

Institut für Physiologische Chemie
Universität Ulm

Amtierender Direktor:
Prof. Dr. Thomas Wirth

Untersuchung der Rolle der Bruton'schen Tyrosin Kinase und des
Toll-like Rezeptor / MyD88-vermittelten Signalweges in der Entwicklung von
B-Zellen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Susanne Bresch, geb. Pritzel

Lichtenfels

2010

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: PD Dr. Cornelia Brunner

2. Berichterstatter: PD Dr. Thomas Barth

Tag der Promotion: 15.04.2011

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1. EINLEITUNG	1
1.1. DAS IMMUNSYSTEM	1
1.2. ENTWICKLUNG DER B-LYMPHOZYTEN	2
1.3. SUBPOPULATIONEN DER B-ZELLEN	4
1.4. DIE BRUTON'SCHE TYROSIN KINASE (BTK)	6
1.4.1. Vorkommen und Struktur der BTK	6
1.4.2. Rolle der BTK in der B-Zell Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion	8
1.4.3. Aktivierung der BTK durch eine große Vielzahl an Rezeptoren	10
1.5. DIE TOLL-LIKE REZEPTOREN (TLR)	11
1.5.1. Wichtige Eigenschaften der TLR	11
1.5.2. Signaltransduktion der Toll-like Rezeptoren	12
1.5.3. Die Rolle der BTK in TLR vermittelten Signalwegen	14
1.6. FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	16
2. MATERIAL UND METHODIK	17
2.1. TECHNIKEN	17
2.1.1. Präparation von Mäusen	17
2.1.2. Gewinnung von B-Zellen aus dem Knochenmark	18
2.1.3. Isolierung von B-Zellen aus der Milz	19
2.1.4. Gewinnung von B-Zellen aus der peritonealen Flüssigkeit	20
2.1.5. Bestimmung der Zellzahl	20
2.1.6. Einfrieren und Auftauen von Zellen	20
2.1.7. Etablierung von prä B-Zelllinien aus Knochenmarksvorläuferzellen	21
2.1.8. FACS (Flowcytometric Analysis and Cell Sorting)	22
2.1.9. Klonierung	23
2.1.10. Transfektion von Jurkat T-Zellen	29
2.1.11. Transfektion von NIH / 3T3-Zellen	30
2.1.12. Herstellen von Zellextrakten	30
2.1.13. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	32
2.1.14. Western Immunoblot	33
2.2. MAUSLINIEN, ZELLEN UND MEDIEN	37
2.2.1. Mauslinien	37
2.2.2. Zellen und Bakterien	37
2.2.3. Medien und Lösungen für die Zellkultivierung	38
2.3. GEBRAUCHSFERTIGE KITS	38
2.4. BIOLOGISCHEN MATERIALIEN	39
2.4.1. FACS Antikörper	39
2.4.2. Westernblot Antikörper	39
2.4.3. Enzyme	39
2.4.4. Restriktionsenzyme	40
2.4.5. Verwendete Vektoren	40
2.5. VERBRAUCHSMATERIALIEN	40
2.6. GERÄTE	41
2.7. STATISTIK	42
3. ERGEBNISSE	43
3.1. NACHWEIS VON B-ZELL SUBPOPULATIONEN IN DEN VERSCHIEDENEN GENOTYPEN	44
3.1.1. B-Zellsubpopulationen im Knochenmark	45
3.1.2. B-Zellsubpopulationen in der Milz	49
3.1.3. B-Zellsubpopulationen in der peritonealen Flüssigkeit	58
3.2. NACHWEIS DER FUNKTIONALITÄT DER KLONierten BTK MUTANTEN	62
3.2.1. Klonierung	62
3.2.2. Nachweis der induzierbaren Expression	63

4. DISKUSSION.....	68
4.1. DER EINFLUSS VON TLR/MYD88 AUF DIE HÄMATOPOESE.....	68
4.2. DER BTK- UND DER MYD88-VERMITTELTE SIGNALWEG WIRKEN SYNERGISTISCH AUF DIE B-ZELL ENTWICKLUNG IN DER ANTIGEN-UNABHÄNGIGEN PHASE.....	69
4.2.1. <i>Die Analyse des Knochenmarks</i>	70
4.2.2. <i>Die Analyse der Milz</i>	72
4.2.3. <i>Die Analyse der peritonealen Flüssigkeit</i>	73
4.3. SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK	73
5. ZUSAMMENFASSUNG	76
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	78
DANKSAGUNG	83

Abkürzungsverzeichnis

Akt	Protein Kinase B
AP-1	Aktivator-Protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
BCR	B-Zell Rezeptor
BTK	Bruton´sche Tyrosin Kinase
CAMs	„cell adhesion molecules“
CD	„Cluster of Differentiation“ Einteilung von Zelloberflächenmerkmalen
d.h.	das heißt
dko	doppel knock out
Dox	Doxycyclin
DMSO	Dimethylsulfooxid
DNA	Desoxyribo-Nukleinsäure
dNTP's	Desoxyribo-Nukleosid-Tri-Phosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EBF	„early B-cell factor“ (Transkriptionsfaktor)
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
EGTA	Ethylen-Glycerolbisether-Tetra-Acetat
ERK2	„extra cellular regulated kinase 2“
E2A	Transkriptionsfaktor, Mitglied der E Protein Familie
E41K	Punktmutation an Position 41 des Gens, Austausch der Aminosäure Glutamin gegen Lysin
FACS	„Flowcytometric Analysis and Cell Sorting“ (Durchflusszytometrie)
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FOB	follikuläre B Zellen
IFN- α	Interferon- α
IFN- β	Interferon- β
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IL-7	Interleukin-7
IL-10	Interleukin-10
IL-12	Interleukin-12

IMDM	IMDM Medium
IKK	(ird5) „immune response deficient 5“
IRAK	Interleukin-1 Rezeptor assoziierte Kinase
IRF	Interferon regulierender Faktor
JNK	jun-N-terminale Kinase
K430R	Punktmutation an Position 430 des Gens, Austausch der Aminosäure Lysin gegen Arginin
ko	knock out
mA	Milliamper
MAL	„MyD88-adaptor-like protein“ ein Adapterprotein der TIR Domain
MALT	Mukosa assoziiertes lymphatisches Gewebe
MAP	Mitogen aktiviertes Protein
min	Minute(n)
MKK	MAP Kinase Kinase
MTK 1	„MAP three kinase“, also MAP Kinase Kinase Kinase
MyD88	„myeloid differentiation primary response gene 88“ ein Adapterprotein der TIR Domain
MZB	Marginalzonen B-Zellen
NFAT	Nukleärer Faktor von aktivierten T-Zellen
NF- κ B	Nukleärer Faktor κ B
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PAMP	Pathogen assoziierte molekulare Muster
Pax-5	„paired-box-gene“ (gewebsspezifischer Transkriptionsfaktor)
PBS	„phosphate buffer saline“ (Phosphat gepufferte Salze)
PerCP	Peridinin-chlorophyll-protein
PH	Pleckstrin-homologe Domäne
PI3 Kinase	Phosphatidylinositol 3 Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PU.1	Transkriptionsfaktor, „Purine-rich box binding factor“
p38	38 kDa großes Protein
Rag	“recombination activating genes”
RIP	„receptor interacting protein“

RNA	Ribonukleinsäure
RP	„pathogen recognition receptor“ (Pathogen erkennender Rezeptor)
rpm	„rounds per minute“
RPMI	RPMI Medium
RT	Raumtemperatur
R28C	Punktmutation an Position 28 des Gens, Austausch der Aminosäure Arginin gegen Cystein
SH1 – SH3	Src-homologe Domäne
sec	Sekunde(n)
Src	von Sarcoma abgeleitet
Syk	„spleen tyrosine kinase“
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
TAK	Transformierender Wachstumsfaktor assoziierte Kinase
TCR	T-Zell Rezeptor
TE	Tris-EDTA
Tec	„tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma“
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TIR	Toll-Interleukin 1 Rezeptor-Domäne
TLR	Toll-like Rezeptor
TH	Tec-homologe Domäne
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TRAF	TNF Rezeptor assoziierter Faktor
TRAM	„TRIF-related adaptor molecule“
TRIF	„TIR domain-containing adaptor protein inducing Interferon- β “
TRIS	Trizma Tris(hydroxymethyl)aminomethan
SARM	„sterile α - and Armadillo-Motif-containing protein“
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
V	Volt
VCAM-1	„vascular cell adhesion molecule 1“
wt	wildtyp
XID	X chromosomal gekoppelte Immundefizienz bei Mäusen
XLA	X chromosomal gekoppelte Agammaglobulinämie beim Menschen
Y223F	Punktmutation an Position 223 des Gens, Austausch der Aminosäure Tyrosin gegen Phenylalanin

z.B.	zum Beispiel
μF	Mikrofarad
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius

1. Einleitung

1.1. *Das Immunsystem*

Das Immunsystem eines Organismus ist ein überlebenswichtiges System, was in ständiger Auseinandersetzung mit der Umwelt steht. Der Balanceakt zwischen Abwehr und körpereigener Toleranz ist eine wichtige Eigenschaft des Immunsystems.

Eine Untergliederung in ein angeborenes und ein erworbenes Immunsystem ist möglich. Das angeborene Immunsystem ist ohne Prägung durch Antigene funktionstüchtig und kann als „erste Linie“ der Abwehr bezeichnet werden, da es direkt und unmittelbar aktiv wird.

Das erworbene Immunsystem setzt sich ein Leben lang mit Pathogenen aktiv auseinander und führt somit zu einer Adaptation des Immunsystems und damit zu einer gezielteren Abwehr gegen die auf ihn wirkenden Keime. Der Hauptwirkungsort sind die sekundär lymphatischen Organe.

Sowohl T- also auch B-Lymphozyten sind in der Lage, Gedächtniszellen zu entwickeln, die in der Regel ein Leben lang im Organismus erhalten bleiben. Nach einer erneuten Exposition kann hierdurch eine schnellere und spezifischere Antwort generiert werden. Gedächtniszellen ermöglichen auch die aktive Immunisierung mit Impfstoffen (Renz-Polster H., 2006).

Die Spezifität und Anpassungsfähigkeit des erworbenen Immunsystems gründet auf der Fähigkeit zur Rekombination der Gene, welche die Immunglobulinketten und damit den BCR und TCR kodieren. Durch diese einmalige Fähigkeit ist es den Lymphozyten möglich, eine große Bandbreite an verschiedenen Antigenbindungsstellen entwickeln zu können. Das Genom der angeborenen Immunantwort hingegen hat keine Möglichkeit zur Rekombination. Es kodiert für verschiedene Rezeptoren, den so genannten PRR („pathogen recognition receptors“), welche spezifisch auf Antigene reagieren können. Ihnen ist eine Unterscheidung zwischen z.B. viralen und bakteriellen Antigenen möglich, was daraufhin spezifische Abwehrreaktionen auslöst. Eine wichtige Funktion nehmen hier die Toll-like Rezeptoren ein (s. Kapitel 1.5.).

1.2. Entwicklung der B-Lymphozyten

Der Ausgangspunkt der Lymphopoese sind lymphopoide Vorläuferzellen, welche sich aus pluripotenten Stammzellen im Knochenmark entwickeln.

Wie bereits erwähnt ist die Rekombination der schweren und leichten Immunglobulinketten ein entscheidender Entwicklungsschritt in B-Zellen. Im Stadium der prä pro B-Zellen ist die Expression der Rekombinations-aktivierenden Gene („Rag 1 und 2“) noch sehr gering. In Abhängigkeit von einem erhöhten Rag 1 und 2 Spiegel, weiteren Transkriptionsfaktoren und IL-7 kommt es zur Rekombination der schweren Kette (Li et al., 2007), dies führt zum pro B-Zellstadium. Wird die entwickelte schwere Kette als funktionstüchtig eingestuft, wird diese an der Oberfläche als prä B-Zell Rezeptor (prä BCR) exprimiert, die nun entstandene Zelle wird als prä B-Zelle bezeichnet. Im Anschluss daran kommt es, durch einen erneuten Anstieg der Rekombinations-aktivierenden Gene, zur Rekombination der leichten Immunglobulinkette (λ- oder κ-Kette). Führt dies zu einer funktionsfähigen Kette, kommt es zur Oberflächenexpression eines Immunglobulins der Klasse M, die Zelle wird jetzt unreife B-Zelle genannt.

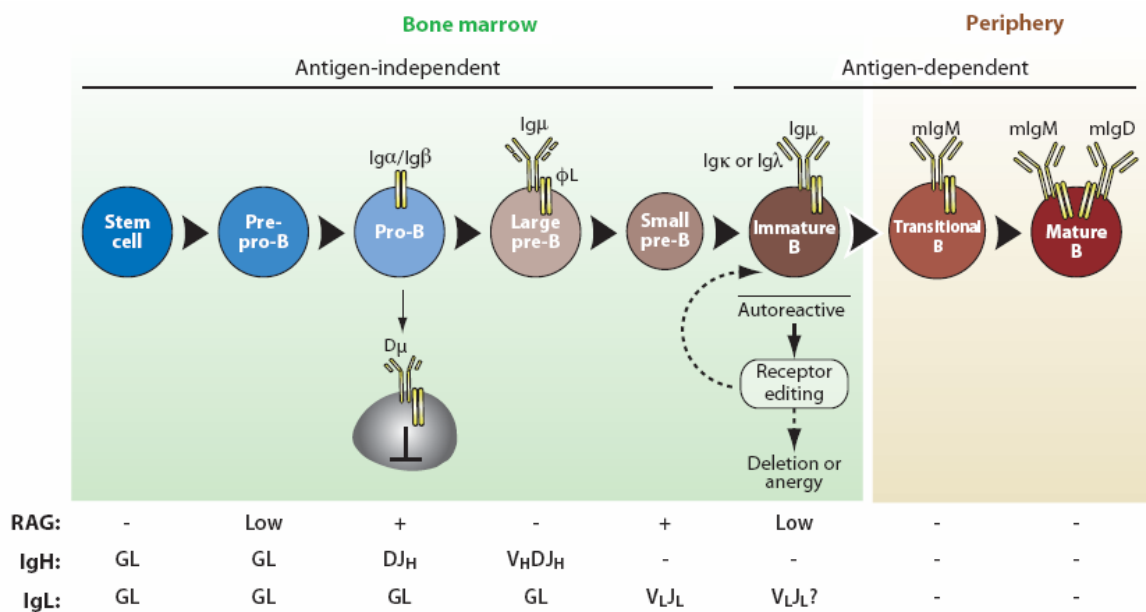


Abbildung 1: Schematische Darstellung der B-Zell Lymphopoese

Schritte der B-Zell Lymphopoese mit Darstellung der Genveränderung der Immunglobulinketten und des Spiegels der RAG (Rekombination aktivierende Gene) nach: (Kurosaki et al., 2010).

Alle bisher geschilderten Entwicklungsschritte finden im Knochenmark unabhängig von Antigenen statt. Der Kontakt zu Stromazellen im Knochenmark ist ein entscheidender Faktor für die Entwicklung von B-Lymphozyten. Zum einen bildet sich eine direkte Interaktion zwischen den entwickelnden B-Zellen und den Stromazellen aus, welche über CAMs („cell adhesions molecules“) gebildet werden. Zum anderen bilden die Stromazellen wichtige Wachstumsfaktoren für die B-Zellen, wie z.B. SCF („surface bond stem cell factor“) welcher vom Kit Rezeptor auf B-Zellen im frühen Entwicklungsstadium erkannt wird, oder IL-7, welches von Stromazellen sezerniert wird und über den IL-7 Rezeptor auf pro- und prä B-Zellen gebunden wird.

Die unreifen B-Zellen sind nun in der Lage, auch außerhalb des Knochenmarks zu überleben, als transitionelle B-Zellen („newly formed B-cells“) verlassen sie das Knochenmark. Für die weitere Ausreifung ist zunächst eine Selektion notwendig, um Zellen, die das eigene „Selbst“ als „Fremd“ erkennen, auszusortieren. Der Reifungsschritte zur reifen B-Zellen findet in sekundär lymphatischen Organen statt. Reife B-Zellen exprimieren auf der Oberfläche neben IgM auch Immunglobuline der Klasse D. Zu diesem Zeitpunkt kann man reife B-Zellen auch naive B-Zellen nennen, denn sie hatten noch keinen Kontakt zu Antigenen. Die Ansammlungen von B-Zellen in sekundär lymphatischen Organen nennt man primäre Lymphfollikel, die darin enthaltenen B-Lymphozyten heißen follikuläre B-Zellen (FOB). Durch T-Zell Aktivierung wird der primäre B-Zellfollikel zum sekundären Follikel unter Bildung eines Keimzentrums.

1.3. Subpopulationen der B-Zellen

Die transitionellen B-Zellen haben neben der Ausreifung zu reifen naiven B-Zellen (follikuläre B-Zellreihe) noch eine weitere Möglichkeit, sie können sich zu Marginalzonen B-Zellen (MZB) entwickeln (Weller S., 2005). Die Stärke des B-Zell Rezeptor (BCR)-Signals spielt dabei eine wichtige Rolle. Bei starkem BCR-Signal, was über die BTK weitergeleitet wird, entwickeln sich FOB aus den transitionellen B-Zellen, ist das BCR-Signal schwach, so entstehen MZB (Pillai S., 2005).

Bei den MZB handelt es sich um Zellen des Milzfollikels, die sich an der Grenze zwischen weißer und roter Pulpa in der Milz als Saum um das aktive Keimzentrum (Reaktionszentrum) ansiedeln. Das Keimzentrum wird von Antigen-aktivierten FOB gebildet.

Die MZB sind verantwortlich für eine schnelle Immunantwort gegen Antigene, welche über die Blutbahn via Marginalsinus in die Milz gelangen (Lopes-Carvalho T., 2005). Damit haben die MZB Kontakt zu allen Erregern, die sich einen Zutritt in die Blutbahn des Organismus verschafft haben. Die Immunantwort der MZB kann sowohl T-Zell-unabhängig als auch T-Zell-abhängig erfolgen (Pillai S., 2005).

Die Bildung der Marginalzonen-Architektur, welche nicht nur MZB sondern auch verschiedene spezialisierte Makrophagen-Populationen und Dendritische Zellen beinhaltet, ist beim Menschen bis zum 2. Lebensjahr und bei den Nagern in der 3. bis 4. Lebenswoche abgeschlossen (Lortan J., 1985; Martin F., 2002). Man vermutet, dass sich die MZB auch aus einem selbsterneuerbaren Zellpool bilden können und diese Zellen eine sehr lange Lebensspanne haben.

Neben den bisher beschriebenen B-Zellen, welche alle zu den konventionellen B2-Zellen gehören, gibt es aber noch eine weitere Art an B-Zellen, die B1-Zellen. 5-10% aller B-Zellen in Blut und lymphatischen Organen sind B1-Zellen, sie bilden sich schon in einem früheren Wachstumsstadium als die konventionellen B2-Zellen. B1-Zellen sind eine selbsterneuerbare Population, die sich durch Teilung in peripheren Geweben aufrechterhält. Ihr Ausgangspunkt ist eine unreife Stammzelle aus der pränatalen Phase.

Die Oberflächenmerkmale der B2- und B1-Zellen sind verschieden, ebenso unterscheiden sich die Eigenschaften der gebildeten Immunglobuline. Die

Antikörper der B1-Zellen binden verschiedene Antigene mit einer niedrigeren Affinität im Vergleich zu denen der B2-Zellen, folglich kann man die Antikörper der B1-Zellen als polyreaktiv bezeichnen. Sie spielen eine größere Rolle im Bereich der schnellen angeborenen Immunität als für die langsamere erworbene Immunantwort (Janeway Ch. A., 1999).

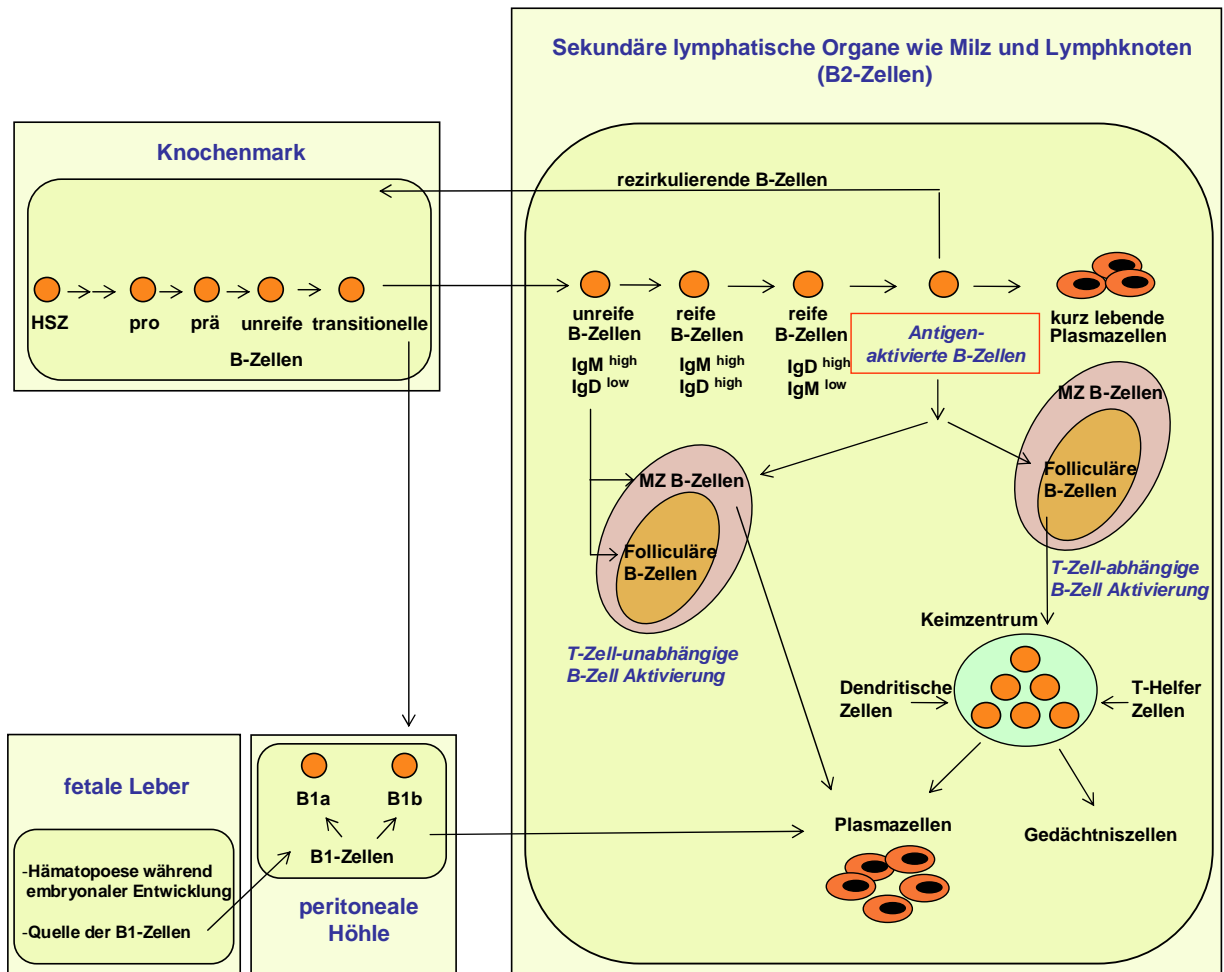


Abbildung 2: Graphische Darstellung der B-Zell Entwicklung und B-Zell Reifung

Während der Embryogenese ist die Hämatopoese in der fetalen Leber lokalisiert, post partum findet diese hauptsächlich im Knochenmark statt. Ausgangspunkt ist die hämatopoetische Stammzelle (HSZ), die sich über das pro-, prä- und unreife B-Zellstadium zum transitionellen B-Zellstadium entwickeln kann. In den sekundären lymphatischen Organen entwickeln sich die B-Zellen weiter zu Marginalzonen B-Zellen (MZB) oder zu folliculären B-Zellen, welche verschiedene Reifestadien mit wechselndem Immunglobulin-Gehalt der Klasse M und D (IgM, IgD) durchlaufen. Eine weitere Population der B-Lymphozyten stellen die B1-Zellen dar. Sie haben ihren Ausgang in der fetalen Leber und kommt hauptsächlich in der peritonealen Höhle vor. (Brunner and Wirth, 2006)

1.4. Die Bruton'sche Tyrosin Kinase (BTK)

Eines der wichtigsten Moleküle für die B-Zell Entwicklung ist die Bruton'sche Tyrosin Kinase (BTK). Störungen in der Expression einer intakten BTK führen zu schweren Defekten in der B-Zell Lymphopoese auf einem sehr frühen Stadium.

1.4.1. Vorkommen und Struktur der BTK

Die Bruton'sche Tyrosin Kinase ist eine zytoplasmatische Kinase der Tec-Familie. Sie wird in vielen hämatopoetischen Zellen exprimiert, über die hämatopoetischen Stammzellen bis hin zu B-Zellen, Monozyten, Mastzellen (Kawakami et al., 1994), neutrophile Granulozyten (Lachance et al., 2002), Dendritische Zellen (Gagliardi et al., 2003), Erythrozyten und auch in Thrombozyten (Quek et al., 1998). Dies zeigt, dass die BTK sowohl für die erworbene als auch für die angeborene Immunität eine wichtige Rolle spielt. Außerdem wurde die BTK auch in anderen multipotenten Vorläuferzellen und in primären neuronalen Zellen (Zhou et al., 2009) entdeckt. Dies deutet darauf hin, dass die BTK eine wichtige Funktion bei der Entwicklung verschiedenster Zellarten ausübt.

Die BTK ist ein 77 kDa schweres Protein. Ihre Aminosäuresequenz besteht aus 5 Domänen (s. Abb. 3), vom N-terminalen Ende aus sind dies, die Pleckstrin homologe-Domäne (PH) – zur Bindung an die Zellmembran und an Proteine –, die Tec homologe-Domäne (TH) – wichtig für die Autoregulation der Tec Kinasen – und drei Src homologe-Domänen (SH3-SH1). SH3 und SH2 sind bedeutsam für die Interaktion mit prolinreichen Regionen und phosphorylierten Tyrosinresten. Die SH1-Domäne besitzt die eigentliche Kinase-Aktivität.

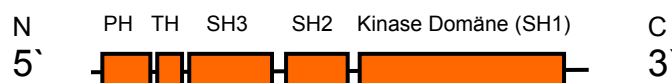


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Bruton'schen Tyrosin Kinase (BTK)

BTK mit N-terminaler Pleckstrin-Domäne anschließend folgt die Tec homologe-Domäne. Am C-terminalen Ende befinden sich drei Src homologe-Domänen, von denen die SH1-Domäne die eigentliche Kinase-Aktivität beinhaltet.

Eine Mutation im BTK Gen führt zu X chromosomal vererbter Agammaglobulinämie (XLA) beim Menschen (Tsukada et al., 1994; Vihinen et al., 2000), auch Morbus Bruton genannt und zu X chromosomal vererbter Immundefizienz (XID) bei der Maus (Thomas et al., 1993). Die XID Mutation bei Mäusen ist eine Punktmutation in der PH-Domäne. Es handelt sich hierbei um eine R28C Mutation. Beim Menschen sind bisher über 400 Punktmutationen im BTK Gen bekannt (Valiaho et al., 2006) jedoch besteht keine Relation zwischen der Lokalisation der Mutation und dem Phänotyp der XLA Patienten (Holinski-Feder et al., 1998). Das Krankheitsbild bei Mäusen zeigt einen milderen Verlauf im Vergleich zum Phänotyp beim Menschen.

Morbus Bruton ist eine schwere hereditäre Immunschwächekrankheit die mit einer mangelnden Antikörper-Bildung und damit einer reduzierten Lebenserwartung einhergeht. Grund hierfür ist die reduzierte B-Zellzahl (auf knapp 50%) (Wicker and Scher, 1986) und der unreife Phänotyp der peripheren B-Lymphozyten. Die B1-Subpopulation fehlt in BTK mutierten Organismen nahezu vollständig (Khan et al., 1995).

Wegen der X chromosomal gekoppelten Vererbung des BTK Gens erkranken überwiegend männliche Patienten an dieser Krankheit. Durch das Stillen des Säuglings werden mütterliche Immunglobuline der Klasse G auf das Kind übertragen, aus diesem Grund manifestiert sich die Erkrankung in der Regel erst frühestens ab dem 6. Lebensmonat. Durch den allmählichen Abbau der mütterlichen Antikörper im kindlichen Organismus treten gehäuft schwerwiegende, meist bakterielle, Infektionen auf, die nur schwer beherrscht werden können.

Die schlechte Abwehr von Erregern durch das Immunsystem ist darauf zurückzuführen, dass die BTK eine entscheidende Rolle für die Entwicklung und Reifung von B-Lymphozyten spielt. Durch die mutierte BTK kommt es zu einem fast vollständigen Entwicklungsstopp beim Übergang von pro B-Zellen zu prä B-Zellen. Die Signaltransduktion des prä BCR ist hierbei fehlerhaft. Im Knochenmark ist eine normale Zahl an pro B-Zellen zu beobachten, jedoch ist der Anteil der späteren Entwicklungsstadien in einem erheblich eingeschränkten Prozentsatz nachweisbar. Auch in der Peripherie ist die Zahl der B-Lymphozyten viel geringer als in gesunden Organismen.

1.4.2. Rolle der BTK in der B-Zell Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion

Ein schon sehr gut verstandener BTK-abhängiger Signalweg ist der BCR Signalweg (s. Abb. 4). Nach Bindung des Antigens an den BCR wird die intrazelluläre Sequenz zweifach phosphoryliert, hierbei handelt es sich um ein Immunrezeptor-Tyrosinbasiertes-Aktivierungsmotiv (ITAM) (Kurosaki, 1999). Nach diesem Vorgang kann Syk (zytoplasmatische Src Kinase) am ITAM binden, was über eine Konfigurationsänderung zur katalytischen Aktivierung führt. Die aktivierte Syk Kinase phosphoryliert die BTK an der Position Y551 in der SH1 Domäne, dies bedingt die katalytische Aktivität der BTK. Die zweite Phosphorylierungsstelle der BTK (Y223) wird nun autophosphoryliert (Park et al., 1996), welche die BTK zur Bindung an prolinreichen Ketten befähigt. Syk aktiviert darüber hinaus auch die PI3 Kinase, welche Phosphatidylinositol-4,5-Biphosphat (PIP2) zu PIP3 phosphoryliert. PIP3 bindet und aktiviert die PH Domäne der BTK, welche nun an der Zellmembran binden kann.

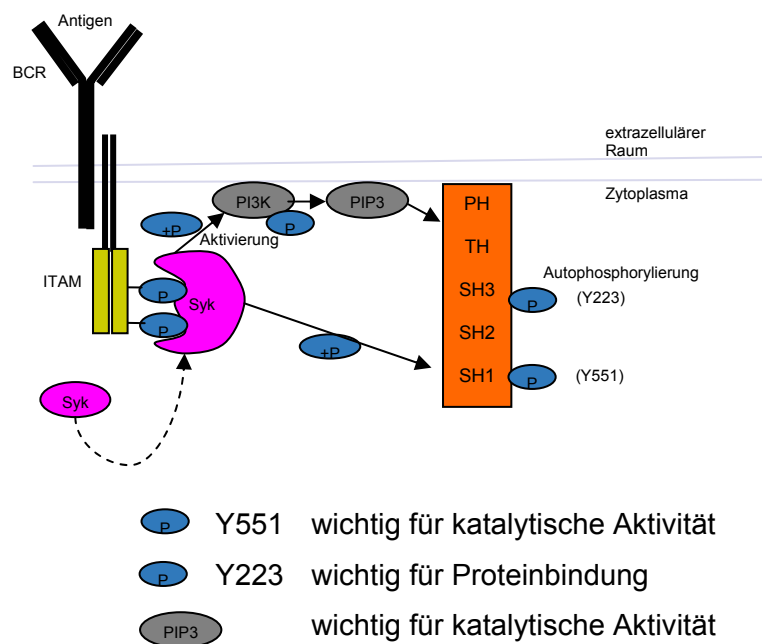


Abbildung 4: Model des B-Zell Rezeptor Signalweges mit Aktivierung der BTK

(Ausführliche Beschreibung s. Kapitel 1.2.4) Nach Aktivierung des BCR kann Syk an der intrazellulären Domäne ITAM binden und wird aktiviert. Dies führt zur Phosphorylierung der BTK. Syk bedingt darüber hinaus die Bildung von Phosphatidylinositol-1,4,5-Triphosphat welches in der Lage ist die PH Domäne der BTK zu aktivieren. Mit P wurden die Phosphorylierungen graphisch veranschaulicht. (Brunner et al., 2005)

Nach BTK Aktivierung und Bindung an die Zellmembran bindet das phosphorylierte B-Zell gekoppelte Protein (SLP-65) an die SH2 Domäne der BTK. SLP-65 beherbergt viele Bindungsstellen für Zielproteine der BTK. Die gebildeten Multiproteinkomplexe nehmen Einfluss auf die Signalweiterleitung in der Zelle, die z.B. zur Aktivierung des Weges von Calcium nach BCR Stimulation über Inositoltriphosphat und Diacylglycerol führt (Hayashi et al., 2000).

BTK ist beteiligt an der Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie z.B. NFAT oder NF- κ B. Auch in Signalwegen der MAP Kinasen (Mitogen aktiviertes Protein) ist die BTK von Bedeutung. Diese Signalwege führen zur Aktivierung von ERK1+2 (Kurosaki, 1999), JNK und p38 (Kawakami et al., 1997). Eine weitere Aufgabe wurde bei der BCR-abhängigen Adhäsion von B-Zellen an VCAM-1 und Fibronectin beobachtet. Hierbei wird durch die BTK Aktivierung das Zytoskelett neu organisiert (Spaargaren et al., 2003). Diese Funktion ist wichtig für Migration, Rezirkulation und Homing von B-Zellen.

1.4.3. Aktivierung der BTK durch eine große Vielzahl an Rezeptoren

Der BCR ist nicht der einzige Rezeptor-vermittelte Signalweg, in dem die BTK ein wichtiges Schlüsselglied für die Signalkaskade darstellt. Zytokinrezeptoren (Sato et al., 1994), G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Touhara et al., 1994), die Familie der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) Rezeptoren (Vassilev et al., 1999), RP 105 Stimulation (Miyake et al., 2000), CD40 Stimulation (Brunner et al., 2002) und auch die Bindung von Liganden an Toll-like Rezeptoren (TLR) (Jefferies et al., 2003) führen zu einer Aktivierung der BTK. Die einzelnen Rezeptoren der TLR-Familie sind nicht alle BTK-abhängig; für die TLR 4, 6, 8 und 9 wurde eine Beteiligung der BTK beobachtet (Brunner et al., 2005). Die BTK wird hierbei entweder zur intrazellulären Rezeptordomäne (TIR Domäne) oder an den Multiproteinkomplex, welcher sich aus MAL, MyD88 und IRAK zusammensetzen kann, rekrutiert (Jefferies et al., 2003).

Das große Spektrum an Rezeptoren verdeutlicht, das die BTK an vielen verschiedenen physiologischen Prozessen mitwirkt, wie an der Regulation des Calcium, der Genexpression, dem Zellzyklus mit Apoptose, Zellteilung und Zellwachstum, der Differenzierung, und auch der Zytoskelettorganisation.

Die Expression der BTK in vielen immunkompetenten Zellen und die Beteiligung an vielen Rezeptor-vermittelten Signalwegen verdeutlicht die herausragende Rolle dieser Kinase für das Immunsystem. Dies lässt auch darauf schließen, dass sie sowohl in der erworbenen, als auch bei der angeborenen Immunreaktion eine wichtige Funktion einnimmt.

1.5. Die Toll-like Rezeptoren (TLR)

1.5.1. Wichtige Eigenschaften der TLR

Die Toll-like Rezeptoren gehören ebenso wie der Interleukin-1 Rezeptor zur Toll / IL-1 Rezeptor (TIR)-Familie. Ihnen gemein ist die zytoplasmatische TIR Domäne. Diese Domäne ist entscheidend für die zelluläre Signalweiterleitung, sie vermittelt die Interaktion zwischen TLR und Adapterproteinen, welche ebenfalls eine TIR Domäne enthalten (Akira et al., 2001).

Stimuliert werden die TLR durch Pathogen-assoziierte-molekulare-Muster (PAMPs), dies sind Strukturen, die von Krankheitserregern gebildet werden und somit als Fremdmaterial erkannt werden. Aus diesem Grund kann man die TLR auch als „pathogen recognition receptor“ bezeichnen.

Durch die Stimulation der TLR werden sowohl angeborene als auch erworbene Aspekte der Immunabwehr aktiviert. Somit kommt es zu einer erhöhten Konzentration an Zytokinen, Interferon, Zelloberflächenmolekülen, Chemokin Rezeptoren, zu einem erhöhten Phagozytose-Level und zu einer gesteigerten Kapazität der Antigenpräsentation an T-Zellen (Sioud, 2005).

TLR werden von Mastzellen, Makrophagen und Monozyten, Dendritischen Zellen (Visintin et al., 2001), T- und B-Lymphozyten (Muzio et al., 2000), natürlichen Killerzellen und auch auf mucosa-assoziierten epithelialen und endothelialen Zellen (Faure et al., 2001) exprimiert. TLR sind allerdings nicht nur auf Zellen der Immunität, sondern z.B. auch auf Neuronen (Zhou et al., 2009) oder Hepatozyten (Zorde-Khvaleyevsky et al., 2009) zu finden.

Die TLR 1, 2, 4, 5 und 6 befinden sich auf der Zelloberfläche, wohingegen die TLR 3, 7, 8 und 9 intrazellulär lokalisiert sind (Krishnan et al., 2007).

Obwohl es sich bei den TLR um homolog vererbte Strukturen handelt und dies vom Mechanismus eher zur angeborenen Immunität passen würde, zeigt sich, dass die TLR entscheidend an der Entwicklung und Funktion der Lymphozyten beteiligt sind (Krishnan et al., 2007).

In folgender Tabelle sollen nun die verschiedenen TLR Liganden und ihr Vorkommen (Abstammung) dargestellt werden.

Tabelle 1: TLR und ihre korrespondierenden PAMP's

TLR erkennen Strukturen, welche hauptsächlich von pathogenen Keimen gebildet werden. Diese so genannten „PAMPs = pathogen associated molecular patterns“ stellen Liganden der TLR dar. Es sind bislang noch nicht alle Liganden der TLR identifiziert worden, darüber hinaus werden auch endogene Liganden vermutet. (verändert nach (Takeda and Akira, 2005))

Rezeptoren:	PAMPs (Liganden) :	Vorkommen:
TLR 1	Triacyl-Lipopeptide, lösliche Faktoren	Bakterien (Mykobakterien)
TLR 2	Peptidoglycan, Lipoteichonsäure, Hsp 70, Lipopolysaccharid (LPS)	gram-positive Bakterien, Hefe, Tumorzellen
TLR 3	doppelsträngige RNA	Viren
TLR 4	LPS, Lipopeptide, Hyaluronsäure, Fibronectin, Hsp 70, Fibrinogen	gram-positive Bakterien, Pflanzen, Tumorzellen
TLR 5	Flagellin	Bakterien
TLR 6	Diacyl-Lipopeptid, Lipoteichonsäure	gram-positive Bakterien
TLR 7 und 8	einzelsträngige RNA,	Viren, synthetische Komponenten
TLR 9	CpG reiche DNA, synthetisches ODN	Viren und Bakterien
TLR 10 bis 13 (murin)	Hinweis auf Profilin-ähnliche Moleküle	uropathogene Bakterien

1.5.2. Signaltransduktion der Toll-like Rezeptoren

Bei der Signaltransduktion der TLR sind bislang fünf zytoplasmatische Adapterproteine entdeckt worden. Diese sind:

MyD88 („myeloid differentiation primary response gene 88“)

(Fitzgerald et al., 2001),

MAL („MyD88-adaptor-like protein“) (Fitzgerald et al., 2001),

TRIF („TIR domain-containing adaptor protein inducing Interferon- β “)

(Yamamoto et al., 2002b),

TRAM („TRIF-related adaptor molecule“) (Yamamoto et al., 2003)

und das jüngst entdeckte

SARM („sterile α - and Armadillo-Motif-containing protein“)

(Carty et al., 2006).

Die Signalweiterleitung der TLR lässt sich grob in sehr häufige MyD88-abhängige und seltene MyD88-unabhängige Wege einteilen (Takeda and Akira, 2005). TLR 3 transduziert MyD88-unabhängig in den Zellkern, TLR 4 kann sowohl

MyD88-unabhängig als auch MyD88-abhängig Signale weiterleiten. MyD88 besitzt eine carboxyterminale TIR- und eine aminoternale Todes Domäne.

MAL hat große strukturelle Ähnlichkeiten mit MyD88 (Fitzgerald et al., 2001). Es wird nur für die Signaltransduktion von TLR 2 und 4 (MyD88-abhängiger Weg), verwendet. Seine Hauptaufgabe ist die Mithilfe bei der MyD88 Rekrutierung an die Zellmembran, also zu den zytoplasmatischen Domänen der beiden TLR. Die Interaktion von MAL und MyD88 bewirkt eine schnellere Antwort. Es konnte gezeigt werden, dass MAL ausschließlich an den MyD88-abhängigen Signalwegen beteiligt ist (Kagan and Medzhitov, 2006).

TRIF wurde zunächst mit der Induktion von IFN- α und IFN- β nach viralen Infektionen in Verbindung gebracht (Yamamoto et al., 2002a). Inzwischen ist aber auch bekannt, dass TRIF bei bakteriellen Infektionen eine Rolle spielt. Bei den MyD88-unabhängigen Signalwegen ist TRIF das entscheidende Adapterprotein.

TRAM besitzt eine TIR Domäne (Bin et al., 2003) und vernetzt TLR 4 mit TRIF.

SARM wurde jüngst als negativer Regulator in TRIF-abhängigen TLR Signaltransduktion entdeckt, diese Funktion konnte nicht in MyD88-abhängigen Wegen entdeckt werden (Carty et al., 2006).

Die weitere Signaltransduktion der MyD88-abhängigen Wegen erfolgt über verstärkende und hemmende Proteine der Familie der IL-1 Rezeptor assoziierten Kinasen (IRAK). Bei den MyD88-unabhängigen Signalwegen ist die IRAK-Familie nicht beteiligt. Hier erfolgt eine Interaktion mit Mitgliedern der Rezeptor Interagierenden Protein (RIP)-Familie (Krishnan et al., 2007).

Des weiteren ist das Schlüsselprotein TNF Rezeptor-assoziierter Faktor 6 (TRAF 6), welches wiederum die „transforming-growth-factor associated kinase 1“ (TAK 1) aktiviert (Sun et al., 2004). Dies führt entweder zur Aktivierung des NF- κ B Signalweges über den IKK-Komplex (Sato et al., 2003), oder zur Phosphorylierung von Mitglieder der MAP-Kinase-Kinase Familie, MKK 1 und 2, die ihrerseits die MAP-Kinasen JNK und p38 aktivieren (Ninomiya-Tsuji et al., 1999). Die Endstrecke der TLR Stimulation ist die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (NF- κ B, IRF 3/7/5 und AP-1), welche zur Expression von proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF- α , IL-1 β , IL-6 oder IL-12 und zur anschließenden Limitierung der Genexpression führen.

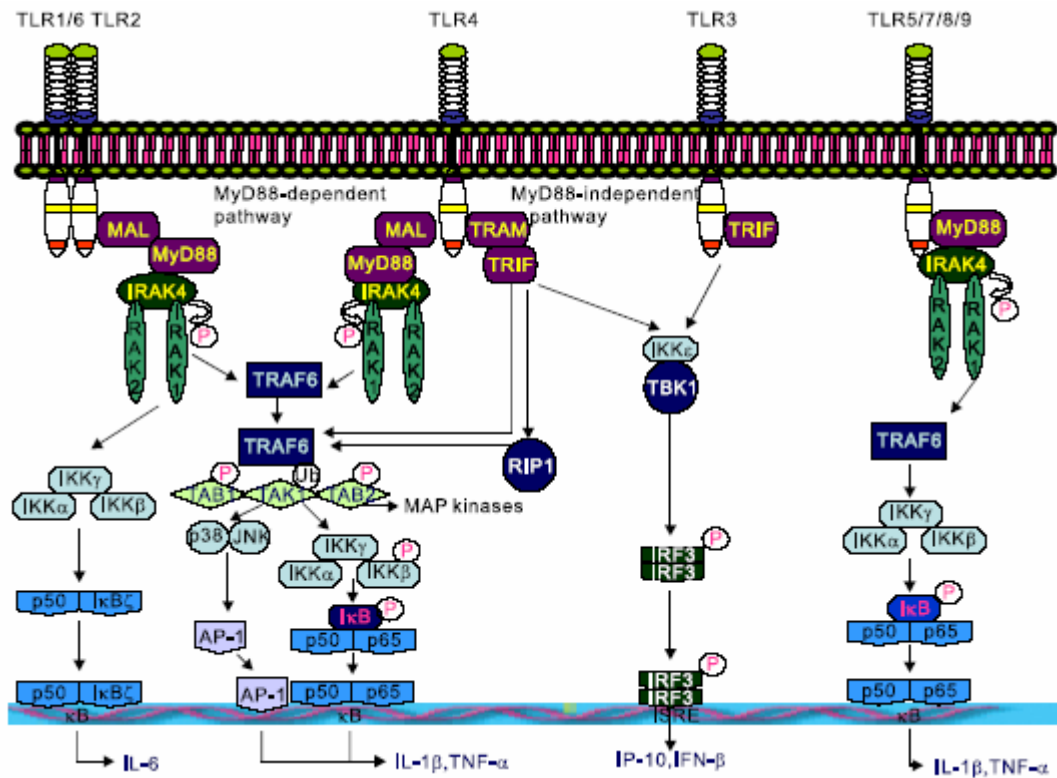


Abbildung 5: Die Signaltransduktion von Toll-like Rezeptoren lässt sich im weitesten Sinne in MyD88-abhängige und MyD88-unabhängige Wege einteilen.

(Ausführliche Beschreibung s. Kapitel 1.5.2). Alle TLR mit Ausnahme des TLR 3 verwenden MyD88 als Adapterprotein, neben MyD88 gibt es noch 4 weitere Adapterproteine, dies sind MAL, TRIF, TRAM und SARM. MyD88 bindet an die TIR Domäne des Rezeptors und führt über die Phosphorylierung von Mitgliedern der IRAK-Familie zur Phosphorylierung von TRAF 6 was zu einer Aktivierung des TAK Komplexes führt. IKK-, JNK- und p38 Signalwege führen zur inflammatorischen Antwort nach TLR Stimulation. (Krishnan et al., 2007)

1.5.3. Die Rolle der BTK in TLR vermittelten Signalwegen

Die Bruton'sche Tyrosin Kinase (BTK) ist ein wichtiges Enzym für viele verschiedene Signalwege. Sie ist z.B. beteiligt bei der Signalweiterleitung des BCR (Brunner et al., 2005). Auch für die Signaltransduktion der TLR wurde eine Mithilfe und wichtige Beteiligung der BTK entdeckt (Jefferies et al., 2003).

Es konnte gezeigt werden, dass die BTK direkt mit der TIR Domäne von TLR 4, 6, 8 und 9 interagiert (Jefferies et al., 2003). Darüber hinaus wurde auch eine Wechselwirkung von BTK mit den Adapterproteinen MyD88 und MAL beobachtet und es konnte eine Interaktion mit der Kinase IRAK 1 festgestellt werden (Jefferies et al., 2003). Bislang konnte keine Interaktion von BTK und

anderen TLR Adapterproteinen oder dem Schlüsselprotein TRAF 6 im TLR Signalweg beobachtet werden (Jefferies et al., 2003).

Nach der Stimulation der TLR 2 und 4 wird MAL durch die BTK phosphoryliert, was letztendlich für die Aktivierung von NF- κ B erforderlich ist. Durch die MAL-Phosphorylierung kommt es nachfolgend zur Degradation von MAL (Mansell et al., 2006). Ist dieser Abbau gestört, kommt es zur Potenzierung der Entzündungsreaktion. Man kann also davon ausgehen, dass die BTK-abhängige Aktivierung von MAL und die nachfolgende Degradation zur Limitierung der primären angeborenen Immunantwort notwendig sind (Mansell et al., 2006).

Es konnte gezeigt werden, dass TLR 4 Stimulation muriner Makrophagen durch LPS zu einer Aktivierung der BTK Kinaseaktivität führt (Doyle et al., 2005; Jefferies et al., 2003). Neben der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wurde auch beobachtet, dass die Sekretion von antiinflammatorischen Zytokinen nach TLR 4 Aktivierung muriner Makrophagen, wie IL-10, BTK-abhängig ist (Schmidt et al., 2006). Für die NF- κ B Aktivierung via TLR 9 ist ebenfalls eine intakte BTK erforderlich (Doyle et al., 2007).

Nicht nur für die angeborene Immunabwehr wurde eine Bedeutung und wichtige Rolle der TLR entdeckt, auch für die erworbene Immunantwort sind die TLR wichtig. Zum einen haben die TLR Funktionen, wie z.B. die Mithilfe bei der Rekombination der Immunglobulingene, oder für das immunologische Gedächtnis (Akira, 2001), zum anderen sind die B-Zellen neben den Dendritischen Zellen wichtige Antigen-Präsentierende-Zellen. Es konnte ebenfalls beobachtet werden, dass TLR Ligation von B-Zellen für die Antikörper Produktion unter physiologischen Bedingungen, wie auch bei Autoimmunreaktionen wichtig ist (Nemazee et al., 2006).

Die wichtige Rolle der BTK an der Signaltransduktion der TLR kann in BTK-defekten Zellen z.B. an der veränderten Expression von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen nach TLR 9 Stimulation oder am veränderten sezernierten Immunglobulin-Profil verdeutlicht werden. Auf molekularer Ebene lässt sich eine defekte Aktivierung von NF- κ B nach TLR 9 Stimulation nachweisen (Lee et al., 2008).

1.6. Fragestellung der Arbeit

Die Bedeutung von BTK im B-Zell Rezeptor-vermittelten Signalweg ist unumstritten.

In den letzten Jahren verdichteten sich die Hinweise darauf, dass der Toll-like Rezeptor-vermittelte Signalweg den B-Zell Rezeptor-vermittelten Signalweg in der Reaktion auf T-Zell-unabhängige Antigene unterstützt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass BTK ein signaltransduzierendes Molekül im Toll-like Rezeptor-vermittelten Signalweg ist.

Die T-Zell-unabhängige Aktivierung des B-Zell Rezeptors ist während der Differenzierung und Selektion von B-Zellen in der Antigen-unabhängigen Phase der B-Zell Entwicklung von entscheidender Bedeutung. Auf der anderen Seite wurde auch gezeigt, dass die MyD88-abhängige Aktivierung von TLR durch endogene Liganden bestimmte Entwicklungsprozesse – z.B. neuronale – beeinflusst.

Deshalb sollte in dieser Arbeit folgende Fragen beantwortet werden:

1. Beeinflusst die fehlende Expression von MyD88 die Entwicklung von B-Zellen?
2. Kann die Beeinträchtigung der B-Zell Entwicklung BTK-defizienter Tiere durch das gleichzeitige Fehlen einer MyD88 Expression weiter verstärkt werden?
3. Lässt sich aus diesen Untersuchungen eine Beteiligung von BTK im MyD88-abhängigen Signalweg in B-Zellen während der B-Zell Entwicklung ableiten?

2. Material und Methodik

2.1. Techniken

2.1.1. Präparation von Mäusen

Alle durchgeführten Experimente sind laut Tierschutzgesetz keine Tierexperimente, da es sich lediglich um die Entnahme von Organen nach fachgerechtem Töten handelt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass den Tieren keine Schmerzen oder unnötiges Leiden zugefügt werden. Für diese Untersuchungen liegen der Abteilung Physiologische Chemie an der Universität Ulm die notwendigen Genehmigungen vor.

Zur Untersuchung von verschiedenen Entwicklungsstadien und Subtypen der B-Zellen wurden folgende Mäuse der Linie C57/Bl6 verwendet:

- wildtypische Mäuse
- BTK-knock out Mäuse
- MyD88-knock out Mäuse
- BTK- und MyD88-doppel knock out Mäuse

Es wurden Mäuse beider Geschlechter untersucht, die zwischen 8 und 12 Wochen alt waren. Die Tiere wurden getötet und nach Desinfektion der Bauchhaut wurden die entsprechenden Organe und Zellen den Mäusen entnommen. Zuerst wurden die Zellen aus der Peritonealhöhle gespült, anschließend wurden die Milz und die langen Röhrenknochen der unteren Extremität entnommen.

Vor der Präparation einer weiteren Maus wurden zunächst die Knochenmarkszellen aus den gewonnenen Röhrenknochen ausgespült und in Kultur genommen.

10x PBS:

171mM	Natriumchlorid
3,4mM	Kaliumchlorid
10mM	Na ₂ HPO ₄
1,8mM	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
pH 7,2 – 7,3 einstellen	

RPMI Medium (Fa. PAN Biotech GmbH, Aidenbach), ergänzt durch:

1%	Penicillin / Streptomycin
1%	Glutamin
0,1%	β-Mercaptoethanol

2.1.2. Gewinnung von B-Zellen aus dem Knochenmark

Nach Entnahme der Knochen der unteren Extremität wurden aus diesen an einem sterilen Zellkulturarbeitsplatz die Knochenmarkszellen isoliert. Hierfür wurde im Voraus pro Maus ein 15ml Falcon befüllt mit 10ml RPMI Medium (s. 2.1.1.) vorbereitet.

Mit Hilfe des RPMI Mediums und einer feinen Kanüle wurden die vier Röhrenknochen jeder Maus (2x Femur und 2x Tibia) nacheinander in das jeweilige 15ml Falcon ausgespült.

Durch sorgfältiges Vortexen wurden die Knochenmarkszellen gut gelöst und 1ml der Knochenmarkssuspension in einem 1,5ml Reaktionsgefäß auf Eis für die genauere Analyse der Populationen im Knochenmark (mittels FACS) zur Seite gestellt.

Die restliche Zellsuspension wurde zur Kultivierung von Vorläufer B-Zellen verwendet. Diese wurde mit 900 rpm 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 7ml IMDM Medium (mit IL-7) resuspendiert und auf am Vortag vorbereitete Zellkulturflaschen mit bestrahlten ST2-Zellen ausgesät (s. Kapitel 2.1.7.).

IMDM Medium (Fa. PAN Biotech GmbH, Aidenbach), ergänzt durch:

5%	FCS
1%	nicht essentielle Aminosäuren
1%	Penicillin / Streptomycin
1%	Glutamin
0,6%	Primaton
0,1%	β -Mercaptoethanol
4%	IL-7 aus dem Überstand von IL-7 produzierenden Zellen

2.1.3. Isolierung von B-Zellen aus der Milz

Um die Organstruktur der Milzen zu lockern und die Zellen in Suspension nehmen zu können, wurden feinmaschige Netzfilter zum Zerstoßen der Milzen verwendet. Diese Filter wurde zunächst mit Ethanol desinfiziert und nach Einwirkungszeit und Verflüchtigen des Alkohols in je ein Loch einer 6 Wellplatte, in welche 5ml RPMI Medium (s. 2.1.1.) vorgelegt wurden, überführt. Für jede Milz wurde ein eigener Filter vorbereitet, in diesem wurde dann die Milz mit dem Stempel einer 5ml Spritze zerstoßen, sodass die vereinzelt Zellen durch den Filter in das Medium gelangen konnten, wohingegen die Bindegewebsstrukturen der Milz durch den Filter zurückgehalten wurden. Die Zellsuspension wurde mit einer Pasteurpipette in ein 15ml Falcon auf weitere 5ml RPMI Medium überführt. Nach Zentrifugation (12000 rpm, 5 min) verwarf man den Überstand und resuspendierte das Pellet mit 5ml 0,16 molaren NH_4Cl . Nach guter Resuspension inkubierte die Zellsuspension 5 min bei Raumtemperatur. Dieser Schritt bedingt die Lyse der Erythrozyten. Das weiße Pellet wurde in 1ml FACS Puffer resuspendiert und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt.

FACS Puffer:

10%	10x PBS (s. 2.1.1.)
0,1%	Bovine Serum Albumin
0,1%	Natriumazid

2.1.4. Gewinnung von B-Zellen aus der peritonealen Flüssigkeit

Zur Gewinnung der speziellen B-Zell Subtypen (B1-Zellen) aus der peritonealen Flüssigkeit wurde zunächst nur die Bauchdecke entlang der Linea alba eröffnet. Nun wurde mit einer 5ml Spritze und einer Kanüle mit 0,8mm Durchmesser vorsichtig 3 bis 5ml PBS (s. 2.1.1.) in die Peritonealhöhle injiziert und anschließend vorsichtig ohne Verletzung der Darmschlingen wieder abgezogen. Nach Zentrifugation (12000 rpm, 5 min) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1ml FACS Puffer (s. 2.1.3.) zur weiteren Analyse resuspendiert.

2.1.5. Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden eine 1:2 Verdünnung, also 20µl Zellsuspension mit 20µl Trypanblau (1:10 verdünnt mit PBS), in einem separatem 1,5ml Reaktionsgefäß hergestellt. Die verwendete Neubauer Zählkammer wurde maximal mit der gefärbten Zellsuspension gefüllt und unter dem Mikroskop mit 10facher Vergrößerung ausgezählt. Es wurden zur genaueren Bestimmung nicht die Mitte sondern die vier äußersten Bereiche der Kammer ausgezählt und anschließend aus der gezählten Zahl der Mittelwert durch dividieren durch vier gebildet. Zur Ermittlung der Zellzahl („Zellen pro ml“) wurde diese Zellzahl nun mit dem Verdünnungsfaktor (2) und dem Volumenfaktor der Zählkammer (10^4) multipliziert.

$$\text{Zellzahl} * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{Volumenfaktor} = \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}}$$

2.1.6. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Als Einfriermedium für ST2-Zellen (Stromazellen des Knochenmarks) wurde IMDM Medium (s. 2.1.2.) verwendet.

Die gewünschte Zellzahl (z.B. 1×10^7 oder 3×10^6 je Tube) wurde abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min) und der Überstand verworfen. Nun wurde das Pellet in Einfriermedium resuspendiert und je 1ml pro Cryo-Tube 30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Tubes in Styropor 24 Stunden bei -80°C zwischengelagert und danach im Stickstofftank endgelagert.

Einfriermedium:

50%	IMDM Medium (Fa. PAN Biotech GmbH, Aidenbach)
40%	FCS
10%	DMSO

Das Auftauen von Zellen wurde rasch im Wasserbad bei 37°C durchgeführt. Die aufgetaute Zellsuspension wurde mit gestopften Pasteurpipetten in ein Falcon mit 10ml Medium überführt und abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min). Nach Absaugen des Überstandes resuspendierte man die Zellen in neuem Medium und bestimmte die Zellzahl.

2.1.7. Etablierung von prä B-Zelllinien aus Knochenmarksvorläuferzellen

Zur Kultivierung von prä B-Zellen sind Stromazellen nötig. Hierfür wurden ST2-Zellen verwendet. Die prä B-Zellen wurden alle 3-4 Tage auf frisch ausplattierte und bestrahlte ST2-Zellen umgesetzt. Die ST2-Zellen wurden mit 3000 rad (¹³⁷Cs Strahler) bestrahlt, was die Zellen an der Proliferation hindert, jedoch leben die Zellen noch einige Tage weiter und setzen wichtige Faktoren für ein passendes Umgebungsmilieu der prä B-Zellen frei.

Für die Kultivierung von prä B-Zellen wurde die gewonnene Zellsuspension aus dem Knochenmark mit 900 rpm, 5 min abzentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt und das Pellet in 7ml IMDM Medium (s. 2.1.2.) resuspendiert.

Nach der Gewinnung von B-Zellen aus dem Knochenmark handelt es sich noch nicht um eine reine prä B-Zellpopulation, deshalb wird bei den ersten zwei Umsetzungsvorgängen die doppelte Anzahl an Zellen in jede Flasche ausgesät. Die prä B-Zellen werden in IMDM Medium mit 4% IL-7, eines IL-7haltigen Überstandes IL-7 sezernierender Zellen, im Zellkulturschrank bei 37°C mit 10% CO₂ kultiviert.

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Zellkulturflaschengröße mit Anzahl der ausgesäten ST2- und prä B-Zellen und Angabe der eingesetzten Mediumsmenge

Zellkulturflaschen	ST2-Zellen	prä B-Zellen	IMDM Medium
25cm ²	3x10 ⁵	1x10 ⁶	7ml
75cm ²	1x10 ⁶	3x10 ⁶	20ml

2.1.8. FACS (Flowcytometric Analysis and Cell Sorting)

Zur FACS Analyse (Durchflusszytometrie) wurden je Färbung 1×10^6 Zellen verwendet und diese zunächst mit 1ml FACS Puffer (s. 2.1.3.) gewaschen. Nun wurde 10 μ l des Mixes aus 1:10 verdünntem Fc-Block in FACS Puffer auf jedes Pellet pipettiert (dies entspricht 1 μ l Fc-Block / 1×10^6 Zellen), diese sehr gut darin resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend kamen 10 μ l des Mixes aus 1:20 verdünnten Antikörpern in FACS Puffer dazu (dies entspricht 0,5 μ l Antikörper / 1×10^6 Zellen). Nach dem Vortexen inkubierte man die Zellen zugedeckt 20 min auf Eis. Dann wurden die Zellen 20 sec abzentrifugiert, der Überstand verworfen, in 300 μ l 1xPBS (s. 2.1.1.) resuspendiert und in FACS Röhrchen überführt.

Zur Vermessung und zum kalibrieren des FACS Gerätes wurden zusätzlich Einzelfärbungen unter Verwendung jedes im Experiment eingesetzten Antikörpers durchgeführt.

Durch die Einzelfärbungen konnte die Kompensation am FACS-Gerät durchgeführt werden. Danach wurden die Proben im Gerät analysiert. Bei der Untersuchung mittels Durchflusszytometrie misst das Gerät die gefärbten Oberflächenmoleküle auf den Zellen und erstellt für jede Zelle, die durch das Gerät gesaugt und dabei vermessen wird einen Punkt im Koordinatensystem.

Zu Beginn wurde immer in der FSC/SSC-Darstellung auf lebende und lymphoide Zellen gegatet (s. Abb. 6). FSC ist der „forward scatter“, welcher die Größe der Zellen bestimmt und SSC bezeichnet den „side scatter“, der die Granularität bestimmt. Im Anschluss wurden die lebenden Zellen je nach Färbung weiter analysiert. (s. Kapitel 3.1.)

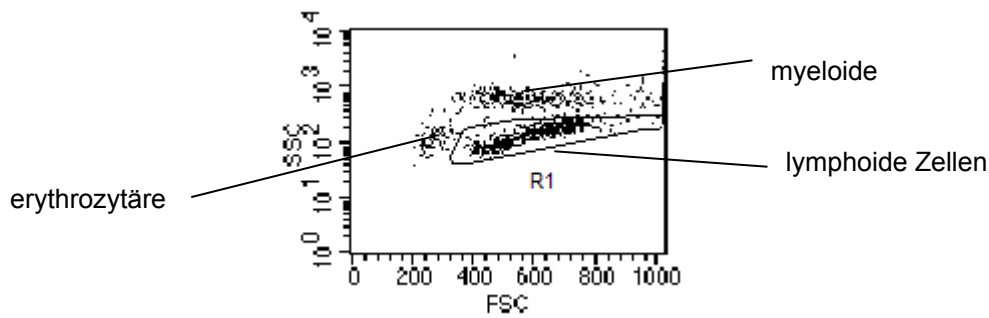


Abbildung 6: FACS-Analyse (Durchflusszytometrie)

Markierung der lebenden Zellen in einem FSC/SSC-Diagramm. FSC gibt im „forward scatter“ die Größe und SSC im „side scatter“ die Granularität der Zellen an. Mit Markierung R1 wurden die lebenden Zellen markiert.

2.1.9. Klonierung

Für weitere Analysen der Funktion der BTK wurden Plasmide mit verschiedenen Varianten der BTK kloniert. Es wurde die wildtyp-Form und vier verschiedene Mutanten der BTK verwendet, dies waren: R28C, E41K, Y223F und K430R.

- R28C ist eine Punktmutation, welche Arginin gegen Cystein austauscht. Dies führt zu einer inaktiven Variante der BTK und entspricht der XID-Mutation bei Mäusen.
- E41K tauscht Glutamin gegen Lysin und führt somit zu einer konstitutiv aktiven Form der BTK.
- Y223F führt zum Basenaustausch von Tyrosin zu Phenylalanin. Die Position 223 ist die Autophosphorylierungsstelle. Eine Mutation in diesem Bereich bedingt eine Kinase-dead-Mutation.
- K430R tauscht Lysin gegen Arginin aus und stellt ebenfalls eine inaktive Form der BTK dar. Diese Mutation befindet sich in der Kinase Domäne.

Die fünf Varianten der BTK wurden zunächst in einen pBi5-Vektor kloniert. Dieser Vektor enthält ein FLAG-Element. Dies ist ein neun Aminosäure großes Peptid, was als Erkennungssequenz verwendet werden kann. Die BTK-Varianten wurden hinter dem FLAG in den Vektor mit Hilfe der Restriktionsenzyme Not 1 und Sal 1 ligiert.

Nach erfolgreicher Klonierung der BTK Varianten in den pBi5-Vektor wurden das FLAG-getaggte BTK Konstrukt mit den Restriktionsenzymen EcoRV und Mlu I wieder ausgeschnitten und dann in den pcDNA3-Vektor über die EcoRV-„blunt-end“-Schnittstelle ligiert.

Im Folgenden sollen nun die einzelnen Schritte der Klonierung näher beschrieben werden.

2.1.9.1. PCR (Polymerase Ketten Reaktion)

Zur Vervielfältigung der BTK Varianten wurden die Gene aus bereits vorhandenen Plasmiden in der Abteilung verwendet. Die fünf Formen der BTK lagen in pBlueskript-Vektoren vor. Für die Amplifikation des jeweiligen Genes wurde als Matrize für die PCR der entsprechende pBlueskript-Vektor verwendet. Um die notwendigen Restriktionsschnittstellen am 5'- und am 3' Ende der BTK-DNA hinzuzufügen, welche nötig sind um die Gene in ein weiteres Plasmid zu integrieren, wurden spezielle Primer designed, die durch die Fa. MWG (Ebersberg) synthetisiert wurden. Im ersten Schritt wurden die BTK Varianten mit Hilfe der Not 1 und Sal 1 Schnittstellen (unterstrichen markiert) in den pBi5-Vektor integriert. Hierfür waren zwei weitere Primer nötig:

Not 1 5' Primer: 5' GAA AGC GGC CGC TAT GGC CGC AG 3'

Sal 1 3' Primer: 5' GCT TAT TGT CGA CCT CAG GAT TCT TCA TCC ATG AC 3'

Für die PCR wurde die Accu-Taq wegen ihrer geringeren Fehlerrate, aufgrund der Korrekturlesefähigkeit, verwendet.

Ein 50µl Ansatz bestand aus:

PCR Ansatz:

33µl	Ampuwa autoklaviert
3µl	Primer 5' (10pmol/µl)
3µl	Primer 3' (10pmol/µl)
2,5µl	10 mM dNTP's
5µl	10x Puffer
0,5µl	Accu-Taq
3µl	Plasmid (2,5ng/µl)

Die Zyklen der PCR-Maschine wurden wie folgt eingestellt:

Tabelle 3: Programmierung der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)-Maschine

Mit Angabe der Gradzahl und der eingestellten Dauer jedes Zyklus.

Denaturierung	94°C	3 min
Denaturierung	94°C	30 sec
Annealing	64,2°C	30 sec
Elongation	68°C	2 min 15 sec
Elongation	68°C	10 min

30 Zyklen

Für die Auftrennung der doppelsträngigen DNA in einzelne Stränge sind 94°C nötig, anschließend ist die optimale Temperatur der Primer notwendig, dass diese an den DNA-Einzelstrang binden können und mit 68°C wird die optimale Temperatur der Accu-Taq DNA Polymerase erreicht.

2.1.9.2. Gel-Elektrophorese

Nach der PCR muss man die amplifizierten DNA-Fragmente aufreinigen und vom restlichen PCR-Ansatz trennen. Dies wurde mit der Auftrennung mittels Elektrophorese im Agarosegel erreicht. Als Laufpuffer verwendete man dafür 1x TAE. Zur Markierung der Laufgeschwindigkeit und zur Detektion der richtigen DNA-Größe wurde ein 1kb DNA-Marker verwendet. Um die DNA zu markieren und unter dem UV-Licht sichtbar zu machen wurden zu jedem 50µl Ansatz 5µl 10x Ladepuffer gegeben, der Ethidiumbromid enthält.

0,8%iges Agarosegel:

120ml	1x TEA
0,96g	Agarose
5µl	Ethidiumbromid

50x TEA:

968g	Tris
148g	EDTA
22,8ml	Essigsäure 100%ig
mit Wasser auf 4 Liter auffüllen	

10x Ladepuffer:

5g	Ficoll
7,5g	Glycerin
4ml	EDTA (vom 0,5mM EDTA)
mit Wasser auf 50ml auffüllen	
< 0,1g	Xylencyanol
<0,1g	Bromphenolblau

2.1.9.3. Gel-Elution

Die gewünschten DNA-Fragmente im Agarosegel wurden mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten. Die gewonnenen Gel-Stücke bearbeitete man mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraktions-Kits“ um die enthaltene DNA daraus zu lösen, anschließend entfernte man die Gel-Reste über sterile Säulen von der DNA. Die herausgefilterte DNA wurde nach Waschschritten mit Elutionspuffer von der Säule gelöst und in einem sterilen 1,5ml Reaktionsgefäß bei -20°C aufbewahrt.

2.1.9.4. Transformation chemokompetenter Bakterien

Zur Vervielfältigung der Plasmide mussten diese in Bakterien integriert werden um sie durch den bakteriellen Stoffwechsel amplifizieren zu lassen.

Es wurden Dh5α-Bakterien (K12-Derivat der E.coli Bakterien) verwendet. 1µl Plasmid wurde in 50µl Bakterien transformiert. Durch Temperaturschwankungen

erreicht man eine Durchlässigkeit der Bakterienmembran und die Plasmide können in das Zytoplasma aufgenommen werden. Nach diesem Verfahren wurde eine kleine Vorkultur mit 800µl LB Medium für ca. 45 Minuten bei 37°C auf dem Schüttler angesetzt. Die Dh5α-Bakterien der Vorkultur wurden in ein 500ml Erlenmeyer-Kolbengefäß mit Schikane überführt und mit 150ml LB Medium mit 50µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C und 180-200 rpm im Schüttler kultiviert. Die verwendeten Plasmide hatten jeweils eine Resistenz für das Antibiotikum Ampicillin, was die transformierten Bakterien unempfindlich gegenüber Ampicillin macht. Am nächsten Tag zentrifugierte man die gewachsene und damit plasmidhaltige Bakterienkultur mit 6000 rpm, 15 min lang bei 4°C ab und verwarf den Überstand.

Zur Vervielfältigung der Ligationsansätze (s. 2.1.9.7.) wurden 5µl Ligationsansatz in 30µl XL-1 blue Bakterien transformiert. Das Vorgehen unterscheidet sich nicht von dem der Transformation von Dh5α-Bakterien. Die Vorkultur der XL-1 Bakterien wurde jedoch ausplattiert um monoklonale Bakterienkulturen zu erhalten. Die Agarplatten wurden ebenfalls über Nacht bei 37°C kultiviert. Am nächsten Tag wurden die gewachsenen Kolonien mittels Pipettenspitze gepickt und diese in 3ml LB Medium in ein Reagenzglas mit Deckel (Wassermann-Röhrchen) gegeben. Diesen Ansatz hat man erneut über Nacht bei 37°C im Schüttler mit 200 rpm kultiviert.

LB Medium:

5g	Yeast
10g	Peptone / Trypton
10g	NaCl
15g	Agar (wenn Platten gegossen werden sollen)

mit Wasser auf 1 Liter auffüllen und autoklavieren

2.1.9.5. Mini- und Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Isolation der Plasmide aus den Bakterien wurde ein Kit verwendet. Für die großen Ansätze (150ml) wurde entweder das „PureLink™ HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit“ oder das „PureYields™ Plasmid Midiprep System“ verwendet. Bei

den kleinen Ansätze (3ml) wurde zur Überprüfung der Ligation das „QIAprep Spin Miniprep Kit“ verwendet.

Nach Resuspension und Lyse der plasmidhaltigen Bakterien wurden die Proteine und die restlichen Zellbestandteile mit dem Präzipitationspuffer gefällt und vom DNA-haltigen Überstand getrennt. Die gewünschte DNA wurde mit Hilfe von sterilen Säulen isoliert und konnte nach Waschschritten, Elution und Fällung mit Isopropanol in einem 1,5ml Reaktionsgefäß aufgefangen werden.

Die DNA-Konzentration wurde mit dem Photometer bei einer Absorption von 260nm bestimmt.

2.1.9.6. Restriktionsenzym-Verdau

6µg Plasmid wurden in einem 20µl Ansatz mit den jeweiligen Restriktionsenzymen 2 Stunden bei 37°C verdaut. Das gewünschte Insert wurde in einem 200µl Ansatz mit den gleichen Bedingungen verdaut wie das jeweils benötigte Plasmid. Nach dem Verdau im Brutschrank wurden die Ansätze 20 min bei 80°C inkubiert um die Restriktionsenzyme zu denaturieren und damit die Reaktion gestoppt.

Bei der Klonierung der bereits FLAG-getaggten BTK-Varianten wurde der pcDNA3-Vektor mit dem Restriktionsenzym EcoRV geöffnet. Dies führt zu einer „blunt-end“-Schnittstelle. Bei einer derartigen „Vektor-Öffnung“ ist das Risiko der Religation sehr hoch, deshalb hat man das geschnittene Plasmid dephosphoryliert, um damit die Religation zu verhindern. Da jedoch das Insert (FLAG-getaggte BTK) mit EcoRV und Mlu I aus dem pBi5-Vektor geschnitten wurde und Mlu I einen überhängenden Einzelstrang stehen lässt, musste dieser erst zu einem „blunt-end“ umgewandelt werden bevor man dieses Insert in den pcDNA3 integrieren konnte. Für die Bildung des „blunt-end“ wurde die Klenow-Polymerase verwendet. Die Klenow-Polymerase-Reaktion ergänzt am 3' Ende komplementäre Basen.

Anschließend wurden diese Ansätze durch Gelelektrophorese (s. 2.1.9.2.) auf einem 0,8%igem Agarosegel aufgetrennt und das jeweilige Plasmid und das einzubauende Inserts von den restlichen Inhalten der Ansätze getrennt.

Nach der Auftrennung mittels Gelelektrophorese wurden die entsprechenden Bereiche vom Gel ausgeschnitten und durch Gel-Elution (s. 2.1.9.3.) die gewünschte DNA (Plasmid-DNA und Insert-DNA) vom Gel befreit.

Zur Bestimmung der Konzentration der gewonnenen DNA hat man je 10µl eluierte DNA mit 2µl 5x Ladepuffer (s. 2.1.9.2.) auf ein 1,2%iges Agarosegel aufgetragen. Zur Abschätzung der Konzentration wurde der 1kb DNA-Marker aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde unter dem UV-Licht die Intensivität der DNA-Banden mit der entsprechend großen Markerbande verglichen. So konnte die Konzentration abgeschätzt werden, da für jede Markerbande die DNA-Menge vom Hersteller angegeben ist.

2.1.9.7. Ligation von DNA

Für die Ligation von Insert und Plasmid wurden jeweils 2 verschiedene Ansätze hergestellt. Es wurden immer ein 1:2,5- und ein 1:5facher Ansatz gemacht, dies bedeutet, dass entweder 2,5x oder 5x soviel Insert-Menge im Vergleich zur Plasmid-Menge eingesetzt wurden. Für die Ligation wurde das „Rapid DNA Ligation Kit“ verwendet. Als Kontrolle wurde je ein Ansatz nur mit Plasmid-DNA angesetzt, ohne Insert-DNA.

2.1.9.8. Sequenzierung

Nach Klonierung und Kontrolle der richtigen Lage des Inserts im Vektor, durch entsprechenden Restriktionsverdau, wurden die neu klonierten Plasmide zur genaueren Überprüfung sequenziert (Fa. GATC-Biotech (Konstanz)).

2.1.10. Transfektion von Jurkat T-Zellen

Die Jurkat T-Zellen wurden mittels Elektroporation transfiziert. Je Transfektionsansatz wurden 30µl DNA-Mix auf Eis vorbereitet. Die BIORAD Küvetten wurden mindestens 5 min unter die UV-Lampe gestellt um DNA- und RNA-Reste zu zerstören. Anschließend wurden die Küvetten in Ethanol aufbewahrt und zum sterilen Zellkulturarbeitsplatz gebracht. Für einen Transfektionsansatz wurden 1×10^7 Jurkat T-Zellen verwendet. Diese wurden 5 min bei 900 rpm abzentrifugiert und der Überstand sorgfältig abgenommen. Das

Zellpellet wurde in 270µl DMEM Medium resuspendiert und auf die in der Küvette vorgelegte DNA gegeben. Das DNA-Zellgemisch wurde bei 250V und 975µF elektroporiert. Danach wurde das DNA-Zellgemisch sofort auf Eis gestellt und zügig in insgesamt 10ml DMEM Medium ausplattiert. Die Zellen wurden für 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

DMEM Medium (Fa. PAN Biotech GmbH, Aidenbach), ergänzt durch:

10%	FCS
1%	Penicillin / Streptomycin
0,001%	β-Mercaptoethanol

2.1.11. Transfektion von NIH / 3T3-Zellen

Auch die NIH / 3T3-Zellen wurden mittels Elektroporation transfiziert. Der Transfektionsansatz betrug auch hier 30µl DNA. NIH / 3T3-Zellen sind murine adhärenente Fibroblasten; zum Ablösen der Zellen 2,5%iges Trypsin-EDTA verwendet. Der DNA-Ansatz wurde in die mit UV-Licht behandelten BIORAD Küvetten vorgelegt. Die Zellen hat man mit 1x PBS (s. 2.1.1.) gewaschen und die Zellzahl bestimmt. Für einen Transfektionsansatz wurden 1×10^7 Zellen verwendet, welche man mit 900 rpm 5 min abzentrifugierte. Nach sorgfältigem Abnehmen des Überstandes hat man das Pellet in 170µl 1x PBS resuspendiert und auf die DNA in die Küvette gegeben. Dieses Gemisch wurde 5 min bei RT inkubiert und dann bei 450V und 250µF elektroporiert. Nach einer weiteren Inkubation von 5 min auf Eis wurden die Zellen in insgesamt 12,5ml DMEM Medium (s. 2.1.10.) ausplattiert. Die weitere Inkubation der Zellen erfolgte für 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂.

2.1.12. Herstellen von Zellextrakten

Die adhärenenten NIH / 3T3-Zellen wurden mit einem „Cell-Scraper“ sorgfältig von der Zellschale gelöst. Die gelösten NIH-Zellen und die Jurkat T-Zellen wurden von den Schalen ab gespült und in ein Falcon überführt. Dies wurde abzentrifugiert (900 rpm, 5 min) und das Pellet in 1ml 1x PBS (s. 2.1.1.) resuspendiert und in ein

1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Nach 20sekündiger Zentrifugation mittels Tischzentrifuge wurde der Überstand verworfen und das Pellet je nach Extraktionspuffer weiterbehandelt.

Zur Lyse der Zellen wurde das dreifache Pelletvolumen an Lysepuffer verwendet. Durch kräftiges Streichen über ein Metallgitter resuspendierte man die Zellen. Bei der Verwendung von Phospho-Lysepuffer oder RIPA-Lysepuffer wurden die resuspendierten Zellen 30 min auf Eis inkubiert; wurde mit TNT-Lysepuffer gearbeitet, hat man die Zellen nur kurz auf Eis gestellt. Nach der Inkubation wurden die lysierten Zellen bei 4°C, 10 min mit 13000 rpm abzentrifugiert und der proteinhaltige Überstand in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt.

Phospho-Lysepuffer:

50mM	TRIS pH 7,5
150mM	Natriumchlorid
1mM	EDTA
1mM	EGTA
1% (v/v)	Triton X 100
1mM	Natriumortovanadat
10mM	β-Glycerophosphat
5mM	Natriumpyrophosphat
25mM	Natriumflourid
1mM	PMSF
1µg/ml	Leupeptin

RIPA-Lysepuffer:

20mM	TRIS pH 5
1mM	EDTA
100mM	Natriumchlorid
1% (v/v)	Triton X 100
0,5%	Doxycyclin
0,1%	SDS

TNT-Lysepuffer:

20mM	TRIS pH 8
200mM	Natriumchlorid
1% (v/v)	Triton X 100
2µM	Leupeptin
1mM	DTT
20mM	Natriumfluorid
20m	β-Glycerophosphat
1mM	PMSF

2.1.13. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration, nach Herstellung der Zellextrakte, wurden 900µl Bradford-Lösung, 100µl 150mM NaCl und 2µl des Proteinextraktes sorgfältig gemischt und maximal 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Vermessung verwendete man Einmalküvetten. Die Absorptionsmessung wurde bei einer Wellenlänge von 595nm durchgeführt. Die Konzentration wurde mittels einer Eichgeraden, die durch Vermessung von Proteinlösungen bekannter Konzentrationen erstellt wurde, ermittelt.

Bradford-Lösung:

100mg	Coomassie G-250
50ml	Ethanol
100ml	85%ige Phosphorsäure
850ml	Aqua bidest

2.1.14. Western Immunoblot

2.1.14.1. Das Gel

Für den Western Blot wurde zunächst ein meist 12,5%iges Gel gegossen.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Western Blot-Gels

Das Western Blot-Gel setzt sich aus einem Trenngel und einem Sammelgel zusammen. Beide Gelteile bestehen aus Acrylamid, TEMED, APS und vierfach konzentriertem TRIS Puffer, bei welchem sich allerdings der pH-Wert für beide Gele unterscheidet.

Western Blot-Gele:		10%	12,5%
Trenngel:	Ampuwa	4ml	3,5ml
	40% Acrylamid	2ml	2,5ml
	4x TRIS pH 8,8	2ml	2ml
	TEMED	8µl	8µl
	APS	80µl	80µl
Sammelgel:	Ampuwa	2,5ml	2,5ml
	40% Acrylamid	0,45ml	0,45ml
	4x TRIS pH 6,8	1ml	1ml
	TEMED	5µl	5µl
	APS	50µl	50µl

APS wurde jeweils erst kurz vor dem Gießen hinzugefügt, denn damit wurde die Polymerisationsreaktion gestartet. Nach dem Gießen des Trenngeles wurde dieses gleich mit Isopropanol überschichtet, um das Bilden von Luftblasen zu vermeiden und eine glatte Trennlinie zu generieren. Nach der Auspolymerisation des Trenngeles wurde das Isopropanol entfernt. Der Kamm für die Füllungstaschen wurde sofort nach dem Gießen des Sammelgels gesetzt.

Nach der Auspolymerisation zog man vorsichtig und ohne Druck den Kamm und mit einem Spatel hat man die Taschen gerichtet und die Gelreste entfernt. Das Gel wurde dann in die Laufapparatur mit einfach konzentriertem Laufpuffer für Proteingele gesetzt.

10x Laufpuffer für Proteingele:

25mM	TRIS pH 8,4
192mM	Glycerin
0,1% (v/v)	SDS

Die Zellextrakte wurden auf Eis aufgetaut und von jedem Extrakt wurde die gleiche Menge an Protein verwendet. Dies hat man zunächst auf gleiches Volumen mit dem entsprechenden Lysepuffer ausgeglichen und dann die gleiche Menge 2x Laemmli dazugegeben. Zur Denaturierung wurden die Extrakte auf 100°C für 10 min erhitzt. Die aufgekochten Extrakte wurden nun in die Geltaschen gefüllt, daneben auch 7µl des Proteinmarkers zur Abschätzung der Proteingröße und der Laufgeschwindigkeit.

Die Western Blot-Gele wurden bei einer konstanten Spannung von 35mA laufengelassen, bis der blaue Farbstoff des Laemmli aus dem Gel gelaufen war.

2x Laemmli:

0,125M	TRIS pH 6,8
20%	Glycerin
4%	SDS
10%	β-Mercaptoethanol
0,004%	Bromphenolblau

2.1.14.2. Der Blot

Die aufgetrennten Proteinbanden wurden mittels Nassblot (mit Transferpuffer) vom Gel auf Nitrocellulose-Membran geblottet. Hierfür verwendete man auf jeder Seite 3 Lagen Whatman Filterpapier. Der Aufbau des Blottes ist in Abb. 7 zu sehen. Der Blot lief mit einer konstanten Stromstärke von 100V, 90 min lang bei 4°C.

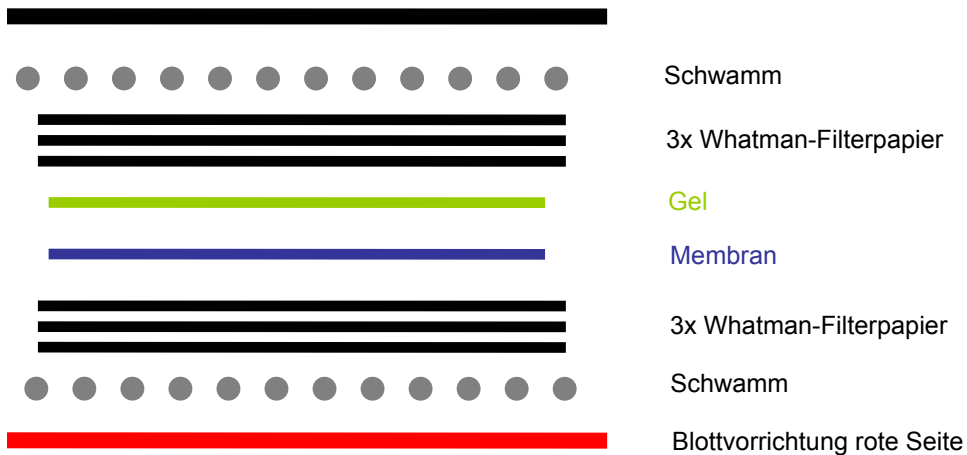


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Blot-Aufbaues für Nassblot

Transferpuffer:

12g	TRIS
57,6g	Glycin
800ml	Methanol

auf 4 Liter mit Aqua bidest auffüllen

2.1.14.3. Blocken und Antikörpermarkierung

Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurde die freien noch nicht Protein gebundenen Stellen der Membran ca. 1 Stunde auf dem Schüttler mit 5% Blockmilch bei Raumtemperatur geblockt. Zum Waschen der Membran wurde TBS-Tween verwendet. Der 1. Antikörper wurde in 5% Blockmilch 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach dem Abwaschen des überschüssigen 1. Antikörpers wurde der 2. Antikörper ebenfalls 1 Stunde bei RT inkubiert. Dazwischen wurde 5 min mit 1x TBS-Tween gewaschen.

Blockmilch:

5% Magermilchpulver
in TBS-Tween

TBS-Tween:

100ml 20x TBS
100ml 20x Tween
auf 2 Liter mit Aqua bidest auffüllen

20x TBS:

193,6g TRIS
640g Natriumchlorid
auf 4 Liter mit Aqua bidest auffüllen

20x Tween:

10ml Tween
auf 1 Liter mit Aqua bidest auffüllen

2.1.14.4. Detektion der gebundenen Antikörper

Nach dem Abwaschen des überschüssigen, nicht gebundenen 2. Antikörpers wurde die Membran mithilfe des „SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate“ entwickelt. Der 2. (sekundäre) Antikörper ist mit einer Horseradish Peroxidase gekoppelt. Gibt man diesem Enzym das entsprechende Substrat, welches sich in der Entwicklerlösung befindet, so ist es in der Lage eine chemische Reaktion in Gang zu setzen, bei der Licht entsteht. Als Ausgangssubstrat für die Peroxidase dient das Substrat (H_2O_2), welches in einer der hinzugefügten Lösungen enthalten ist. Es ist möglich, kleinste Mengen Antigen zu detektieren. Die beiden Substrate des Kits (stabilisierende Peroxidasen Lösung mit H_2O_2 und Luminol-Verstärker Lösung) wurden im Verhältnis 1:1 5 min auf der Blotmembran inkubiert und anschließend wurde die Membran in Folie in die Entwicklungskammer mit einem Film gelegt und nach verschiedenen Zeitpunkten, je nach Intensivität, in der Dunkelkammer entwickelt.

2.2.3. Medien und Lösungen für die Zellkultivierung

RPMI Medium	Fa. PAN Biotech GmbH	Aidenbach
IMDM Medium	Fa. PAN Biotech GmbH	Aidenbach
FCS fetales Kälberserum	Fa. PAN Biotech GmbH	Aidenbach
β -Mercaptoethanol (50 μ M)	Fa. PAN Biotech GmbH	Aidenbach
non essential Aminoacids	Fa. PAN Biotech GmbH	Aidenbach
Penicillin Streptomycin	Fa. PAN Biotech GmbH	Aidenbach
Glutamin	Fa. Invitrogen GmbH	Karlsruhe
Trypsin EDTA	Fa. PAN Biotech GmbH	Aidenbach

2.3. Gebrauchsfertige Kits

MACS B Cell Isolation Kit		
130-090-862	Fa. Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
MACS CD45R (B220) Kit		
130-049-501	Fa. Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
QIAquik Gel Extraktionskit (50)		
287074	Fa. Qiagen GmbH	Hilden
PureLink™ HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit		
K2100-17	Fa. Invitrogen GmbH	Karlsruhe
PureYield™ Plasmid Midiprep System		
A2492	Fa. Promega GmbH	Ludwigshafen/Mannheim
QIAprep Spin Miniprep Kit (50)		
27104	Fa. Qiagen	Hilden
Rapid DNA Ligation Kit		
11 635 379 001	Fa. Roche Diagnostics GmbH	Mannheim

2.4. Biologischen Materialien

2.4.1. FACS Antikörper

Fc Block		Fa. BD Biosciences Pharmingen	Heidelberg
anti-B220	PerCp konjugiert	Fa. BD Biosciences Pharmingen	Heidelberg
anti-CD 3	FITC konjugiert	Fa. BD Biosciences Pharmingen	Heidelberg
anti-CD 5	PE konjugiert	Fa. BD Biosciences Pharmingen	Heidelberg
anti-CD 21	FITC konjugiert	Fa. BD Biosciences Pharmingen	Heidelberg
anti-CD 23	PE konjugiert	Fa. BD Biosciences Pharmingen	Heidelberg
anti-CD 24	Strep APC konjugiert	Fa. BD Biosciences Pharmingen	Heidelberg
anti-CD 43	PE konjugiert	Fa. BD Biosciences Pharmingen	Heidelberg
anti-IgD	FITC konjugiert	Fa. BD Biosciences Pharmingen	Heidelberg
anti-IgM	FITC konjugiert	Fa. BD Biosciences Pharmingen	Heidelberg
anti-IgM	PE konjugiert	Fa. BD Biosciences Pharmingen	Heidelberg
anti-Mac 1	APC konjugiert	Fa. BD Biosciences Pharmingen	Heidelberg

2.4.2. Westernblot Antikörper

Primärantikörper:

anti-Aktin	Fa. Sigma Aldrich	Taufkirchen
anti-BTK	Fa. Cell Signaling Technologie	Frankfurt a. M.

Sekundärantikörper:

Goat-anti <u>mouse</u>	HRP konjugiert	Fa. Pierce	Bonn
Goat-anti <u>rabbit</u>	HRP konjugiert	Fa. Pierce	Bonn

2.4.3. Enzyme

Accu-Taq™ LA DNA Polymerase			
	D8045	Fa. Sigma Aldrich	Taufkirchen
1 kb DNA Ladder			
	108787-026	Fa. Invitrogen GmbH	Karlsruhe

Klenow Polymerase Verdau

M 0210 L Fa. New England Biolabs Frankfurt a. M.

Super Signal® West Dura Extended Duration Substrate

34075 Fa. Pierce Bonn

2.4.4. Restriktionsenzyme

Not 1 # R0125 Fa. New England Biolabs, Frankfurt a. M.

Sal 1 # R 0138 Fa. New England Biolabs, Frankfurt a. M.

EcoRV # R 0195 Fa. New England Biolabs, Frankfurt a. M.

Mlu 1 # R 0198 Fa. New England Biolabs, Frankfurt a. M.

2.4.5. Verwendete Vektoren

pBI5 (Baron et al., 1995)

pcDNA3 Fa. Invitrogen GmbH Karlsruhe

pUHT 61-1 (Urlinger et al., 2000)

2.5. Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen (Ø 12mm) Fa. Menzel Braunschweig

Einfrierröhrchen (1,8ml) Fa. Nunc Wiesbaden

Einmalhandschuhe Fa. DermaClean Brüssel, Belgien

Gel-Blotting-Paper Fa. Whatman Dassel

Gewebekultur-Platten

(6, 24, 96 well) Fa. BD Falcon Heidelberg

Gewebekultur-Schalen (tissue cultur)

(145mm) Fa. Greiner Bio-One Frickenhausen

Gewebekultur-Schalen (non tissue Petri Disc)

(150mm) Fa. BD Falcon Heidelberg

Glaspipetten Fa. Brand Wertheim

FACS-Röhrchen Fa. BD Falcon Heidelberg

Filme Fa. Fujifilm Düsseldorf

Kanülen Fa. Braun Melsungen

Küvetten (Kunststoff)	Fa. Brand	Wertheim
Küvetten (Glas)	Fa. Hellma	Müllheim
Nitrozellulosemembran	Fa. Whatman	Dassel
Pasteurpipetten	Fa. Brand	Wertheim
Pipettenspitzen (10µl, 200µl und 1ml)	Fa. Sarstedt	Nürnbrecht
Reaktionsgefäße (1,5 und 2ml)	Fa. Eppendorf Fa. Sarstedt	Hamburg Nürnbrecht
Spritzen (5, 10, 20ml) (Insulinspritzen mit feiner Nadel)	Fa. Braun Fa. BD Plastikpak	Melsungen Le Pont de Claix, Frankreich
Sterilfilter (0,2µl Maschenweite)	Fa. Whatman	Dassel
Zählkammer nach Neubauer	Fa. Labor Oprik	Friedrichsdorf
Zellschaber	Fa. Sarstedt	Nürnbrecht
Zentrifugenröhrchen (15 und 50ml)	Fa. BD Falcon	Heidelberg

2.6. Geräte

Analysenwaage	Fa. Scal Tec	Göttingen
Brutschrank	Fa. Heraeus Instruments	Hanau
Eismaschine	Fa. Scotsman	Vernon Hills, USA
Elektroblotter	Fa. BioRad	München
FACS Calibur	Fa. BD Biosciences	Heidelberg
Feinwaage	Fa. Sartrius	Göttingen
Filmentwickler	Fa. Agfa	Mortsel, Belgien
Heizblock	Fa. Roth	Karlsruhe
Magnetrührer	Fa. IKA Labortechnik	Staufen
Lichtmikroskop	Fa. Leica	Wetzlar
PCR Maschine	Fa. PeqLab	Erlangen
pH-Meter	Fa. Knick	Berlin
Photometer	Fa. Amersham Biotech	Freiburg
Schüttler	Fa. Heidolph Instruments	Schwalbach
¹³⁷ Cs Strahler	Fa. Nuclear data Inc.	Frankfurt a. M.
Sterilbank (Hood)	Fa. Heraeus Instruments	Hanau

Tiefkühltruhe (-20°C)	Fa. Liebherr	Bulle, Schweiz
Tiefkühltruhe (-80°C)	Fa. Heraeus Instruments	Hanau
Tischzentrifuge (Biofuge pico)	Fa. Heraeus Instruments	Hanau
Vortexer	Fa. Scientific Industries	New York, USA
Wasserbad	Fa. Braun	Melsungen
Zentrifuge Megafuge	Fa. Heraeus Instruments	Hanau

2.7. Statistik

Aus den Daten wurden die Mittelwerte, die Standardabweichung und der T-Test berechnet, hierfür wurde das Programm Excel verwendet.

3. Ergebnisse

Zur Untersuchung der Rolle der BTK und MyD88 für die B-Zell Entwicklung wurden wildtyp (wt), BTK-knock out (BTK-ko) und MyD88-knock out (MyD88-ko) Mäuse untersucht. Darüber hinaus wurden in der Abteilung knock out Mäuse für diese beiden Proteine gekreuzt um BTK-/MyD88-doppel knock out (dko) Mäuse zu erhalten und eine Aussage über die Bedeutung des Verlustes dieser beiden Proteine treffen zu können.

Bei den Kreuzungen ist aufgefallen, dass nur sehr wenige Nachkommen mit der doppel knock out Mutation zur Welt kamen. Aus diesem Grund ist die Fallzahl der Doppel-Mutanten gering. Dies könnte ein Zeichen dafür sein, dass der durch die Mutation entstandene Immundefekt eine gravierende Rolle für das Überleben spielt und viele der doppel knock out Tiere schon frühzeitig intrauterin oder postnatal versterben. Des Weiteren wurde ein frühzeitiges Sterben der dko Tiere in den ersten 4-6 Lebenswochen beobachtet.

3.1. Nachweis von B-Zell Subpopulationen in den verschiedenen Genotypen

Um Aufschluss über die Rolle des BCR- und des TLR-vermittelten Signalweges zusammen auf die B-Zell Entwicklung zu erhalten, wurden die verschiedenen B-Zellsubpopulationen im Knochenmark, in der Milz und der peritonealen Flüssigkeit von wildtyp (wt), BTK-knock out (BTK-ko), MyD88-knock out (MyD88-ko) und BTK/MyD88-doppel knock out (dko) Mäusen, mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) analysiert. Die Anzahl der jeweils verwendeten Tiere lässt sich aus folgender Tabelle ablesen:

Tabelle 5: Übersicht über die Fallzahlen der verwendeten Tiere

Die Fallzahlen der verwendeten Mäuse wurden je nach analysiertem Organ aufgelistet und mit „n“ abgekürzt. Es wurden wildtypische Tiere analysiert, ebenso wie BTK-ko, MyD88-ko und dko Mäusen.

	weiblich	männlich
Knochenmark:		
wt:	n=7	n=5
BTK-ko:	n=7	n=3
MyD88-ko:	n=9	n=3
dko:	n=5	n=1
Milz:		
wt:	n=7	n=5
BTK-ko:	n=7	n=3
MyD88-ko:	n=8	n=3
dko:	n=5	n=1
Peritoneale Flüssigkeit:		
wt:	n=7	n=5
BTK-ko:	n=6	n=3
MyD88-ko:	n=7	n=3
dko:	n=5	n=1

Es wurden mehrere Tiere je Genotyp analysiert. Männliche Tiere sind stärker dem Kampf um das α -Tier ausgesetzt, dieser Stress kann sich auf das Immunsystem

übertragen. Aus diesem Grund wurden für die graphischen Darstellungen nur die weiblichen Mäuse verwendet, um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erhalten. Von der Tendenz lies sich jedoch erkennen, dass sowohl bei den weiblichen als auch bei den männlichen Tieren ähnliche Ergebnisse erzielen ließen. Ein weiterer Grund für die Darstellung von nur einem Geschlecht ist die Tatsache, dass die Gesamtzellzahl in der Milz zwischen weiblichen und männlichen Tieren stark unterschiedlich ist und wir außerdem nur eine männliche dko Maus zur Verfügung hatten.

3.1.1. B-Zellsubpopulationen im Knochenmark

Da die BTK bei vielen Signalwegen der B-Zellen eine wichtige Rolle zu spielen scheint, wollten wir die einzelnen Entwicklungsschritte der B-Zellreihe im Knochenmark genauer untersuchen. Hierfür hat man die gewonnenen Knochenmarkszellen aus den langen Röhrenknochen der unteren Extremität (s. 2.1.2.) mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern, welche B220 (B-Zellmarker) und IgM erkennen, gefärbt.

Zunächst wurde mit dem FACS-Gerät in der FSC/SSC-Darstellung auf lebende Lymphozyten (R1) gegatet (s. 2.1.8.). Anschließend hat man die Zellen dieses Bereiches in einem B220/IgM-Dotplot weiter untersucht (s. Abb. 8). Bei den Zellen, die für IgM negativ, aber positiv für B220 auf ihrer Oberfläche sind (R2), handelt es sich um pro- und prä B-Zellen. Die Zellen, die im Vergleich zu den eben beschriebenen schon etwas mehr IgM präsentieren (R3), nennt man unreife B-Zellen. Das Gate R4 markiert die transitionellen B-Zellen, welche in der Lage sind, das Knochenmark zu verlassen und in der Milz weiter auszureifen. Das Gate R5 beinhaltet die rezirkulierenden B-Zellen, welche IgM und B220 auf der Oberfläche exprimieren. Diese Population war bereits in der Peripherie und zirkuliert über den Blutstrom zurück ins Knochenmark, sie ist über die eben erwähnten Oberflächenmarker hinaus auch positiv für IgD, was in dieser Abbildung jedoch nicht erkennbar ist.

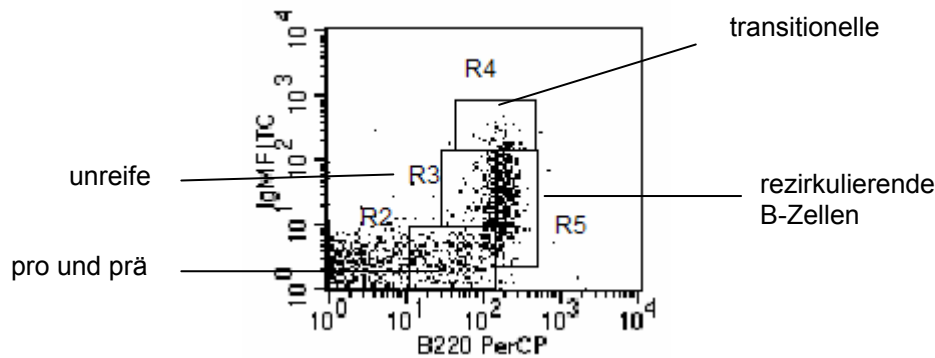


Abbildung 8: FACS-Analyse der B-Zellen des Knochenmark

Die Zellen wurden mit Antikörpern, welche B220 und IgM erkennen gefärbt. B220 war durch die Substanz PerCP und IgM durch FITC angefärbt. Mit den Kästen abgegrenzt wurden die verschiedenen Populationen verdeutlicht.

Zur weiteren Datenverarbeitung wurde die angegebene Prozentzahl der jeweiligen B-Zellentwicklungsstadien, welche sich auf die lebenden Zellen beziehen, für die jeweiligen Mausmutanten gemittelt und dieser Mittelwert mit Standardabweichung als Fehlerbereich in einem Säulendiagramm dargestellt.

Vergleicht man nun die Ergebnisse der verschiedenen Mauslinien, so erkennt man in Abbildung 9, dass die Zahlen der pro- und prä B-Zellen (R2) bei den BTK/MyD88-dko Mäusen besonders groß ist. Noch stärker fällt dieses Übergewicht bei den unreifen B-Zellen im Knochenmark (R3) auf.

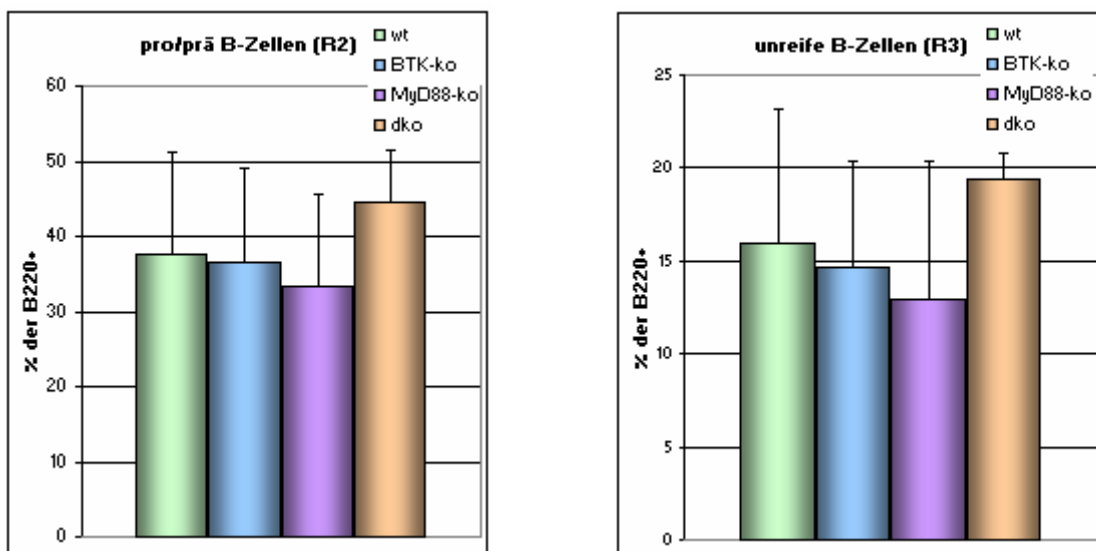


Abbildung 9: Prozentuale Darstellung der pro-, prä- und unreifen B-Zellen im Knochenmark

Die beiden Darstellungen zeigen die prozentuellen Anteile der pro- und prä B-Zellen oder der unreifen B-Zellpopulation im Knochenmark. Grün stellt die Population der wildtypischen (wt), blau die der BTK-ko, lila die der MyD88-ko Mäuse dar und in rot sind die Populationen der Mäuse, welche dko sind abgebildet.

Bei der Population der transitionellen B-Zellen (R4, s. Abb. 8), welche bei den Wildtyp Mäusen zwischen 2-5 % der Knochenmarkszellen ausmacht, fällt die starke Zunahme dieser Population bei den BTK-ko Mäusen auf. Sie erreicht hier einen über doppelt so hohen Anteil, auch wenn der Anteil dieser Zellen bei den BTK/MyD88-dko Mäusen im Vergleich zu dem der Kontrolltieren erhöht ist.

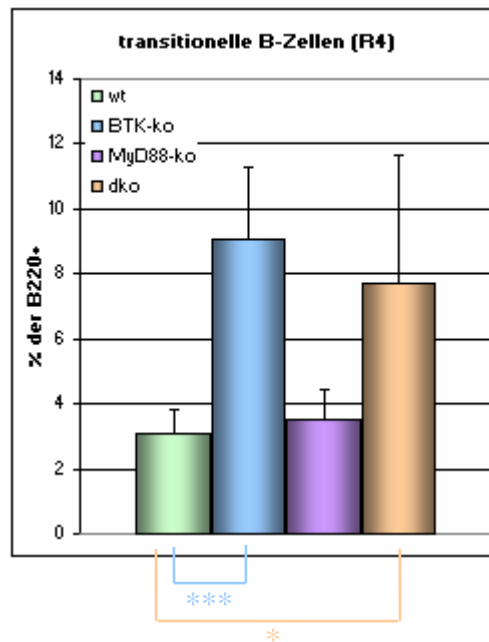


Abbildung 10: Darstellung der transitionellen B-Zellen in Prozent

In grün sind die Ergebnisse der wt Tiere dargestellt und in blau die BTK-ko Mäuse. Lila sind die MyD88-ko Mäuse und in rot sind die Ergebnisse der dko Tiere abgebildet. Mit Sternen wurden die signifikanten Ergebnisse markiert: * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,0005$.

Für die rezirkulierenden Zellen (R5, s. Abb. 8) stellt sich das Bild wie folgt da: Diese Population ist bei den Kontrolltieren am größten und stark reduziert bei den BTK-ko und den BTK/MyD88-dko Mäusen. Hier kann man evtl. auch eine leichte Reduktion bei den MyD88-ko Mäusen erkennen.

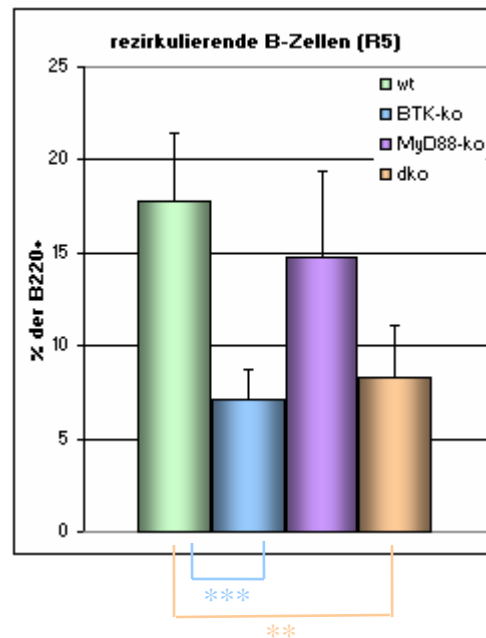


Abbildung 11: Darstellung der rezirkulierenden B-Zellen in Prozent

In grün sind die Ergebnisse der wt Tiere dargestellt und in blau die BTK-ko Mäuse. Lila sind die MyD88-ko Mäuse und in rot sind die Ergebnisse der dko Tiere abgebildet. Mit Sternen wurden die signifikanten Ergebnisse markiert: ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$.

Bei den analysierten B-Zellentwicklungsstadien im Knochenmark war der Anteil der B-Zellen aus MyD88-ko Tieren im Vergleich zum Wildtyp kaum abweichend.

3.1.2. B-Zellsubpopulationen in der Milz

3.1.2.1. Makroskopische Untersuchung der Milz

Bei den Präparationen der Tiere ist aufgefallen, dass die Milzen der BTK-ko und auch der BTK/MyD88-dko Tiere um einiges kleiner erscheinen als die Milzen der wildtypischen Tiere. Für die Veranschaulichung dieses Befundes wurden Fotos angefertigt (s. Abb. 12).

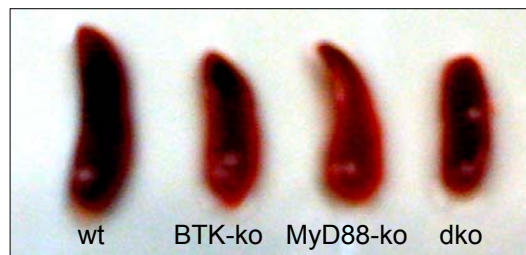


Abbildung 12: Größenvergleich der Milzen

Von links nach rechts auf dem Foto erkennbar, die verschiedenen Milzgrößen von je einer wildtypischen, einer BTK-ko, einer MyD88-ko und einer dko Maus.

3.1.2.2. Gesamtzellzahl der Milz

Nach der Isolation von B-Zellen aus der Milz (s. 2.1.3.) wurden verschiedene Färbungen zur FACS-Analyse durchgeführt.

Da es sich bei der Milz um ein definierbares und abgrenzbares Gewebe handelt, konnte die Gesamtzellzahl aller lebenden Zellen in den Milzen bestimmt (s. 2.1.5.) werden.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Gesamtzellzahl der Milzen (s. Abb. 13) als auch die Zellzahl der B-Zellen in den Milzen (s. Abb. 14) bei den MyD88-ko, BTK-ko und bei den BTK/MyD88-dko Mäusen signifikant bis hoch signifikant reduziert ist.

Die B-Zellzahl der Milzen wurde mit Hilfe der ausgezählten Gesamtzellzahl der Milzen und des gemessenen Anteils der B-Lymphozyten (R2, s. Abb. 15) am gesamten Zellanteil der analysierten Zellen bestimmt.

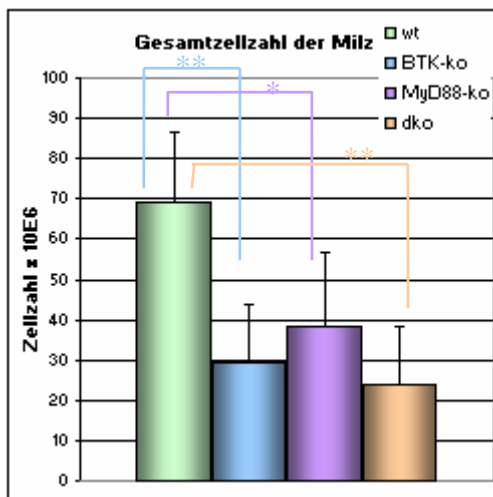
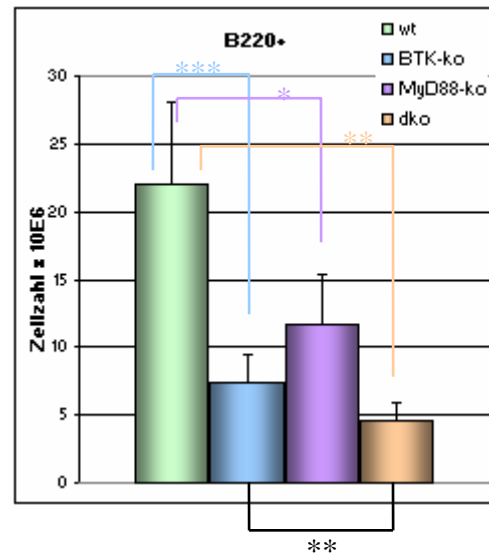


Abbildung 13: Gesamtzellzahl der Milzen

Abbildung 14: B-Zellzahl der Milzen
B220 ist ein Oberflächenmarker für B-Zellen.

In grün sind die Ergebnisse der wt Tiere dargestellt und in blau die BTK-ko Mäuse. Lila sind die MyD88-ko Mäuse und in rot sind die Ergebnisse der dko Tiere abgebildet. Mit Sternen wurden die signifikanten Ergebnisse markiert: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$.

3.1.2.3. Reifestadien der Milz B-Zellen

Für die genauere Analyse der erreichten Reifestadien der B-Zellen wurden die isolierten B-Zellen der Milz (s. 2.1.3.) mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern, welche B220, IgM und IgD erkennen, gefärbt.

Nach Bestimmung der lebenden Lymphozyten (R1) hat man anschließend in einem FSC/B220-Diagramm die B-Lymphozyten (R2) definiert (s. Abb. 15 links). Im IgM/IgD-Diagramm (s. Abb. 15 rechts) ermittelte man die IgM-exprimierenden Zellen (R3), welche als unreifen B-Zellen aus dem Knochenmark neu in der Milz angekommen sind. Aus diesen entwickeln sich die IgM/IgD-positiven Zellen (R4), welche letztendlich in das Stadium der IgD-positiven Zellen (R5) übergehen. Dieses Stadium kann als Stadium der reifen B-Zellen bezeichnen, denn diese Population ist nun soweit ausgereift, dass sie für die Interaktion mit Antigenen vorbereitet ist. Da diese Zellen allerdings noch keinen Antigenkontakt hatten, kann man sie auch reife naive B-Zellen nennen.

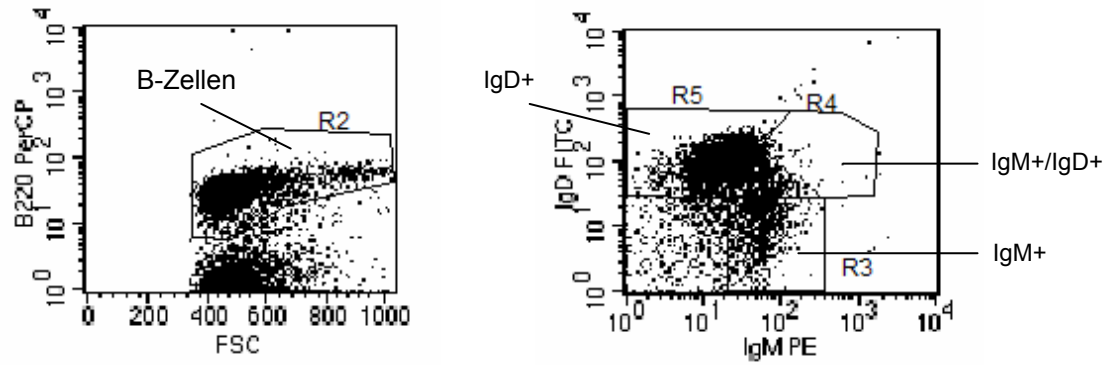


Abbildung 15: FACS-Analyse der Milz – Reifungsstadien

Das linke Bild zeigt die Population der lebenden B-Zellen (R2). Dies ist in einem FSC/B220 PerCP-Dotplot dargestellt. FSC ist der „forward scatter“ welcher die Größe der Zellen analysiert und B220 ist ein Oberflächenmarker auf B-Zellen.

Im rechten Teil der Abbildung sind im IgM PE/IgD FITC-Dotplot die IgM⁺ B-Zellen (R3), die IgM⁺/IgD⁺ (R4) und die IgD⁺ B-Zellen dargestellt. IgM PE steht für die oberflächlich gebundenen Immunglobuline der Klasse M, welche mit dem Marker PE gefärbt wurden, die IgD-Oberflächenantikörper wurden mit FITC gefärbt.

Schaut man sich die prozentuale Verteilung der B-Zellsubpopulationen in der Milz an (s. Abb. 16), so kann man im Vergleich zum Wildtyp erkennen, dass die IgM⁺-Zellpopulation bei den dko Mäusen signifikant erhöht ist ($p=0,028$). Die Population der IgM⁺/IgD⁺-Zellen scheint bei allen Mutanten erhöht zu sein. Hier lässt sich eine Signifikanz nur für die BTK-ko Tiere nachweisen ($p=0,027$), die T-Werte der beiden anderen Mutanten liegen knapp außerhalb des Signifikanzbereiches ($p\sim 0,06$). Im Stadium der IgD⁺-Zellen sind die prozentualen Anteile der BTK-ko und der BTK/MyD88-dko Tiere signifikant erniedrigt ($p=0,023$, $p=0,005$).

Für die MyD88-ko Mäusen lässt sich kein signifikanter Unterschied zu den Kontrolltieren nachweisen. In der IgM⁺/IgD⁺-Zellpopulation erreichen die MyD88-ko Tiere einen T-Wert von $p=0,068$ im Vergleich zum wt.

Prozentual kann kein großer Unterschied zwischen den BTK-ko und BTK/MyD88-dko Tieren in allen drei Subpopulationen festgestellt werden. Dies kann an den relativ großen Fehlerbalken aufgrund der relativ geringen Fallzahl liegen. Es ist jedoch eine Tendenz erkennbar, dass der Anteil der IgM⁺/IgD⁺-Zellen erhöht ist, was für ein stecken bleiben der B-Zellen in diesem Entwicklungsstadium sprechen kann.

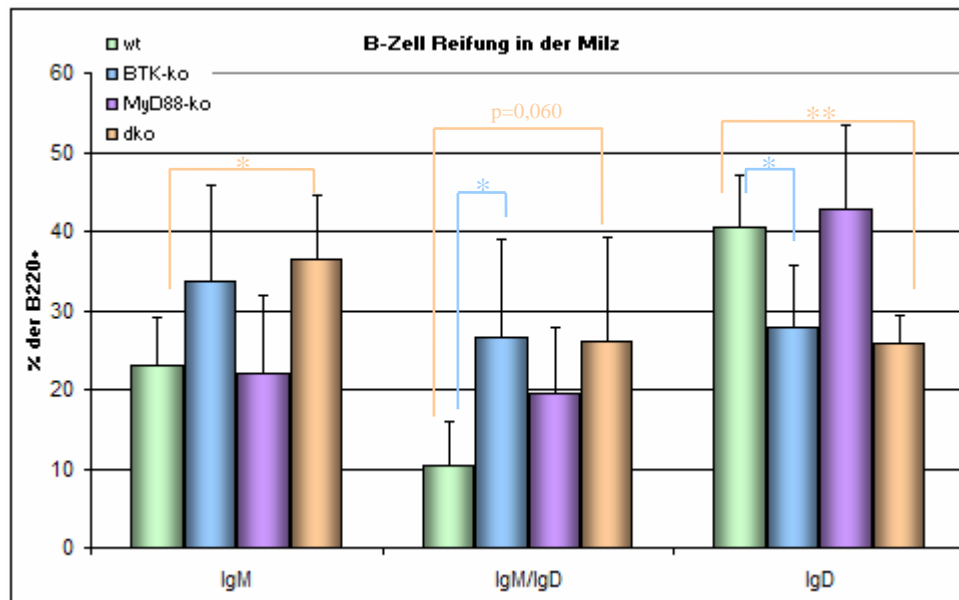


Abbildung 16: Prozentuelle Darstellung der Reifungsstadien in den Milzen

In grün sind die Ergebnisse der wt Tiere dargestellt und in blau die BTK-ko Mäuse. Lila sind die MyD88-ko Mäuse und in rot sind die Ergebnisse der dko Tiere abgebildet. Mit Sternen wurden die signifikanten Ergebnisse markiert: * $p\leq 0,05$, ** $p\leq 0,005$.

Nicht nur die B-Zellzahl sondern auch die Anzahl der Zellen in den verschiedenen Reifungsstadien ist bei den Mutanten reduziert. Auch diese Bestimmung der Zellzahlen wurde mit Hilfe der Gesamtzellzahl und dem ermittelten Anteil der jeweiligen Population am gesamten Anteil errechnet.

In Abbildung 17 kann man bereits im IgM⁺-Stadium eine signifikante Reduktion der Zellzahl bei allen Mutanten erkennen. Der Einbruch in der Ausreifung ist allerdings besonders deutlich beim IgD⁺-Stadium erkennbar. Hier ist neben der signifikanten Reduktion der MyD88-ko Zellen besonders die hochsignifikante Reduktion der Zellen bei den BTK-ko und BTK/MyD88-dko Mäusen auffällig. Vergleicht man im IgD⁺-Stadium die Zellzahl der BTK-ko Zellen mit denen der BTK/MyD88-dko Mäuse, so lässt sich eine weitere Reduktion erkennen, diese ist allerdings nicht signifikant ($p=0,060$), was an der geringen Zellzahl liegen kann.

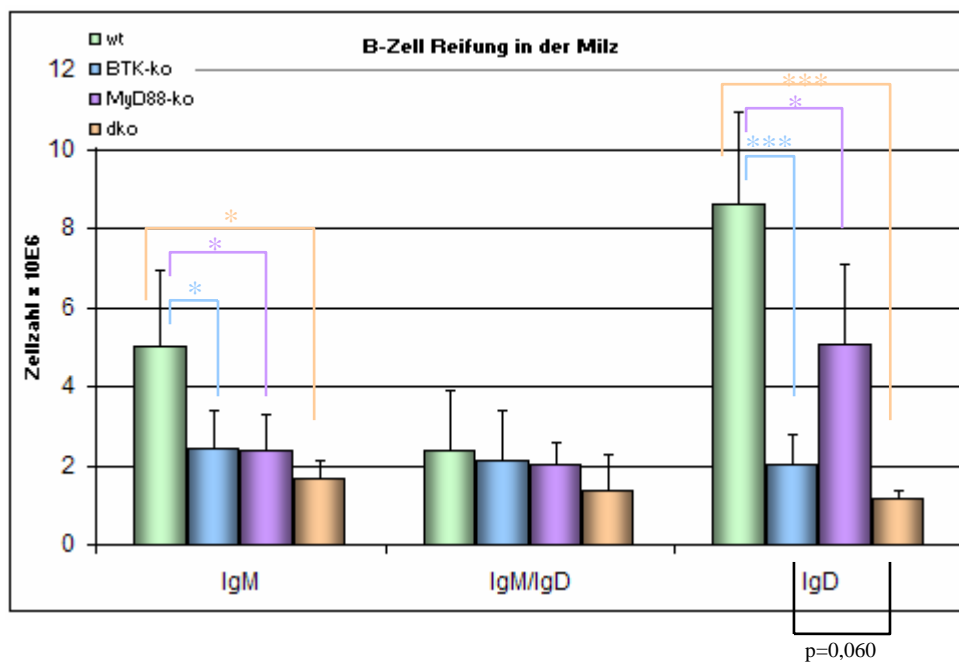


Abbildung 17: Zellzahlen der Reifungsstadien in den Milzen

In grün sind die Ergebnisse der wt Tiere dargestellt und in blau die BTK-ko Mäuse. Lila sind die MyD88-ko Mäuse und in rot sind die Ergebnisse der dko Tiere abgebildet. Mit Sternen wurden die signifikanten Ergebnisse markiert: * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,0005$.

3.1.2.4. Vorkommen von Marginalzonen B-Zellen und folliculären B-Zellen

Mittels einer weiteren Färbung kann man zwischen den „newly formed“ B-Zellen, welche gerade aus dem Knochenmark in die Milz ausgesiedelt sind, also IgM^+ und IgD^- sind, den folliculären B-Zellen (FOB), welche IgM^+/IgD^+ und IgD^+ sind, und den Marginalzonen B-Zellen (MZB), welche $CD21^+/CD23^{low}$ sind, unterscheiden. Die MZB gehören wesentlich zum angeborenen Teil des Immunsystems. Sie exprimieren viele TLR auf ihrer Oberfläche und sind deshalb auch stark auf das Adapterprotein MyD88 für ihre Funktion angewiesen. Wir wollten hier untersuchen, ob MyD88 auch für die Entwicklung von MZB eine Bedeutung hat.

Bei dieser Analyse wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern, welche B220, CD21 und CD23 erkennen, gefärbt.

Nach Markierung der lebenden Zellen (R1) im FSC/SSC-Dotplot wurde in einem FSC/B220-Dotplot auf B-Lymphozyten ($B220^+$) gated (R2, s. Abb. 18 links). Diese wurden dann in einem CD21/CD23-Dotplot weiter analysiert (s. Abb. 18 rechts). Für beide Marker negativ ($CD21^-/CD23^-$) sind die unreifen („newly formed“) B-Zellen (R3), $CD21^+$ und $CD23^+$ sind die folliculären B-Zellen (R4) und die Marginalzonen B-Zellen sind mit Gate R5 definiert ($CD21^+/CD23^{low}$).

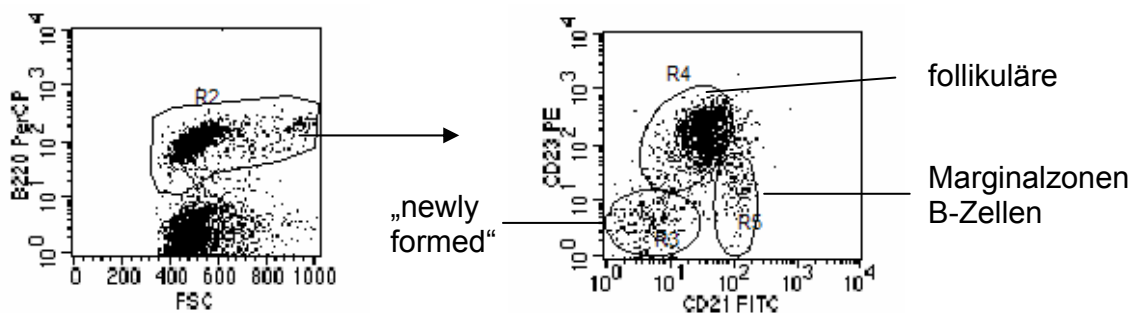


Abbildung 18: FACS-Analyse der Milz - Subpopulationen

Der linke Teil der Abbildung zeigt im FSC/B220 PerCP-Dotplot mit R2 markiert die Population der lebenden B-Zellen. FSC ist der „forward scatter“, welcher die Größe der Zellen analysiert, und B220 ist ein Oberflächenmarker der B-Lymphozyten, welcher mit PerCP gefärbt wurde.

Im rechten Teil sind im CD21 FITC/CD23 PE-Dotplot die „newly formed“ B-Zellen (R3), die FOB (R4) und die MZB (R5) abgebildet. CD21 ist ein Oberflächenmarker der B-Zellen, welcher mit FITC angefärbt wurde. CD23 hingegen ist ein Oberflächenmarker für Wachstum, Aktivierung und Differenzierung, dieser wurde mit PE markiert.

Für die unreifen („newly formed“) B-Zellen der Milz, welche neu aus dem Knochenmark kommen und ihre Ausreifung in der Milz gerade erst begonnen haben, kann man in Abbildung 19 erkennen, dass deren prozentualer Anteil noch relativ gleich erscheint, allerdings ist in Abbildung 20 erkennen, dass herabgerechnet auf die absolute Anzahl deren Zahl bei allen Mutanten stark reduziert ist.

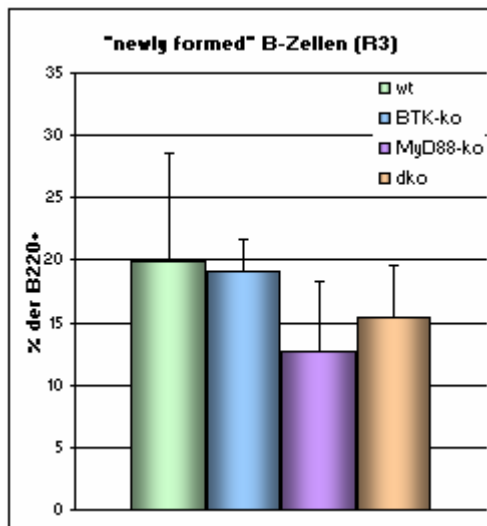


Abbildung 19: prozentuelle Angabe der „newly formed“ B-Zellen relativ zur Gesamtzellzahl der B-Zellen in der Milz

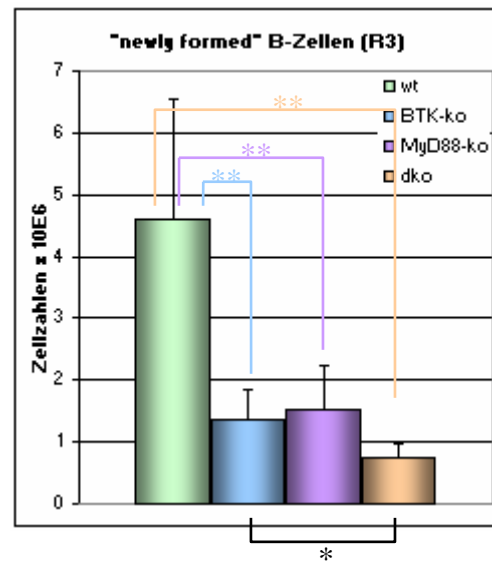


Abbildung 20: Zellzahl der „newly formed“ B-Zellen in der Milz

In grün sind die Ergebnisse der wt Tiere dargestellt und in blau die BTK-ko Mäuse. Lila sind die MyD88-ko Mäuse und in rot sind die Ergebnisse der dko Tiere abgebildet. Mit Sternen wurden die signifikanten Ergebnisse markiert: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$.

Betrachtet man (s. Abb. 21) den prozentualen Anteil der folliculären B-Zellen so erscheint auch hier die Anteile relativ gleich zu sein. Rechnet man diese Anteile auf die Zellzahlen der einzelnen Mutanten zurück (s. Abb. 22), so lässt eine deutliche Reduktion aller Mutanten erkennen. Bei den BTK-ko und den dko Mäusen ist diese Reduktion sogar signifikant. Die Zellzahl der BTK/MyD88-dko Zellen im Vergleich zu den BTK-ko Zellen ist zwar reduziert, dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant ($p=0,27$).

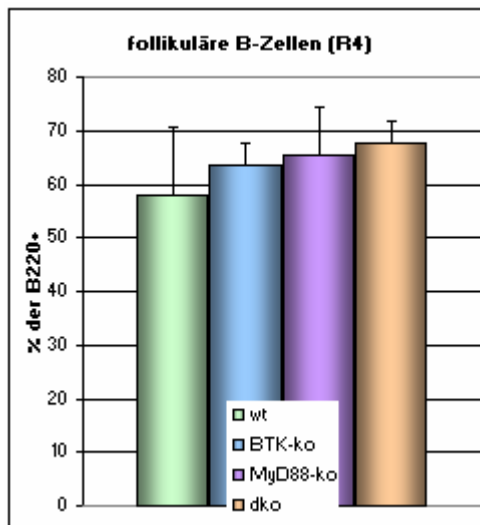


Abbildung 21: Prozentuale Angabe der folliculären B-Zellen relativ zur Gesamtzellzahl der B-Zellen in den Milzen

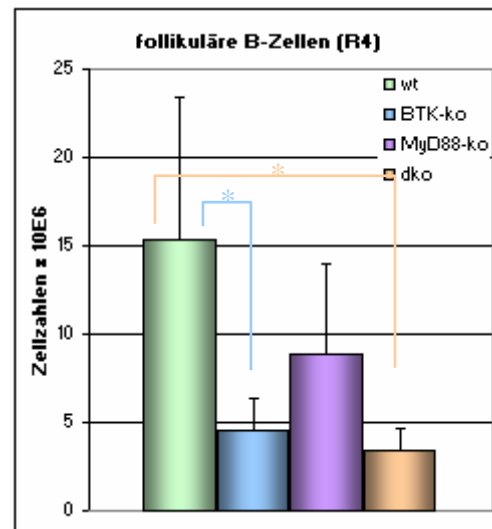


Abbildung 22: Zellzahl der folliculären B-Zellen in der Milz

In grün sind die Ergebnisse der wt Tiere dargestellt und in blau die BTK-ko Mäuse. Lila sind die MyD88-ko Mäuse und in rot sind die Ergebnisse der dko Tiere abgebildet. Mit Sternen wurden die signifikanten Ergebnisse markiert: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$.

Auch bei den Marginalzonen B-Zellen lässt sich bei der prozentualen Darstellung kein gravierender Unterschied feststellen (s. Abb. 23). Auch hier ist eine Reduktion der Mutanten erkennbar, wenn man die Zellzahl berücksichtigt (s. Abb. 24). Für die MyD88-ko Mäuse lässt sich wegen des erhöhten Fehlerbalkens keine signifikante Reduktion im Vergleich zum wt nachweisen ($p=0,16$). Bei den BTK-ko und BTK/MyD88-dko Mäusen ist diese Reduktion allerdings hochsignifikant. Die weitere Reduktion der BTK/MyD88-dko Zellen ist im Vergleich zum der Anzahl der BTK-ko nicht signifikant ($p=0,35$).

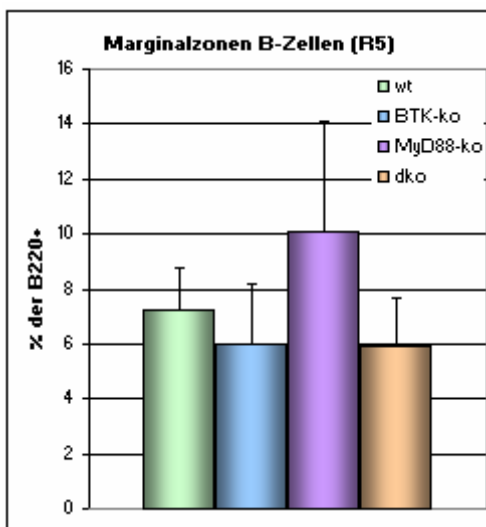


Abbildung 23: Prozentuale Angabe der Marginalzonen B-Zellen relativ zur Gesamtzellzahl der B-Zellen in den Milzen

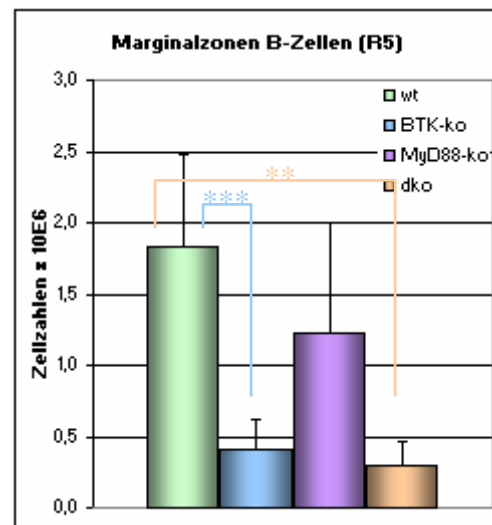


Abbildung 24: Zahl der Marginalzonen B-Zellen in der Milz

In grün sind die Ergebnisse der wt Tiere dargestellt und in blau die BTK-ko Mäuse. Lila sind die MyD88-ko Mäuse und in rot sind die Ergebnisse der dko Tiere abgebildet. Mit Sternen wurden die signifikanten Ergebnisse markiert: ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$.

3.1.3. B-Zellsubpopulationen in der peritonealen Flüssigkeit

Die B1-Population der B-Zellen, die eine selbst erneuerbare Population der Peripherie darstellt, ist vor allem in der Flüssigkeit der peritonealen Höhle vorhanden. Nach Gewinnung dieser Flüssigkeit (s. 2.1.4.) wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern, welche B220, IgM und CD5 erkennen, gefärbt. Wie bei den vorherigen FACS-Analysen, wurden auch diese Proben zunächst im FSC/SSC-Dotplot auf lymphoide Zellen gegatet. Daraufhin ließen sich in einem IgM/CD5-Dotplot (s. Abb. 25) vier Populationen abgrenzen.

CD5⁺/IgM^{low} sind die konventionellen T-Zellen, CD5⁺/IgM⁺ präsentieren sich die B1a-Zellen, IgM⁺/CD5^{low} die B1b-Zellen und die konventionellen B-Zellen (B2-Zellen) präsentieren sich für beide Marker niedrig positiv.

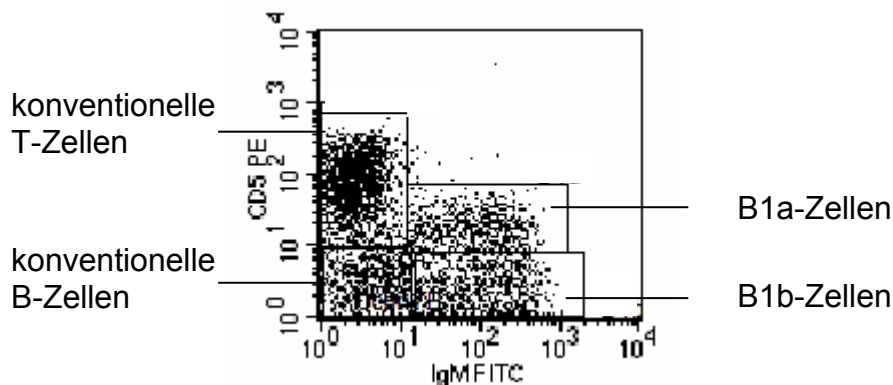


Abbildung 25: FACS-Analyse der peritonealen Flüssigkeit

Im IgM FITC/CD5 PE-Dotplot wurden die konventionellen T-Zellen, die B1a-Zellen, die B1b-Zellen und die konventionellen B-Zellen dargestellt. CD5 ist ein Oberflächenmarker auf T-Zellen, welcher mit PE angefärbt wurde. Die IgM-positiven B-Zellen im Peritoneum wurden mit FITC angefärbt.

Da es sich beim Peritoneum um ein nicht geschlossenes Gewebe handelt, können im Folgenden nur die prozentualen Anteile aufgeführt werden, eine Angabe der absoluten Zellzahlen ist nicht möglich.

Bei der Population der konventionellen B-Zellen im Peritoneum (s. Abb. 26) kann man sehen, dass die Anteil der MyD88-ko Zellen mit dem der Wildtyp Mäuse vergleichbar ist oder sogar als leicht gesteigert angesehen werden kann. Es fällt eine sichtbare Reduktion des Anteiles dieser Population im Peritoneum bei den BTK-ko und BTK/MyD88-dko Mäusen auf. Für die BTK/MyD88-dko Zellen lässt sich sogar eine signifikante Reduktion nachweisen. Vergleicht man diese mit den BTK-ko Zellen so ist keine wesentliche weitere Beeinträchtigung erkennbar.

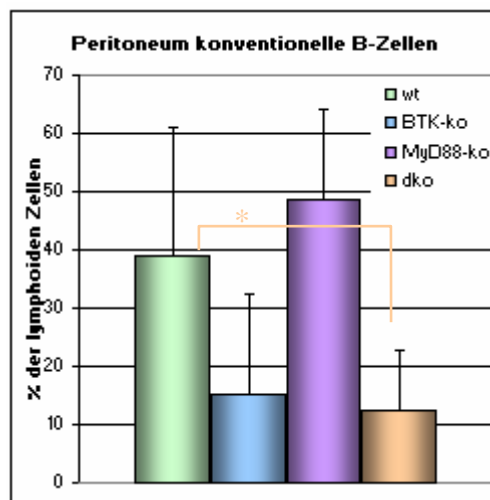


Abbildung 26: Prozentuale Angabe der konventionellen B-Zellen relativ zur Zahl der lymphoiden Zellen im Peritoneum

In grün sind die Ergebnisse der wt Tiere dargestellt und in blau die BTK-ko Mäuse. Lila sind die MyD88-ko Mäuse und in rot sind die Ergebnisse der dko Tiere abgebildet. Mit Sternen wurden die signifikanten Ergebnisse markiert: * $p \leq 0,05$.

Bei den B1a-Zellen ($CD5^+/IgM^+$) im Peritoneum kann man erkennen, dass diese Population bei den MyD88-ko Mäusen zu einem vergleichbaren Anteil wie der Wildtyp vorkommt. Der Zellanteil bei den BTK-ko und der BTK/MyD88-dko Mäusen ist hoch signifikant erniedrigt, es scheint, als ob es diese Population kaum geben würde.

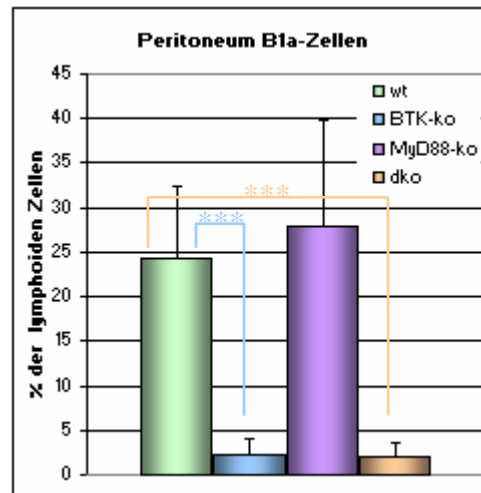


Abbildung 27: Prozentuale Angabe der B1a-Zellpopulation relativ zur Zahl der lymphoiden Zellen im Peritoneum

In grün sind die Ergebnisse der wt Tiere dargestellt und in blau die BTK-ko Mäuse. Lila sind die MyD88-ko Mäuse und in rot sind die Ergebnisse der dko Tiere abgebildet. Mit Sternen wurden die signifikanten Ergebnisse markiert: *** $p \leq 0,0005$.

Bei der B1b-Population (IgM^+) im Peritoneum ist nur eine signifikante Erhöhung des Anteiles bei den BTK/MyD88-dko Mäusen erkennbar. Der weitere Anstieg dieses Anteiles verglichen mit den BTK-ko Mäusen weist einen T-Wert von $p=0,09$ auf.

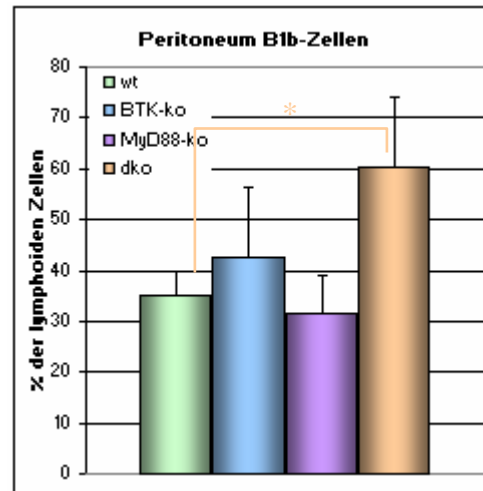


Abbildung 28: Prozentuale Angabe der B1b-Zellpopulation relativ zur Zahl der lymphoiden Zellen im Peritoneum

In grün sind die Ergebnisse der wt Tiere dargestellt und in blau die BTK-ko Mäuse. Lila sind die MyD88-ko Mäuse und in rot sind die Ergebnisse der dko Tiere abgebildet. Mit Sternen wurden die signifikanten Ergebnisse markiert: * $p \leq 0,05$.

3.2. Nachweis der Funktionalität der klonierten BTK Mutanten

3.2.1. Klonierung

Um weitere Aufschlüsse über die Funktion der Bruton'schen Tyrosin Kinase im BCR- bzw. TLR-vermittelten Signalweg zu erhalten, sollten Vektoren kloniert werden, die verschiedene Mutanten der BTK (s. Abb. 29) induzierbar und gewebespezifisch exprimieren.



Abbildung 29: Schematische Darstellung der BTK Mutanten

BTK mit N-terminaler Pleckstrin Domäne (PH) anschließend folgt die Tec-homologe Domäne (TH). Am C-terminalen Ende befinden sich drei Src-homologe Domänen (SH1 – SH3), von denen die SH1-Domäne die eigentliche Kinase Domäne ist.

Die zu klonierenden fünf BTK Varianten lagen in pBlueskript-Vektoren vor und wurden im Rahmen dieser Arbeit in den pBi5-Vektor, der das Tet-System beinhaltet, umklont. Das Tet-System wurde ausgewählt, weil es durch die Expression des Tetrazyklin-(Doxyzyklin)-abhängigen Transaktivators durch einen gewebespezifischen Promotor reguliert wird. Der Transaktivator kann in Abwesenheit von Doxyzyklin die Transkription des Vektors bedingen, wohingegen bei Doxyzyklinbehandlung eine Bindung und damit Aktivierung der Transkription nicht möglich ist.

3.2.2. Nachweis der induzierbaren Expression

Die fünf BTK Varianten wurden zunächst in ein pBi5- und dann in ein pcDNA3-Plasmid kloniert (s. 2.1.9.). Durch die Klonierung in das pBi5-Plasmid wurden die BTK Gene mit der Erkennungssequenz FLAG am 5' Ende versehen, des Weiteren kann durch die Doxyzyklin-supprimierbare Expression die Funktionalität nachgewiesen werden. Darüber hinaus wird bei Aktivierung der Transkription der FLAG-BTK Mutanten im pBi5-Vektor gleichzeitig Luciferase exprimiert (s. Abb. 30), die sich direkt durch einen enzymatischen Test nachweisen lässt. Nach erfolgreicher Expression der FLAG-BTK Mutanten können z.B. Interaktionsnachweise durchgeführt werden.

Aus Abbildung 30 lässt sich erkennen, wie die Mutanten und die Wildtyp-Form zunächst in den pBi5-Vektor inseriert wurden. Mit Hilfe der Restriktionsenzyme Not 1 und Sal 1 wurde ein Fragment des vorhandenen Vektors entfernt und an dessen Stelle die jeweilige BTK Variante inseriert. Das pBi5-Plasmid beinhaltet eine FLAG-Erkennungssequenz. Die entsprechenden BTK Mutanten wurden nach dem 3' Ende der FLAG Domäne „in frame“ mit dieser kloniert.

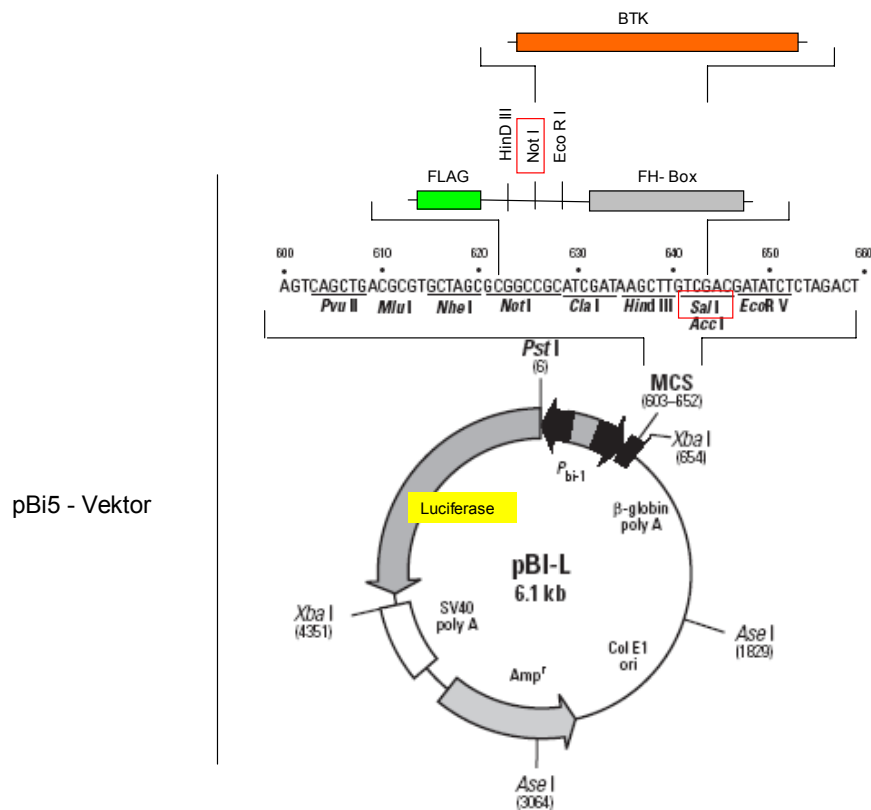


Abbildung 30: pBi5-Vektor mit schematischer Darstellung der Klonierungsstrategie der BTK Varianten

Die BTK-Varianten wurden je in einen pBi5-Vektor über die Restriktionsenzymstellen Not I und Sal I inseriert und dadurch mit der FLAG Sequenz fusioniert. Durch das Vorhandensein eines bi-direktionalen Promotors (P-bi-1) werden die FLAG-BTK Mutanten und das Enzym Luciferase gleichzeitig exprimiert.

Der pBi5-Vektors ist Bestandteil des Tet-Off-System, welches zur gewebsspezifischen und induzierbaren Expression des Gens von Interesse den tTA-Transaktivator benötigt. Bei Zugabe von Doxzyklin wird die Bindung des Transaktivators blockiert, was dazu führt, dass das Gen von Interesse zusammen mit dem Enzym Luciferase nicht transkribiert werden kann, also „off“ ist. Wird jedoch kein Doxzyklin hinzugegeben, so ist das tTA-abhängige Promotor aktiv. Der gewebespezifische Promoter funktioniert bi-direktional (P_{bi-1}, s. Abb. 30) und bewirkt somit gleichzeitig eine Transkription der FLAG-BTK Mutante (Gen von Interesse) und der Luciferase (s. Abb. 30).

Um die Funktionalität der Plasmide testen zu können, wurden diese je zusammen mit dem pUHT 61-1 Plasmid in Jurkat T-Zellen transfiziert (s. 2.1.10.). Durch die Transfektion des pUHT 61-1 Plasmids wird der Tet-Aktivator (tTA2) gewebsunspezifisch (getrieben durch den CMV-Promotor) exprimiert. Im Falle des Funktionierens der hier klonierten pBI5-FLAG-BTK-Mutanten sollten die BTK Mutanten so in Abwesenheit von Doxyzyklin exprimiert werden, Zugabe von Doxyzyklin sollte die Expression unterbinden.

So wurden der pUHT 61-1 Vektor zusammen mit den verschiedenen pBI5-FLAG-BTK-Mutanten in Jurkat T-Zellen (die kein endogenes BTK Protein exprimieren) transfiziert und entweder unbehandelt belassen oder mit Doxyzyklin behandelt. 24 Stunden später wurden die Zellen geerntet, lysiert und im Western Blot auf die Expressin von BTK bzw. FLAG hin untersucht.

Mittels Western Blot-Analyse, unter Verwendung von S194 B-Zellen als Positivkontrolle bzw. nicht-transfizierte Jurkat T-Zellen als Negativkontrolle konnte gezeigt werden, dass die klonierten Vektoren funktionstüchtig sind (s. Abb. 31). Es konnte klar eine Doxyzyklin-abhängige Expression der verschiedenen BTK Mutanten nachgewiesen werden.

Die Nitrozellulose-Membran wurde zunächst mit anti-BTK-Antikörpern und anschließend mit anti- β -Aktin-Antikörpern behandelt. Nach dem „Strippen“ der Membran wurde die FLAG-Erkennungssequenz, welche am N-terminalen Ende jeder BTK Variante vorhanden ist mittels eines anti-FLAG-Antikörpers detektiert.

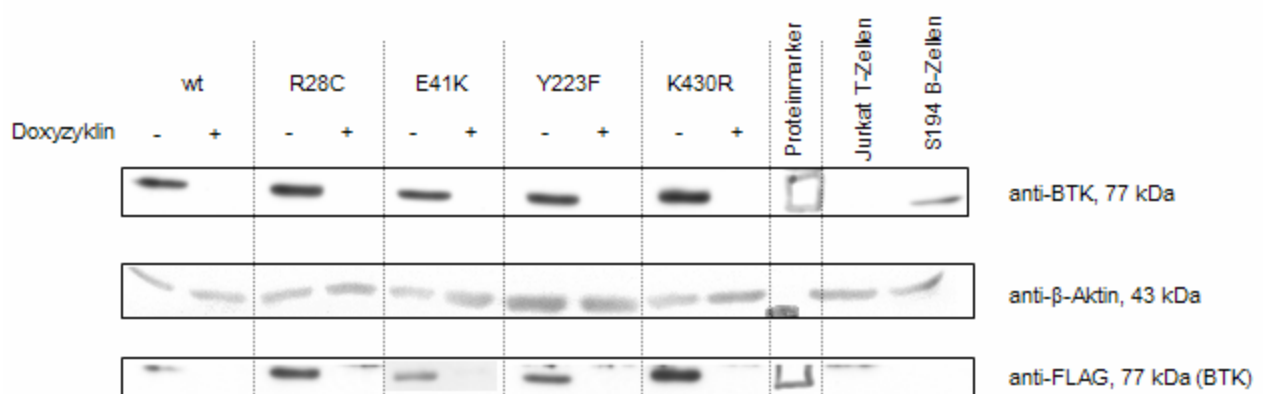


Abbildung 31: Western Blot-Nachweis der pBI5-Vektoren mit integrierten BTK Varianten

Die hier klonierten pBI5-FLAG-BTK-Mutanten wurden zusammen mit dem pUHT 61-1 (dient zur Expression eines gewebsunspezifischen Tet-Transaktivators) in Jurkat T-Zellen co-transfiziert und entweder unbehandelt belassen oder mit Doxyzyklin stimuliert. 24 Stunden später wurden die Zellen geerntet, lysiert und mittels Westernblot auf die BTK- bzw. FLAG-Expression hin analysiert. Als Negativkontrolle wurden nicht-transfizierte Jurkat T-Zellen und als Positivkontrolle S194 B-Zellen verwendet.

Die Nitrozellulose Membran des Western Blottes wurde mit 3 verschiedenen Antikörpern inkubiert, dies waren anti-BTK-, anti- β -Aktin- und anti-FLAG-Antikörper.

Nach der erfolgreichen Klonierung der Varianten in den pBi5-Vektor wurde die kodierende FLAG-BTK-DNA aus dem pBi5 Vektor mittels Restriktionsenzymen herausgeschnitten und je in den pcDNA3-Vektor über die EcoR V-Restriktionsenzymstichstelle umkloniert. In Abbildung 32 lässt sich der Aufbau des verwendeten pcDNA3-Vektors und die durchgeführte Klonierung schematisch erkennen.

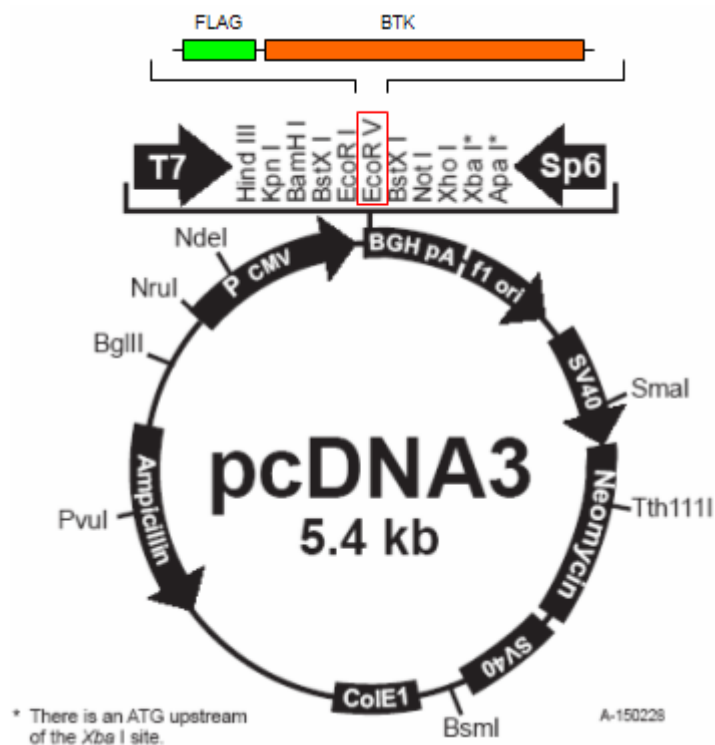


Abbildung 32: pcDNA3-Vektor mit schematischer Darstellung der Klonierung der BTK Varianten

Die FLAG-getaggten BTK Varianten wurden über die Restriktionsenzymstichstelle EcoRV in den pcDNA3-Vektor integriert.

Auch die neu klonierten pcDNA3-BTK-Plasmide wurden auf ihre Funktionalität getestet. Hierfür wurden die Plasmide in NIH 3T3-Zellen transfiziert (s. 2.1.11.), nach 24 Stunden geerntet und Proteinextrakte hergestellt.

Mittels Westernblot wurde deren Funktionalität nachgewiesen (s. Abb. 33). Hier wurde als Positivkontrolle ein Proteinextrakt der S194 B-Zellen und als Negativkontrolle ein Proteinextrakt der NIH 3T3-Zellen aufgetragen, die kein endogenes BTK Protein exprimieren.

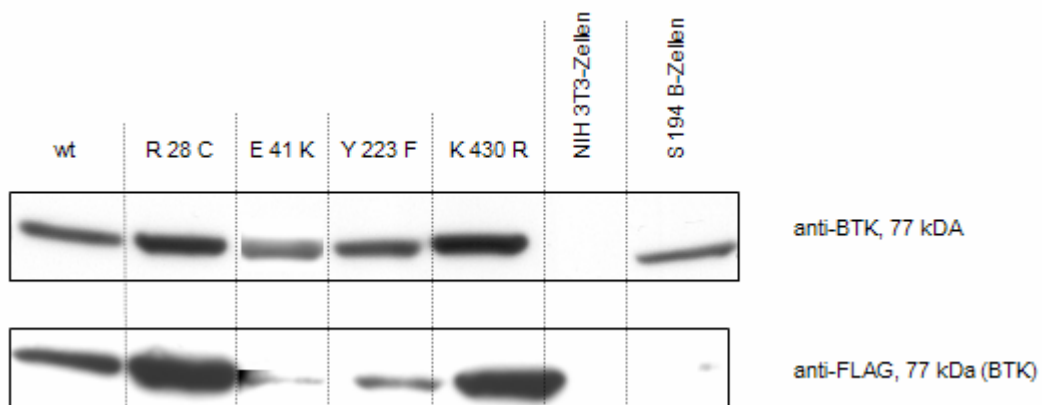


Abbildung 33: Western Blot-Nachweis der pcDNA3-Vektoren mit integrierten BTK Varianten

Nach Transfektion der BTK Varianten in NIH 3T3-Zellen wurden die Proteinextrakte mittels Westernblot untersucht. Als Negativkontrolle wurden nicht transfizierte NIH 3T3-Zellen (Fibroblasten, die keine BTK exprimieren) und als Positivkontrolle S194 B-Zellen verwendet.

Die Nitrozellulose Membran des Western Blottes wurde mit 2 verschiedenen Antikörpern inkubiert, dies waren anti-BTK- und anti-FLAG-Antikörper.

4. Diskussion

4.1. *Der Einfluss von TLR/MyD88 auf die Hämatopoese*

Die Hämatopoese – die Entwicklung der verschiedensten Zellen des Blutes, so auch der B-Zellen – ist ein streng kontrollierter Prozess, der von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst wird. Alle Leukozyten der angeborenen oder erworbenen Immunität stammen von einer sich selbst erneuernden, hämatopoetischen Stammzelle ab. Durch asymmetrische Zellteilung verliert diese ihr pluripotentes Potential und entwickelt sich zum multipotenten Vorläufer, der sich wiederum zum myeloiden oder lymphoiden Vorläufer entwickeln kann. Die lymphoiden Vorläuferzellen bilden u.a. die Ausgangspopulation für die B-Zell Entwicklung. Lange Zeit ging man davon aus, dass diese Entwicklungsprozesse irreversibel sind und durch Zytokine/Wachstumsfaktoren reguliert werden, die von Stromazellen des Knochenmarks sezerniert werden. Diese Zytokin-vermittelte Signaltransduktion führt letztendlich zur Heraufregulation von sogenannten Linien-determinierenden Transkriptionsfaktoren, die ihrerseits für die Zelltyp-spezifische Genexpression verantwortlich sind (Orkin and Zon, 2008). Diese Betrachtungsweise der Hämatopoese wurde mit der Identifizierung der Expression von TLR von hämatopoetischen Vorläuferzellen und deren Bedeutung für die Differenzierung dieser (Nagai et al., 2006) grundlegend verändert. Schon in früheren Studien (Qiu et al., 1998) konnte gezeigt werden, dass der Toll Signalweg eine Rolle bei der Differenzierung und Proliferation von Hämocyten in *Drosophila* spielt. Des Weiteren zeigen verschiedenen Studien (Ueda et al., 2005; Ueda et al., 2004), dass Entzündungsprozesse die Hämatopoese im Knochenmark derart verändern, dass eine große Anzahl lymphoider Vorläufer das Knochenmark verlassen und ins Blut bzw. in sekundäre lymphoide Organe gelangen, in denen sich diese Vorläufer präferentiell zu myeloiden Zellen differenzieren. Nagai et al. (Nagai et al., 2006) konnten zeigen, dass für diese Beobachtung die Funktion von TLR und deren Co-Rezeptoren verantwortlich sind. Außerdem belegt diese Studie, dass die Stimulierung von Vorläuferzellen mit TLR-Liganden das Erfordernis von Zytokinen/Wachstumsfaktoren für die Differenzierung, Proliferation und Überleben dieser komplett aufhebt. Überraschenderweise differenzierten lymphoide Vorläufer

in Anwesenheit von TLR-Liganden, wie z.B. LPS, zu myeloiden Zellen. Diese TLR-vermittelte Stimulierung der Hämatopoese ist abhängig vom Adapterprotein MyD88 (Nagai et al., 2006). Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass der TLR/MyD88 Signalweg eine Schlüsselstellung in der Regulation der Hämatopoese in Anwesenheit von Pathogenen, die eine Entzündung auslösen, einnimmt.

Interessanterweise gibt es bislang in der aktuellen Literatur keine Hinweise auf einen Beitrag dieses Signalwegs für die Leukozyten Entwicklung, speziell der Entwicklung von B-Zellen, in der Antigen-unabhängigen Phase.

Für die frühe Phase der B-Zell Entwicklung sind der IL-7 Rezeptor sowie die Transkriptionsfaktoren EBF, Pax-5, PU.1 und E2A von besonderer Bedeutung (Medina and Singh, 2005). Aber nicht nur Transkriptionsfaktoren, die für die Expression von B-Zell-spezifischen Proteinen verantwortlich sind und damit den Zell-Typ determinieren, beeinflussen die B-Zell Entwicklung, sondern auch verschiedenen signaltransduzierende Moleküle, wie z.B. die zytoplasmatische Tyrosin Kinase BTK (Khan, 2009).

Ausgangspunkt für die vorliegende Studie zur Untersuchung des Einflusses des TLR/MyD88-vermittelten Signalweges auf die Antigen-unabhängige Phase der B-Zell Entwicklung waren vor allem zwei Beobachtungen: 1.) Mäuse, die sowohl defizient für BTK als auch für MyD88 sind (dko), sterben innerhalb der ersten 5 bis 6 Wochen nach der Geburt, also einige Monate früher als Tiere, die nur für jeweils eines dieser Proteine defizient sind. 2.) MyD88-defiziente Tiere haben eine kleinere Milz als wildtypische Tiere. Die Milzen der dko-Tiere sind nochmals kleiner als die der MyD88- oder BTK-einzel-defizienten Tiere, was sich auch in der ermittelten Zellzahl der Milzen widerspiegelt.

4.2. Der BTK- und der MyD88-vermittelte Signalweg wirken synergistisch auf die B-Zell Entwicklung in der Antigen-unabhängigen Phase

Die B-Zell Entwicklung kann grob in folgende Stadien unterteilt werden: die frühe Entwicklung im Knochenmark, die Reifung der transitionellen B-Zellen auf ihrem Weg in die Peripherie, die Entwicklung zu reifen B-Zellen in peripheren lymphoiden Organen und schließlich die Entwicklung von Antikörper-sezernierenden Plasmazellen sowie Gedächtniszellen in der

Antigen-abhängige Phase der B-Zell Entwicklung (Carsetti et al., 2004; Hardy and Hayakawa, 2001). Um den Einfluss des TLR/MyD88-vermittelten Signalwegs auf die Antigen-unabhängige Phase der B-Zell Entwicklung genauer zu untersuchen, wurden folgende primäre und sekundäre lymphoide Organe/Räume genauer untersucht: 1.) das Knochenmark, 2.) die Milz und 3.) die Flüssigkeit des Peritonealraumes.

4.2.1. Die Analyse des Knochenmarks

Im Knochenmark wurden folgende B-Zell Subpopulationen analysiert: die pro/prä B-Zellen, die unreifen B-Zellen und die transitionellen B-Zellen, sowie die aus der Peripherie rezirkulierenden reifen B-Zellen. Bei der Analyse dieser Entwicklungsstadien der B-Zellen zeigt sich, dass ein Fehlen von MyD88 keinen gravierenden Einfluss auf die frühe Bildung der B-Lymphozyten im Knochenmark hat. Man kann feststellen, dass kein signifikanter Unterschied in den untersuchten B-Zell Subpopulationen für die MyD88-defizienten Mäuse im Vergleich zum Wildtyp besteht. Es wurden sieben weibliche wildtypische und sechs weibliche MyD88-defiziente Tiere untersucht. Da die Variabilität zwischen den untersuchten Tieren in einer Gruppe recht hoch ist (ausgedrückt in den relativ hohen Standardabweichungen) sollten diese Untersuchungen erneut mit einer höheren Zahl an Tieren wiederholt werden um evtl. Unterschiede zwischen den MyD88-ko und den wildtypischen Tieren wahrzunehmen. Weiterhin wäre eine genaue Bestimmung der Zellzahl pro Femur sinnvoll, um die prozentualen Angaben, die die FACS-Analyse liefert, auf die genaue Zellzahl pro B-Zell Subpopulation umzurechnen. Dies ist deshalb so wichtig, weil in unserem Labor festgestellt wurde, dass z.B. die BTK-Defizienz zu einer signifikanten Erhöhung der Zellzahl pro Femur führt (C. Brunner, persönliche Mitteilung). Für die MyD88-defizienten Tiere bzw. dko Tiere wurden diese Analysen bislang nicht durchgeführt.

Die BTK-ko Mäuse zeigen im Falle der pro/prä B-Zellen und der unreifen B-Zellen ebenfalls einen gleichen prozentualen Anteil im Vergleich zu wildtypischen oder MyD88-ko Mäuse. Im Falle der BTK-defizienten Tiere lässt sich jedoch ab dem Stadium der transitionellen B-Zellen ein Unterschied erkennen. Der prozentuale Anteil der transitionellen B-Zellen, also der B-Zellen, welche im Knochenmark soweit ausgereift sind, dass sie in der Lage sind es verlassen zu können und sich

in den sekundären lymphatischen Organen weiter zu entwickeln, ist stark erhöht im Knochenmark von BTK-defizienten Tieren. Dies kann daran liegen, dass die Zellen nicht oder nur sehr schwer in der Lage sind, das Knochenmark wirklich zu verlassen und sich somit ein „Aufstau“ im Knochenmark bildet. Auch für die rezirkulierenden Zellen, welche aus der Peripherie zurück ins Knochenmark kommen, lässt sich erkennen, dass der Anteil bei den BTK-ko Mäusen erniedrigt ist, was sich durch das verzögerte und evtl. gehemmte Verlassen des Knochenmark durch diese Zellen erklären lassen würde. Dieser Entwicklungsstopp wurde bereits durch verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben (Hendriks et al., 1996; Kerner et al., 1995; Khan et al., 1995).

Betrachtet man nun die dko-Mäuse, welche für BTK und auch für MyD88 einen Defekt tragen, so stellt man fest, dass bei diesen Mäusen der Anteil der pro/prä- und auch der Anteil der unreifen B-Zellen im Vergleich zu wildtypischen, aber auch zu BTK- und MyD88-defizienten Tieren, erhöht ist. Dies kann ein Zeichen dafür sein, dass diese Zellen nicht richtig in der Lage sind, sich weiter zu entwickeln und sich aus diesem Grund schon in diesen frühen Stadien anstauen. Für das Stadium der transitionellen B-Zellen lässt sich eine Reduktion im Falle der dko Tiere im Vergleich zu Tieren, welche die BTK Mutation allein tragen, feststellen, die allerdings nicht sehr ausgeprägt und signifikant ist. Dies könnte jedoch ein weiterer Hinweis darauf sein, dass im Falle der Defizienz von BTK zusammen mit MyD88 der Stopp der B-Zell Entwicklung schon früher einsetzt, als bei der BTK-Defizienz allein. Dies hätte zur Folge, dass schon die Bildung von unreifen B-Zellen erschwert war und deshalb weniger Zellen das Stadium der transitionellen B-Zellen erreichen. Dies kann erklären, warum der Anteil der transitionellen Zellen im Falle der dko-Tiere geringer ist als bei den BTK-ko Mäusen. Aber auch bei dieser Auswertung der Ergebnisse ist die große Variabilität zwischen den Tieren einer Gruppe zu beachten, die letztendlich zwar Unterschiede erkennen lässt, diese sind jedoch nicht signifikant. Auch hier sollten eine größere Anzahl von Tieren untersucht werden bzw. die prozentualen Angaben auf die korrekte Zellzahl pro Femur ermittelt werden. Tendenziell lässt sich jedoch erkennen, dass das zusätzliche Fehlen von MyD88 in BTK-defizienten Mäusen die B-Zell Entwicklung im Knochenmark stärker einschränkt, als es die BTK Mutation allein verursacht.

4.2.2. Die Analyse der Milz

Wie bereits erwähnt, veranlasste die schon makroskopisch auffallend kleineren Milzen der MyD88-defiziente Tiere verglichen mit wildtypischen, den Beitrag von MyD88 bezüglich der B-Zell Entwicklung genauer zu untersuchen. Die weiteren Analysen zeigten, dass die Gesamtzellzahl der Milzen von MyD88-defizienten Tieren als auch die Anzahl der B220⁺ B-Zellen signifikant gegenüber wildtypischen Milzen reduziert sind. Besonders interessant ist der Befund, dass die Anzahl der B220⁺ B-Zellen der Milzen von dko Tieren eine weitere signifikante Reduktion verglichen mit Milzen von BTK-defizienten Tieren zeigen. Dies bedeutet, dass die Defizienz von MyD88 allein schon die B-Zell Entwicklung negativ beeinflusst und dass wahrscheinlich beide Signalwege – der BTK- und auch der MyD88-vermittelte Signalweg – für die Antigen-unabhängige Phase der B-Zell Entwicklung von Bedeutung sind. Dies wird bei detaillierten Analysen der B-Zell Subpopulationen der Milz besonders deutlich, die zeigen, dass die Milzen der MyD88-defizienten Tiere reduzierte B-Zellzahlen aller analysierten Subpopulationen verglichen mit Milzen wildtypischer Tiere aufweisen. Des Weiteren waren alle analysierten B-Zell Subpopulationen der Milzen von dko Tieren stärker reduziert, als die der Milzen von BTK- bzw. Myd88-defizienten Tieren. Hierbei konnten signifikante Unterschiede für die unreifen so genannten „newly formed“ B-Zellen als auch für die ausgereiften IgD⁺ B-Zellen detektiert werden.

Eine Reduktion von B220⁺ B-Zellen der Milzen MyD88-defizienter Tiere wurde bereits in einer anderen Studie beobachtet aber nicht weiter bewertet, da die Unterschiede zu Milzen wildtypischer Tiere nicht groß bzw. signifikant waren. Bei dieser Analyse betrug allerdings die Standardabweichung mehr als 50 % vom gemessenen Mittelwert (Alugupalli et al., 2007). Ursachen für diese Variabilität könnte zum einen darin begründet sein, dass in dieser Studie nur drei MyD88-defiziente Tiere untersucht wurden und sowohl die Analysen von weiblichen als auch männlichen Tiere in diese Berechnungen einfließen. Im Gegensatz dazu wurde in der hier vorliegenden Arbeit darauf geachtet, dass möglichst Geschwister und ausschließlich weiblichen Geschlechts in einem Alter von 8 bis 12 Wochen untersucht wurden, da Geschlecht und Alter die Größe/Zellzahl der sekundären lymphoiden Organe beeinflusst.

4.2.3. Die Analyse der peritonealen Flüssigkeit

Bislang wurden Subpopulationen der so genannten klassischen, konventionellen B-Zellen – B2 Zellen – untersucht. In der peritonealen Flüssigkeit kann man neben den B2-Zellen auch B1-Zellen identifizieren. Sie unterscheiden sich von B2-Zellen durch eine spezielle Ausstattung an Oberflächenmarkern und durch eine unterschiedliche Regulation von Signalwegen (Contreras et al., 2007). B1-Zellen sezernieren konstitutiv große Mengen an primären Immunglobulinen der Klasse M und spielen eine wichtige Rolle in der ersten (T-Zell-unabhängigen) Phase der Auseinandersetzung des Immunsystems mit infektiösen Pathogenen. B1-Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie stärker TLR exprimieren als B2-Zellen, vor allem TLR 4, TLR 7 und TLR 9 (Gururajan et al., 2007). Außerdem sind B1-Zellen eher geneigt, sich nach TLR-Stimulierung in Plasmazellen zu differenzieren als B2-Zellen (Genestier et al., 2007). Die Analyse der Entwicklung von B1-Zellen in MyD88-defizienten bzw. dko Tieren war auch deshalb von großem Interesse, da gezeigt worden ist, dass das Fehlen von BTK zu einer drastischen Reduktion der B1-Zellen führt (Hendriks et al., 1996; Khan et al., 1995). Unsere Analysen ergaben jedoch, dass die MyD88-Defizienz die B1-Zell Population zumindest in ihrer Größe nicht wesentlich beeinflusst.

4.3. Schlussfolgerungen und Ausblick

Zusammenfassend kann aufgrund der hier diskutierten Ergebnisse festgestellt werden, dass der MyD88-abhängige Signalweg eine wichtige Funktion in der Antigen-unabhängigen Phase der B-Zell Hämatopoese, speziell von B2-Zellen, einnimmt. MyD88 wurde bislang als ein wichtiges Adaptermolekül im TLR-vermittelten Signalweg beschrieben (Kawai and Akira, 2006; Kawai and Akira, 2007). TLR wiederum gehören zu den Pathogen erkennenden Rezeptoren, die so genannte PAMPs – Pathogen-assoziierte molekulare Muster – erkennen, die nicht von Zellen des Wirtsorganismus exprimiert werden (Kawai and Akira, 2006). Dies lässt zwei Schlüsse zu: entweder ist MyD88 – außer für die Signalweiterleitung von TLR – für weitere Signalübertragungskaskaden essentiell, oder endogenen Liganden – neben den PAMPs – können ebenfalls TLR aktivieren. Die zweite Vermutung wurde bereits von Rolls et al. (Rolls et al., 2007)

aufgegriffen, die zeigten, dass der TLR/MyD88-vermittelte Signalweg für die Differenzierung und Proliferation adulter neuronaler Stammzellen essentiell ist. Obgleich die Identität solcher endogener Liganden nicht bekannt ist wird vermutet, dass es sich dabei um Komponenten der extrazellulären Matrix oder Degradationsprodukte dieser handelt (Johnson et al., 2003).

BTK spielt nicht nur im B-Zell Rezeptor-vermittelten Signalweg eine Rolle. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass BTK sowohl mit der signaltransduzierenden Domäne von TLR als auch mit MyD88 interagiert (Jefferies et al., 2003). Mittlerweile wurden eine Reihe von Daten erhoben, die belegen, dass BTK eine wichtige Rolle für die TLR/MyD88-vermittelte Signaltransduktion von B-Zellen spielt: Liegt eine BTK-Defizienz in B-Zellen vor, führt dies nach TLR 9-Stimulierung zu einer Erhöhung der Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokine wie IL12 und zu einer erniedrigten Expression von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL10. Außerdem wurden erhöhte Level an sezernierten IgG2b und IgG3 Antikörpern detektiert. Untersuchungen auf molekularem Niveau zeigten eine defekten Aktivierung von NF- κ B in TLR 9-aktivierten BTK-defizienten B-Zellen (Lee et al., 2008). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass eine intakte BTK in CD38⁺ B-Zellen für den durch den TLR 7- und den IL4 Rezeptor-induzierten Immunglobulin-Klassenwechsel und die Sekretion von IgG1 essentiell ist (Tsukamoto et al., 2009).

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass das zusätzliche Fehlen von MyD88 in BTK-defizienten Tieren den BTK-verursachten B-Zell Phänotyp weiter verstärkt. Dies lässt den Schluss zu, dass in der Antigen-unabhängigen Phase der B-Zell Entwicklung die Rolle von BTK im TLR/MyD88-vermittelten Signalweg in B-Zellen vernachlässigbar ist, jedoch der MyD88-abhängige Signalweg neben dem BTK-vermittelten für die Antigen-unabhängige B-Zell Entwicklung von Bedeutung ist.

Die hier dargelegten Daten zeigen nicht, ob die Rolle von MyD88 für die Antigen-unabhängigen Phase der B-Zell Entwicklung B-Zell intrinsisch ist. Es kann nicht generell ausgeschlossen werden, dass die B-Zell Entwicklung nicht von weiteren Zellen beeinflusst wird, die TLR bzw. MyD88 exprimieren. Aufschluss darüber könnten z.B. Transferexperimente geben. Des Weiteren ist es möglich,

hämatopoetische Vorläuferzellen von wildtypischen, BTK- oder MyD88-defizienten oder dko Tieren zu isolieren und diese in vitro zu B-Zellen zu differenzieren. Weiterführende Experimente sollten darauf gerichtet sein zu untersuchen, ob die durch MyD88 beeinträchtigte Entwicklung von BTK-defizienten B-Zellen auch deren Funktion zusätzlich supprimiert.

5. Zusammenfassung

Die Bruton'sche Tyrosin Kinase (BTK) ist ein signaltransduzierendes zytoplasmatisches Protein, das für die Entwicklung von B-Zellen in der Maus und auch beim Menschen außerordentlich wichtig ist. Mutationen im BTK Locus führen beim Menschen zur X chromosomal gekoppelten Agammaglobulinämie (XLA), im deutschsprachigen Raum auch Morbus Bruton genannt, und in der Maus zur X chromosomal gekoppelten Immundefizienz (XID). Diese angeborenen Immunschwächen sind durch einen schweren Entwicklungsstopp der B-Zellen auf dem Stadium der prä B-Zell Entwicklung im Knochenmark gekennzeichnet, was zu einer starken Reduktion von peripheren B-Zellen führt, die zudem in ihrer Funktion eingeschränkt sind, was sich wiederum in einer reduzierten Produktion von primären und sekundären Immunglobulinen widerspiegelt. Dieser Entwicklungsdefekt wird vor allem auf die defekte Signalweiterleitung vom B-Zell Rezeptor (BCR) ins Zellinnere in BTK-defizienten B-Zellen zurückgeführt. BTK ist jedoch nicht nur im „BCR-signaling“ involviert. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass BTK mit dem Adapterprotein MyD88 („myeloid differentiation primary response gene 88,“) interagiert, das eine wesentliche Komponente im Toll-like Rezeptor (TLR) Signalweg darstellt. TLR gehören zur Gruppe der Pathogen-erkennenden Rezeptoren und sind vor allem auf Zellen der angeborenen Immunität exprimiert. Nach Aktivierung von TLR durch pathogene Muster wird in der Zelle eine Signaltransduktionskaskade in Gang gesetzt, die letztendlich zur Expression von proinflammatorischen Faktoren führt. TLR sind auch auf hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert, wodurch diese in der Lage sind, auf eine Infektion z.B. durch verstärkte Myelopoese zu reagieren. Es konnte gezeigt werden, dass diese Prozesse im hohen Masse durch MyD88 vermittelt sind. Andere Studien zeigen, dass MyD88 nicht nur in der Phase der Abwehr eines Pathogens essentiell ist, sondern auch während der Differenzierung von z.B. neuronalen Zellen unter physiologischen Bedingungen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb zu untersuchen, ob eine MyD88-Defizienz eventuell – ähnlich wie in neuronalen Zellen – die Antigen-unabhängige Phase der B-Zell Entwicklung beeinflusst und ob eine Defizienz für BTK und MyD88 den BTK-vermittelten B-Zell Defekt verstärkt.

Um diese Fragestellung zu bearbeiten, wurde das Knochenmark, die Milz und sowie peritoneale Flüssigkeit von wildtypischen, BTK-, MyD88- und BTK/MyD88-doppel knock out Mäusen mittels Durchflusszytometrie auf die B-Zell Entwicklung hin untersucht und miteinander verglichen.

Wir konnten zeigen, dass MyD88 selbst schon einen moderaten Einfluss auf die frühe B-Zell Entwicklung im Knochenmark hat, der während der B-Zell Reifung in peripheren sekundären lymphatischen Organen, wie der Milz, signifikant wird. Die B-Zellzahl in der Milz MyD88-defizienter Mäuse ist etwas um ein Drittel reduziert und diese B-Zellen weisen einen unreifen Phänotyp auf. Auch wenn der Phänotyp MyD88-defizienter B-Zellen im Vergleich zu BTK-defizienten B-Zellen milder ist, so ist dieser in BTK/MyD88-doppelt knock out Mäusen weiter verstärkt.

Diese Befunde deuten darauf hin, dass sowohl der BTK- als auch der MyD88-vermittelte Signalweg von entscheidender Bedeutung für die Antigen-unabhängige Phase der B-Zell Entwicklung sind.

Diese Arbeit beantwortet nicht die Frage, ob MyD88 eine intrinsische Funktion für die B-Zell Entwicklung innehat, oder ob noch weitere Zellen die B-Zell Entwicklung beeinflussen, die dies TLR- oder MyD88-abhängig tun. Weiterführende Studien könnten zeigen, ob die durch MyD88 beeinträchtigte Entwicklung von BTK-defizienten B-Zellen auch deren Funktion weiter supprimiert.

Als Grundlage für weiterführende Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit fünf BTK Mutanten in Tet-Vektoren kloniert. Hierbei handelte es sich um die wildtypische, eine konstitutiv aktive und verschiedene dominant-negative Mutanten der BTK, die gewebsspezifisch und durch Tetrazyklin/Doxyzyklin induzierbar exprimiert werden können.

6. Literaturverzeichnis

1. Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K. and Akira, S. (1998) Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity*, **9**, 143-150.
2. Akira, S. (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Adv Immunol*, **78**, 1-56.
3. Akira, S., Takeda, K. and Kaisho, T. (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*, **2**, 675-680.
4. Alugupalli, K.R., Akira, S., Lien, E. and Leong, J.M. (2007) MyD88- and Bruton's tyrosine kinase-mediated signals are essential for T cell-independent pathogen-specific IgM responses. *J Immunol*, **178**, 3740-3749.
5. Baron, U., Freundlieb, S., Gossen, M. and Bujard, H. (1995) Co-regulation of two gene activities by tetracycline via a bidirectional promoter. *Nucleic Acids Res*, **23**, 3605-3606.
6. Bin, L.H., Xu, L.G. and Shu, H.B. (2003) TIRP, a novel Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adapter protein involved in TIR signaling. *J Biol Chem*, **278**, 24526-24532.
7. Brunner, C., Avots, A., Kreth, H.W., Serfling, E. and Schuster, V. (2002) Bruton's tyrosine kinase is activated upon CD40 stimulation in human B lymphocytes. *Immunobiology*, **206**, 432-440.
8. Brunner, C., Muller, B. and Wirth, T. (2005) Bruton's Tyrosine Kinase is involved in innate and adaptive immunity. *Histol Histopathol*, **20**, 945-955.
9. Brunner, C. and Wirth, T. (2006) BOB.1/OBF.1 - A Critical Regulator of B cell Function. *Current Immunology Reviews*, **2**, 3-12.
10. Carsetti, R., Rosado, M.M. and Wardmann, H. (2004) Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev*, **197**, 179-191.
11. Carty, M., Goodbody, R., Schroder, M., Stack, J., Moynagh, P.N. and Bowie, A.G. (2006) The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol*, **7**, 1074-1081.
12. Contreras, C.M., Halcomb, K.E., Randle, L., Hinman, R.M., Gutierrez, T., Clarke, S.H. and Satterthwaite, A.B. (2007) Btk regulates multiple stages in the development and survival of B-1 cells. *Mol Immunol*, **44**, 2719-2728.
13. Doyle, S.L., Jefferies, C.A., Feighery, C. and O'Neill, L.A. (2007) Signaling by Toll-like receptors 8 and 9 requires Bruton's tyrosine kinase. *J Biol Chem*, **282**, 36953-36960.
14. Doyle, S.L., Jefferies, C.A. and O'Neill, L.A. (2005) Bruton's tyrosine kinase is involved in p65-mediated transactivation and phosphorylation of p65 on serine 536 during NFkappaB activation by lipopolysaccharide. *J Biol Chem*, **280**, 23496-23501.
15. Faure, E., Thomas, L., Xu, H., Medvedev, A., Equils, O. and Arditi, M. (2001) Bacterial lipopolysaccharide and IFN-gamma induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF-kappa B activation. *J Immunol*, **166**, 2018-2024.
16. Fitzgerald, K.A., Palsson-McDermott, E.M., Bowie, A.G., Jefferies, C.A., Mansell, A.S., Brady, G., Brint, E., Dunne, A., Gray, P., Harte, M.T., McMurray, D., Smith, D.E., Sims, J.E., Bird, T.A. and O'Neill, L.A. (2001) Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature*, **413**, 78-83.
17. Gagliardi, M.C., Finocchi, A., Orlandi, P., Cursi, L., Cancrini, C., Moschese, V., Miyawaki, T. and Rossi, P. (2003) Bruton's tyrosine kinase defect in dendritic

- cells from X-linked agammaglobulinaemia patients does not influence their differentiation, maturation and antigen-presenting cell function. *Clin Exp Immunol*, **133**, 115-122.
18. Genestier, L., Taillardet, M., Mondiere, P., Gheit, H., Bella, C. and Defrance, T. (2007) TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses. *J Immunol*, **178**, 7779-7786.
 19. Gururajan, M., Jacob, J. and Pulendran, B. (2007) Toll-like receptor expression and responsiveness of distinct murine splenic and mucosal B-cell subsets. *PLoS One*, **2**, e863.
 20. Hardy, R.R. and Hayakawa, K. (2001) B cell development pathways. *Annu Rev Immunol*, **19**, 595-621.
 21. Hayashi, K., Nittono, R., Okamoto, N., Tsuji, S., Hara, Y., Goitsuka, R. and Kitamura, D. (2000) The B cell-restricted adaptor BASH is required for normal development and antigen receptor-mediated activation of B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 2755-2760.
 22. Hendriks, R.W., de Bruijn, M.F., Maas, A., Dingjan, G.M., Karis, A. and Grosveld, F. (1996) Inactivation of Btk by insertion of lacZ reveals defects in B cell development only past the pre-B cell stage. *Embo J*, **15**, 4862-4872.
 23. Holinski-Feder, E., Weiss, M., Brandau, O., Jedele, K.B., Nore, B., Backesjo, C.M., Vihinen, M., Hubbard, S.R., Belohradsky, B.H., Smith, C.I. and Meindl, A. (1998) Mutation screening of the BTK gene in 56 families with X-linked agammaglobulinemia (XLA): 47 unique mutations without correlation to clinical course. *Pediatrics*, **101**, 276-284.
 24. Janeway Ch. A., T.P., Walport M. (1999) *The human system in Health and Disease*. Churchill Livingstone.
 25. Jefferies, C.A., Doyle, S., Brunner, C., Dunne, A., Brint, E., Wietek, C., Walch, E., Wirth, T. and O'Neill, L.A. (2003) Bruton's tyrosine kinase is a Toll/interleukin-1 receptor domain-binding protein that participates in nuclear factor kappaB activation by Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*, **278**, 26258-26264.
 26. Johnson, G.B., Brunn, G.J. and Platt, J.L. (2003) Activation of mammalian Toll-like receptors by endogenous agonists. *Crit Rev Immunol*, **23**, 15-44.
 27. Kagan, J.C. and Medzhitov, R. (2006) Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell*, **125**, 943-955.
 28. Kawai, T. and Akira, S. (2006) TLR signaling. *Cell Death Differ*, **13**, 816-825.
 29. Kawai, T. and Akira, S. (2007) Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med*, **13**, 460-469.
 30. Kawakami, Y., Miura, T., Bissonnette, R., Hata, D., Khan, W.N., Kitamura, T., Maeda-Yamamoto, M., Hartman, S.E., Yao, L., Alt, F.W. and Kawakami, T. (1997) Bruton's tyrosine kinase regulates apoptosis and JNK/SAPK kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3938-3942.
 31. Kawakami, Y., Yao, L., Miura, T., Tsukada, S., Witte, O.N. and Kawakami, T. (1994) Tyrosine phosphorylation and activation of Bruton tyrosine kinase upon Fc epsilon RI cross-linking. *Mol Cell Biol*, **14**, 5108-5113.
 32. Kerner, J.D., Appleby, M.W., Mohr, R.N., Chien, S., Rawlings, D.J., Maliszewski, C.R., Witte, O.N. and Perlmutter, R.M. (1995) Impaired expansion of mouse B cell progenitors lacking Btk. *Immunity*, **3**, 301-312.
 33. Khan, W.N. (2009) B cell receptor and BAFF receptor signaling regulation of B cell homeostasis. *J Immunol*, **183**, 3561-3567.
 34. Khan, W.N., Alt, F.W., Gerstein, R.M., Malynn, B.A., Larsson, I., Rathbun, G., Davidson, L., Muller, S., Kantor, A.B., Herzenberg, L.A. and et al. (1995)

- Defective B cell development and function in Btk-deficient mice. *Immunity*, **3**, 283-299.
35. Krishnan, J., Selvarajoo, K., Tsuchiya, M., Lee, G. and Choi, S. (2007) Toll-like receptor signal transduction. *Exp Mol Med*, **39**, 421-438.
36. Kurosaki, T. (1999) Genetic analysis of B cell antigen receptor signaling. *Annu Rev Immunol*, **17**, 555-592.
37. Kurosaki, T., Shinohara, H. and Baba, Y. (2010) B cell signaling and fate decision. *Annu Rev Immunol*, **28**, 21-55.
38. Lachance, G., Levasseur, S. and Naccache, P.H. (2002) Chemotactic factor-induced recruitment and activation of Tec family kinases in human neutrophils. Implication of phosphatidylinositol 3-kinases. *J Biol Chem*, **277**, 21537-21541.
39. Lee, K.G., Xu, S., Wong, E.T., Tergaonkar, V. and Lam, K.P. (2008) Bruton's tyrosine kinase separately regulates NFkappaB p65RelA activation and cytokine interleukin (IL)-10/IL-12 production in TLR9-stimulated B Cells. *J Biol Chem*, **283**, 11189-11198.
40. Li, Q.J., Chau, J., Ebert, P.J., Sylvester, G., Min, H., Liu, G., Braich, R., Manoharan, M., Soutschek, J., Skare, P., Klein, L.O., Davis, M.M. and Chen, C.Z. (2007) miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell*, **129**, 147-161.
41. Lopes-Carvalho T., F.J.a.K.J.F. (2005) Marginal zone B cells in lymphocyte activation and regulation. *current opinion in Immunology*, **17**, 244-250.
42. Lortan J., G.D.K.D.S., Platteau B., Bazin H., Naclennan I. C. (1985) Regulation of the size of the recirculating B cell pool of adult rats. *Adv Exp Med Biol*, **186**, 593-601.
43. Mansell, A., Smith, R., Doyle, S.L., Gray, P., Fenner, J.E., Crack, P.J., Nicholson, S.E., Hilton, D.J., O'Neill, L.A. and Hertzog, P.J. (2006) Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation. *Nat Immunol*, **7**, 148-155.
44. Martin F., K.J.F. (2002) Marginal-zone B cells. *Nat Immunol*, **2**.
45. Medina, K.L. and Singh, H. (2005) Genetic networks that regulate B lymphopoiesis. *Curr Opin Hematol*, **12**, 203-209.
46. Miyake, K., Ogata, H., Nagai, Y., Akashi, S. and Kimoto, M. (2000) Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4/MD-2 and RP105/MD-1. *J Endotoxin Res*, **6**, 389-391.
47. Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'Amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., van't Veer, C., Penton-Rol, G., Ruco, L.P., Allavena, P. and Mantovani, A. (2000) Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol*, **164**, 5998-6004.
48. Nagai, Y., Garrett, K.P., Ohta, S., Bahrn, U., Kouro, T., Akira, S., Takatsu, K. and Kincade, P.W. (2006) Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity*, **24**, 801-812.
49. Nemazee, D., Gavin, A., Hoebe, K. and Beutler, B. (2006) Immunology: Toll-like receptors and antibody responses. *Nature*, **441**, E4; discussion E4.
50. Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J., Cao, Z. and Matsumoto, K. (1999) The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature*, **398**, 252-256.
51. Orkin, S.H. and Zon, L.I. (2008) Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*, **132**, 631-644.

52. Park, H., Wahl, M.I., Afar, D.E., Turck, C.W., Rawlings, D.J., Tam, C., Scharenberg, A.M., Kinet, J.P. and Witte, O.N. (1996) Regulation of Btk function by a major autophosphorylation site within the SH3 domain. *Immunity*, **4**, 515-525.
53. Pillai S., C.A., Moran S. T. (2005) Marginal Zone B Cells. *Annu Rev Immunol*, **23**, 161-196.
54. Qiu, P., Pan, P.C. and Govind, S. (1998) A role for the Drosophila Toll/Cactus pathway in larval hematopoiesis. *Development*, **125**, 1909-1920.
55. Quek, L.S., Bolen, J. and Watson, S.P. (1998) A role for Bruton's tyrosine kinase (Btk) in platelet activation by collagen. *Curr Biol*, **8**, 1137-1140.
56. Renz-Polster H., K.S., Braun J. (2006) *Basislehrbuch Innere Medizin*. Elsevier Urban & Fischer, München, Jena.
57. Rolls, A., Shechter, R., London, A., Ziv, Y., Ronen, A., Levy, R. and Schwartz, M. (2007) Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. *Nat Cell Biol*, **9**, 1081-1088.
58. Sato, S., Katagiri, T., Takaki, S., Kikuchi, Y., Hitoshi, Y., Yonehara, S., Tsukada, S., Kitamura, D., Watanabe, T., Witte, O. and Takatsu, K. (1994) IL-5 receptor-mediated tyrosine phosphorylation of SH2/SH3-containing proteins and activation of Bruton's tyrosine and Janus 2 kinases. *J Exp Med*, **180**, 2101-2111.
59. Sato, S., Sugiyama, M., Yamamoto, M., Watanabe, Y., Kawai, T., Takeda, K. and Akira, S. (2003) Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol*, **171**, 4304-4310.
60. Schmidt, N.W., Thieu, V.T., Mann, B.A., Ahyi, A.N. and Kaplan, M.H. (2006) Bruton's tyrosine kinase is required for TLR-induced IL-10 production. *J Immunol*, **177**, 7203-7210.
61. Sioud, M. (2005) Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization. *J Mol Biol*, **348**, 1079-1090.
62. Spaargaren, M., Beuling, E.A., Rurup, M.L., Meijer, H.P., Klok, M.D., Middendorp, S., Hendriks, R.W. and Pals, S.T. (2003) The B cell antigen receptor controls integrin activity through Btk and PLCgamma2. *J Exp Med*, **198**, 1539-1550.
63. Sun, L., Deng, L., Ea, C.K., Xia, Z.P. and Chen, Z.J. (2004) The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. *Mol Cell*, **14**, 289-301.
64. Takeda, K. and Akira, S. (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*, **17**, 1-14.
65. Thomas, J.D., Sideras, P., Smith, C.I., Vorechovsky, I., Chapman, V. and Paul, W.E. (1993) Colocalization of X-linked agammaglobulinemia and X-linked immunodeficiency genes. *Science*, **261**, 355-358.
66. Touhara, K., Inglese, J., Pitcher, J.A., Shaw, G. and Lefkowitz, R.J. (1994) Binding of G protein beta gamma-subunits to pleckstrin homology domains. *J Biol Chem*, **269**, 10217-10220.
67. Tsukada, S., Simon, M.I., Witte, O.N. and Katz, A. (1994) Binding of beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins to the PH domain of Bruton tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 11256-11260.
68. Tsukamoto, Y., Nagai, Y., Kariyone, A., Shibata, T., Kaisho, T., Akira, S., Miyake, K. and Takatsu, K. (2009) Toll-like receptor 7 cooperates with IL-4 in activated B cells through antigen receptor or CD38 and induces class switch recombination and IgG1 production. *Mol Immunol*, **46**, 1278-1288.

69. Ueda, Y., Kondo, M. and Kelsoe, G. (2005) Inflammation and the reciprocal production of granulocytes and lymphocytes in bone marrow. *J Exp Med*, **201**, 1771-1780.
70. Ueda, Y., Yang, K., Foster, S.J., Kondo, M. and Kelsoe, G. (2004) Inflammation controls B lymphopoiesis by regulating chemokine CXCL12 expression. *J Exp Med*, **199**, 47-58.
71. Urlinger, S., Baron, U., Thellmann, M., Hasan, M.T., Bujard, H. and Hillen, W. (2000) Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7963-7968.
72. Valiaho, J., Smith, C.I. and Vihinen, M. (2006) BTKbase: the mutation database for X-linked agammaglobulinemia. *Hum Mutat*, **27**, 1209-1217.
73. Vassilev, A., Ozer, Z., Navara, C., Mahajan, S. and Uckun, F.M. (1999) Bruton's tyrosine kinase as an inhibitor of the Fas/CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem*, **274**, 1646-1656.
74. Vihinen, M., Mattsson, P.T. and Smith, C.I. (2000) Bruton tyrosine kinase (BTK) in X-linked agammaglobulinemia (XLA). *Front Biosci*, **5**, D917-928.
75. Visintin, A., Mazzoni, A., Spitzer, J.H., Wylie, D.H., Dower, S.K. and Segal, D.M. (2001) Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol*, **166**, 249-255.
76. Weller S., R.C.-A.a.W.J.-C. (2005) Splenic marginal zone B cells in humans: Where do they mutate their Ig receptor? *Eur J Immunol*, **35**, 2789-2792.
77. Wicker, L.S. and Scher, I. (1986) X-linked immune deficiency (xid) of CBA/N mice. *Curr Top Microbiol Immunol*, **124**, 87-101.
78. Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Sanjo, H., Uematsu, S., Kaisho, T., Hoshino, K., Takeuchi, O., Kobayashi, M., Fujita, T., Takeda, K. and Akira, S. (2002a) Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature*, **420**, 324-329.
79. Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi, O., Takeda, K. and Akira, S. (2003) TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol*, **4**, 1144-1150.
80. Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K. and Akira, S. (2002b) Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol*, **169**, 6668-6672.
81. Zhou, Y., Ye, L., Wan, Q., Zhou, L., Wang, X., Li, J., Hu, S., Zhou, D. and Ho, W. (2009) Activation of Toll-like receptors inhibits herpes simplex virus-1 infection of human neuronal cells. *J Neurosci Res*.
82. Zorde-Khvaleyevsky, E., Abramovitch, R., Barash, H., Spivak-Pohis, I., Rivkin, L., Rachmilewitz, J., Galun, E. and Giladi, H. (2009) Toll-like receptor 3 signaling attenuates liver regeneration. *Hepatology*.

Danksagung

Ich bedanke mich sehr herzlich bei meiner Betreuerin PD Dr. Cornelia Brunner für die Unterstützung und die Führung durch meine Arbeit. Sie führte mich durch das experimentelle Arbeiten und bot mir einen Einblick in diese Arbeitswelt. Des Weiteren half Sie mir durch Ihr unermüdliches Bemühen mich zu verbessern und auch dabei, die Ergebnisse zu Papier zu bringen.

Bei der UTA und CTA unserer Arbeitsgruppe, Petra Wehrich, möchte ich mich auch herzlich bedanken. Sie hat mit viel Muße und Ruhe mir viele Techniken und Methoden beigebracht, die für meine experimentellen Arbeiten notwendig und hilfreich waren, des Weiteren stand Sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite.

Ebenso möchte ich mich bei meinen Eltern für die jahrelange Unterstützung, sowohl finanziell als auch moralisch in manch schwieriger Situation bedanken. Ohne Ihre Unterstützung wäre mein Werdegang sicher ein ganz anderer geworden.

Vielen herzlichen Dank