesis. J Biol Chem 271:26584-26590.

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

Zhao, J., et al. (2000). SMAD7 and SMAD6 differentially modulate transforming growth factor- β -induced inhibition of embryonic lung morphogenesis. J Biol Chem 275:23992-23997.

Zheng, H., Wilson, J.H. (1990). Gene targeting in normal and amplified cell lines. Nature 344:170-173.

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

Zhu, Y., et al. (1998). Smad3 mutant mice develop metastatic colorectal cancer. Cell 94:703-14.

7.2 Publikationsliste

7.2.1 Originalarbeiten aus dieser Doktorarbeit

Brunner, C., Marinkowic, D., Klein, J., Samardzic, T., Nitschke, L., Wirth, T. (2003) B cell-specific transgenic expression of Bcl2 rescues early B lymphopoiesis but not B cell response in BOB1/OBF1 deficient mice. *J.Exp.*197(9):1205-11.

Klein, J., Wenjun, J., Heyer, J., Kucherlapati, R., Böttinger, E., Nitschke, L., and Kneitz, B. (submitted) B cell specific deficiency for Smad2 in vivo leads to defects in TGF- β directed IgA switching and changes in B-cell fate.

7.2.2 Publikationen auf Kongressen/Tagungen

Klein, J., Wenjun, J., Heyer, J., Kucherlapati, R., Böttinger, E., Nitschke, L., and Kneitz, B. (2002) B cell-specific deficiency for Smad2 in vivo leads to defects in TGF- β signaling. *Immunobiology* Volume 206, p135, J.9. Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Marburg, 25.-28. September 2002 Posterpräsentation und Vortrag.

8. Anhang

8.1 Verwendete Abkürzungen

aa	Aminoacid (Aminosäure)
A _x	Absorption bei einer Wellenlänge x nm
A	Ampere
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
BCR	B-Zell Rezeptor
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovine Serum Albumin
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of differentiation
CHO	Chinesischer-Hamster Ovar
cDNA	engl. complementary DNA
Ci	Curie ; ein Curie entspricht $3,7 \times 10^{10}$ Zerfallsereignissen pro Sekunde
CIP	Kälberdarm-Phosphatase
Cy	Cychrome
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Deoxynukleosid-5'-triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMFI	embryonaler Fibroblast
ES-Zelle	Embryonale Stammzelle
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F bzw. f	forward
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	fötale Kälberserum
FISH	fluorescence-in-situ-hybridisation
FITS	Fluoresceinisothiocyanat
GALT	gut-associated lymphoid tissue
g	Gramm
GEF	Guanylnukleotid-Austauschfaktor
h	Stunde
Ig	Immunglobulin(e)

ITAM	Immunrezeptor Tyrosin-haltiges aktivierendes Motiv
ITIM	Immunrezeptor Tyrosin-haltiges inhibierendes Motiv
Kb	Kilobasenpaar(e)
LN	Lymphknoten (lymph nodes)
LIF	Leucaemia inhibitory factor
LPS	Lipopolysaccharid(e)
M	molar (mol/l)
m	Milli ($\times 10^{-3}$)
μ	Mikro ($\times 10^{-6}$)
mA	Milliampere
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute(n)
M_r	Molekulargewicht
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
MZ	Marginal zone
n	Nano ($\times 10^{-9}$)
OAc	Acetat
OD	Optische Dichte bei der Wellenlänge x
^{32}P	radioaktives Phosphorisotop 32
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PC	Peritonealhöhle (peritoneal cavity)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerithrin
PEG	Polyethylenglykol
Pen.	Penicillin
PH	Pleckstrin-Homologie (Domäne)
PIP	Phosphatidyl-Inositol-Phosphat
PNK	Polynukleotidkinase
PP	Payersche Plaques (engl. Peyer's Patches)
PTK	Proteintyrosinkinase
R bzw. r	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	revolutions per second
RPMI	Roswell-Park Memorial Institute (Medium)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SH	Src Homologie Domänen
SDS	Natriumdodecylsulfat
Siglec	sialic acid-binding Ig-like lectin (Sialinsäure-bindendes Immunglobulin-ähnliches Lectin)
SLP	SH2-containing Leukocyte Protein
ssDNA	einzelsträngige DNA
Strep.	Streptomycin
T1-Zellen	Transitionale B-Zellen Typ1
T2-Zellen	Transitionale B-Zellen Typ2
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TD	thymusabhängig
TGF- β	Transforming growth factor- β (s)
TH	Tec-Homologie (Domäne)

T _H	T-Helferzelle
TI	thymusabhängig
TNP	Tri-Nitrophenyl Phosphat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSR	template suppressive reagent
ü.N.	über Nacht
U	unit(s) (Einheit; Einheiten)
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
W	Watt
WT	Wildtyp
(w/v)	weight per volume; Massenanteil eines festen Stoffes in einer Lösung

9. Curriculum Vitae

Promotion

März 1998 – heute	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Virologie und Immunbiologie in Würzburg zur Erlangung des Dr. rer. nat. zur Zeit Doktorarbeit im Umlauf
-------------------	--

Hochschulstudium

November 1991 – Oktober 1997	Studium der Biologie an der Universität Würzburg Abschluß: Diplom-Biologe
------------------------------	--

Praktika

Juli 1991 – Oktober 1991	Medizinisches Praktikum am Lehrklinikum Aschaffenburg
März 1995 – Mai 1995	Praktikum am Max – Planck – Institut für Biochemie

Wehrdienst

Juli 1990 – Juni 1991	Wehrdienst in Hammelburg
-----------------------	--------------------------

Schulbildung

1988 – 1990	Kronberg-Gymnasium in Aschaffenburg humanistisch - neusprachlicher Zweig Abschluß Abitur
1987 – 1988	Hans-Thoma Gymnasium in Lörrach
1987	3-monatiger Schüleraustausch an der Wilmington-Grammar-School in Wilmington/Kent
1983 – 1987	Hohe Landesschule in Hanau mathematisch - naturwissenschaftlicher Zweig
1981 – 1983	Heinrich-Heine-Schule in Hanau Grundschule mit Förderstufe
1977 – 1981	Melanchthon Schule in Brühl Gemeinschaftsgrundschule

Goldbach, den 15.02.05