

Klinikum rechts der Isar
Technische Universität München
Chirurgische Klinik und Poliklinik
Klinische Forschergruppe Sepsis

Die Auswirkungen der Mutation wichtiger Funktionseinheiten im murinen Lymphozyten-Adaptorprotein SLY auf das Immunsystem

Tanja Scheikl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Haller
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. M. Schemann
2. Univ.-Prof. Dr. B. Holzmann

Die Dissertation wurde am 02.08.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 12.09.2006 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

A	EINLEITUNG	1
A.1	Das Immunsystem	1
A.2	Entwicklung und Funktion der B-Zellen	1
A.3	Entwicklung und Funktion der T-Zellen	3
A.4	Adaptorproteine in Antigenrezeptor-Signalkaskaden	6
A.5	Die SLY Proteinfamilie	8
A.6	Vorarbeiten	9
A.6.1	Generierung der <i>Sly^{d/d}</i> Maus	9
A.6.2	Erste Analyse der <i>Sly^{d/d}</i> Maus	11
A.7	Zielsetzung der Arbeit	14
B	MATERIAL UND METHODEN	15
B.1	Bezugsquellennachweis	15
B.1.1	Chemikalien	15
B.1.2	Radiochemikalien	17
B.1.3	Enzyme	17
B.1.4	Verbrauchsmaterial und Sonstiges	17
B.1.5	Geräte	18
B.2	Medien und Puffer	19
B.2.1	Stammlösungen und Puffer	19
B.2.2	Medien für die Zellkultur	21
B.3	Versuchstiere und Zelllinien	21
B.3.1	Versuchstiere	21
B.3.2	Zelllinien	21
B.4	Antikörper und Primer	22
B.4.1	Antikörper	22
B.4.2	Primer	23
B.5	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	23
B.5.1	Isolierung von chromosomaler DNA	23
B.5.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	23
B.5.3	Isolierung von gesamtzellulärer RNA	24
B.5.4	cDNA-Synthese aus mRNA (Reverse Transkription)	24
B.5.5	Real-Time PCR mittels TaqMan	25
B.6	Proteinanalytische Methoden	25
B.6.1	Aufbereitung der Proben	25
B.6.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	25
B.6.3	Western-Blot (Immunoblot)	26
B.7	Zellkultur	27
B.7.1	Kultivierung von EL-4 Zellen	27

Inhaltsverzeichnis

B.7.2	Organhomogenisierung	27
B.7.3	Kultivierung von Lymphozyten	27
B.7.4	Einfrieren und Auftauen von EL-4 Zellen	28
B.8	Tierversuche	28
B.8.1	Organentnahme	28
B.8.2	Spülung des Peritoneums	28
B.8.3	Immunisierung von Mäusen	28
B.8.4	Generierung von <i>Sly^{d/d}</i> Mäusen mit HY spezifischem TCR	29
B.8.5	Generierung von Knochenmarks-Chimären Mäusen	29
B.8.6	Akute Graft-versus-Host-Disease	29
B.9	Immunologische und zellbiologische Methoden	30
B.9.1	Adhäsionsassay	30
B.9.2	Proliferationsassay	30
B.9.3	Induktion von Apoptose	31
B.9.4	Durchflusszytometrische Analyse von Antigenen auf der Zelloberfläche.....	31
B.9.5	Zellsortierung im Hochleistungsdurchflusszytometer MoFlo.....	31
B.9.6	Ca ²⁺ -Messungen	32
B.9.7	CTL Chrom-Assay	32
B.9.8	ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)	33
B.9.9	Statistische Auswertung	34
C	ERGEBNISSE	35
C.1	B-Zellen	35
C.1.1	B-Zell Entwicklung in <i>Sly^{d/d}</i> Mäusen	35
C.1.2	Analyse der <i>Sly^{d/d}</i> B-Zellen	37
C.1.3	Analyse der B-Zell Funktionen in SLY mutierten Mäusen	41
C.2	T-Zellen	43
C.2.1	Entwicklung der T-Zellen in <i>Sly^{d/d}</i> Mäusen	43
C.2.2	Funktionen der T-Zellen mit einer Mutation in SLY	48
C.2.3	Signalkaskaden bei <i>Sly^{d/d}</i> T-Zellen nach AGR Stimulation	54
C.3	In vivo Modell aGVHD	57
C.3.1	Überleben nach Induktion einer aGVHD	59
C.3.2	Gewichtsverlust während einer aGVHD	59
C.3.3	Analyse der Organschäden während einer aGVHD	60
D	DISKUSSION	62
D.1	Der Einfluss von SLY auf B-Zellen	62
D.2	Der Einfluss von SLY auf die Entwicklung der T-Zellen.....	65
D.3	Funktionalität der T-Zellen in <i>Sly^{d/d}</i> Mäusen	67
D.4	Funktion von SLY in der Antigenrezeptor Signalkaskade	68

Inhaltsverzeichnis

D.5	Die Rolle von SLY in der akuten Graft-versus-Host Disease (GVHD).....	69
E	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	71
F	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	75
G	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....	78
H	LITERATURVERZEICHNIS	79
I	DANKSAGUNG.....	85

A EINLEITUNG

A.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist eine Funktionseinheit, die sowohl körperfremde als auch körpereigene, entartete Moleküle von den normalen körpereigenen Bestandteilen unterscheidet und bekämpft und schützt dadurch den Organismus. Dieses während der Evolution hoch entwickelte System kann in zwei große Klassen aufgeteilt werden, die angeborene und die adaptive (erworbene) Immunität. Das angeborene Immunsystem dient der ersten Abwehr von Erregern und wird durch hochkonservierte Epitope („Pathogen-associated molecular patterns“ = PAMPs) auf den Krankheitserregern aktiviert, kann jedoch Erreger nicht spezifisch erkennen und keinen gezielten Schutz gegen eine erneute Infektion bieten. Hierbei sind Granulozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen (DC) und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) involviert. Die adaptive Immunität beruht auf der klonalen Selektion von T- und B-Lymphozyten mit ihren hochspezifischen Rezeptoren. Die antigenspezifischen Lymphozyten vermehren sich und differenzieren zu Effektorzellen aus, die die Krankheitserreger vernichten und das immunologische Gedächtnis bilden. Das immunologische Gedächtnis ermöglicht es dem Organismus bei einem erneuten Aufeinandertreffen mit dem Antigen schneller und effizienter zu reagieren (9, 28).

A.2 Entwicklung und Funktion der B-Zellen

In Säugetieren entwickeln sich die ersten B-Zellen in der fötalen Leber, nach der Geburt setzt sich dieser Prozess im Knochenmark fort. Die frühen Stadien der B-Zell Entwicklung sind durch die schrittweise Umordnung und Expression der Immunglobulingene (Ig) definiert (28, 59).

Die ersten Vorläuferzellen der B-Zellen, die Pro-B-Zellen, stammen von pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen ab und können sich nur begrenzt selbst erneuern. Aus den späten Pro-B-Zellen entstehen die großen Prä-B-Zellen, die den Prä-B-Zell-Rezeptor aus den fertig umgeordneten Genen der schweren Kette zusammen mit einer Ersatz-L-Kette exprimieren. Dies erlaubt der Zelle sich weiter zu teilen und kleine Prä-B-Zellen zu bilden. Nachdem auch die Gene der leichten Kette umgeordnet sind, wird IgM auf der Oberfläche von unreifen B-Zellen exprimiert. In diesem Stadium werden autoreaktive B-Zellen ausselektiert, d.h. B-Zellen, die körpereigene Strukturen erkennen. Die übrigen B-Zellen wandern als reife B-Zellen, die neben IgM auch IgD exprimieren, aus dem Knochenmark in die Peripherie aus (28).

Die weitere Differenzierung der B-Zellen in der Milz wird durch die Expressionsdichte von IgM und IgD, sowie der Oberflächenmarker CD21, CD23 und CD1d charakterisiert. In der Milz entwickeln sich aus den neu gebildeten (NF=„newly formed“: $\text{IgM}^{\text{hi}}\text{IgD}^{\text{lo}}\text{CD21}^{\text{-}}\text{CD23}^{\text{-}}\text{CD1d}^{\text{lo}}$), transitionellen T1 B-Zellen die Vorläuferzellen der folliculären B-Zellen (preFB: $\text{IgM}^{\text{hi}}\text{IgD}^{\text{hi}}\text{CD21}^{\text{hi}}\text{CD23}^{\text{hi}}\text{CD1d}^{\text{lo}}$), die IgD, CD21 und CD23 stark exprimieren. Aus ihnen entstehen die folliculären B-Zellen (FB: $\text{IgM}^{\text{lo}}\text{IgD}^{\text{hi}}\text{CD21}^{\text{int}}\text{CD23}^{\text{hi}}\text{CD1d}^{\text{lo}}$), die eine niedrigere Expression von IgM und CD21 aufweisen und die Vorläuferzellen der Marginalzonen B-Zellen (preMZB: $\text{IgM}^{\text{hi}}\text{IgD}^{\text{hi}}\text{CD21}^{\text{hi}}\text{CD23}^{\text{hi}}\text{CD1d}^{\text{hi}}$) mit einer hohen Expression von CD1d. Aus diesen wiederum entwickeln sich dann die Marginalzonen B-Zellen (MZB: $\text{IgM}^{\text{hi}}\text{IgD}^{\text{lo}}\text{CD21}^{\text{hi}}\text{CD23}^{\text{-}}\text{CD1d}^{\text{hi}}$), die die Expression von IgD und CD23 wieder herunter regulieren (Abb. 1).

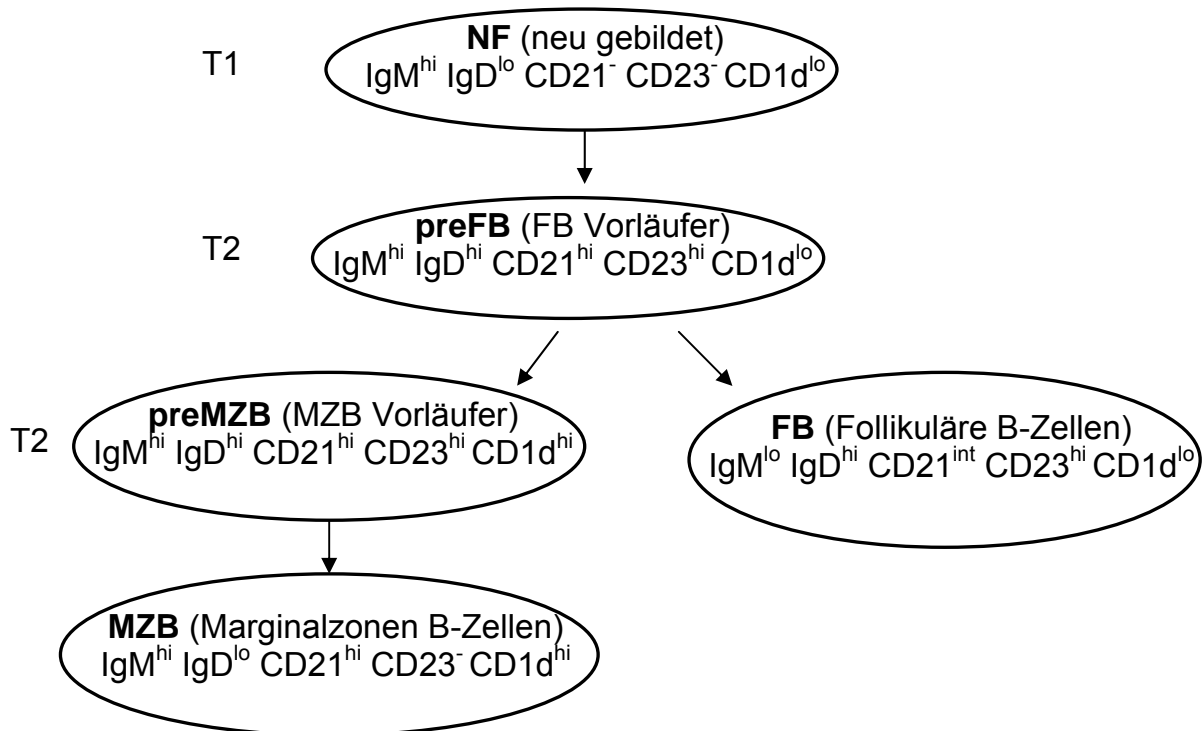


Abb. 1: B-Zell Entwicklung in der Milz. Aus den T1-B-Zellen entstehen die T2-Vorläuferzellen. Daraus entwickeln sich die folliculären und Marginalzonen B-Zellen. Die Populationen lassen sich durch die Expression von IgM, IgD, CD21, CD23 und CD1d eindeutig unterscheiden (nach (61)).

Die beiden Vorläuferpopulationen werden auch transitionelle oder T2 B-Zellen genannt. Die folliculären B-Zellen werden als B-2-B-Zellen bezeichnet und repräsentieren die größte Fraktion der B-Zellen im Organismus. Sie zirkulieren im Blut- und Lymphkreislauf, sind für die Antikörperproduktion bei einer T-Zell abhängigen Immunantwort verantwortlich und sind zum Isotypwechsel fähig (24, 28). Die Marginalzonen B-Zellen bilden nur ca. 10% aller Zellen in der Milz und sind sessile Zellen in der Marginalzone. Sie spielen bei der frühen

Antikörperproduktion gegen T-Zell unabhängige Antigene vor allem aus dem Blut eine große Rolle und sezernieren hauptsächlich IgM (40, 42).

Die B-1-B-Zellen oder CD5-B-Zellen sind selbst erneuernde B-Zellen, die aus einer bestimmten Stammzelle der fötalen Leber hervorgehen. Die genaue Entwicklung dieser Zellen ist bisher noch unbekannt. Sie bilden die vorherrschende B-Zell Population in der Peritoneal- und Brusthöhle und produzieren niedrig-affine IgM Antikörper, hauptsächlich gegen bakterielle Polysaccharide und sind somit ebenfalls bei einer Immunantwort gegen T-Zell unabhängige Antigene wichtig (40).

A.3 Entwicklung und Funktion der T-Zellen

T-Zellen entstehen aus unreifen Vorläuferzellen, die aus dem Knochenmark in den Thymus einwandern. Die intrathymische Entwicklung der Vorläuferzellen zu reifen T-Zellen ist von Signalen der nicht-hämatopoietischen Stromazellen abhängig (49). Die Differenzierung der T-Zellen ist durch die Expression von Oberflächenproteinen wie CD4, CD8, CD44 und CD25, charakterisiert (20). Die Pro-T-Zellen werden auch als doppelt negative (DN) bezeichnet, da sie weder CD4 noch CD8 exprimieren. Diese Zellen können auf Grund ihrer unterschiedlichen Expression von CD25 und CD44 in vier Differenzierungsstadien unterteilt werden: DN1 (CD25⁻CD44⁺), DN2 (CD25⁺CD44⁺), DN3 (CD25⁺CD44⁻) und DN4 (CD25⁻CD44⁻). Zwischen dem DN2 und DN3 Stadium werden die β -Gene des T-Zell Rezeptors (TZR) umgeordnet und der Pro-TZR exprimiert. Aus den DN4 entstehen durch die Expression von CD4 und CD8 die doppelt positiven (DP) Thymozyten. Diese ordnen die α -TZR-Gene um und bilden einen funktionellen TZR auf der Oberfläche aus. Dieser ermöglicht die positive und negative Selektion, d.h. die Selektion der autoreaktiven und funktionell eingeschränkten T-Zellen. T-Zellen, die diese beiden Selektionsphasen überleben, verringern entweder die Expression des CD4- oder des CD8-Korezeptors. Sie verlassen den Thymus dann als reife, naive T-Lymphozyten, die CD8⁺CD4⁻ und CD4⁺CD8⁻ T-Zellen (Abb. 2).

Die reifen T-Zellen wandern in die peripheren lymphatischen Organe, wie die Milz, Lymphknoten, Mandeln oder Peyer'schen Plaques, bis sie auf Antigene oder antigen-präsentierende Zellen treffen, die sie aktivieren (28, 75).

Antigen-Präsentierenden Zellen (APC), wie B-Zellen, DC oder Makrophagen sind Zellen, die über MHC (MHC = major histocompatibility complex) Moleküle Antigene präsentieren. T-Zellen interagieren mit den APCs und werden aktiviert, wenn zugleich eine Stimulation über den Korezeptor erfolgt. CD8⁺ T-Zellen erkennen Peptide gebunden an MHC Klasse I, CD4⁺ T-Zellen dagegen Peptide gebunden an MHC Klasse II (9, 28).

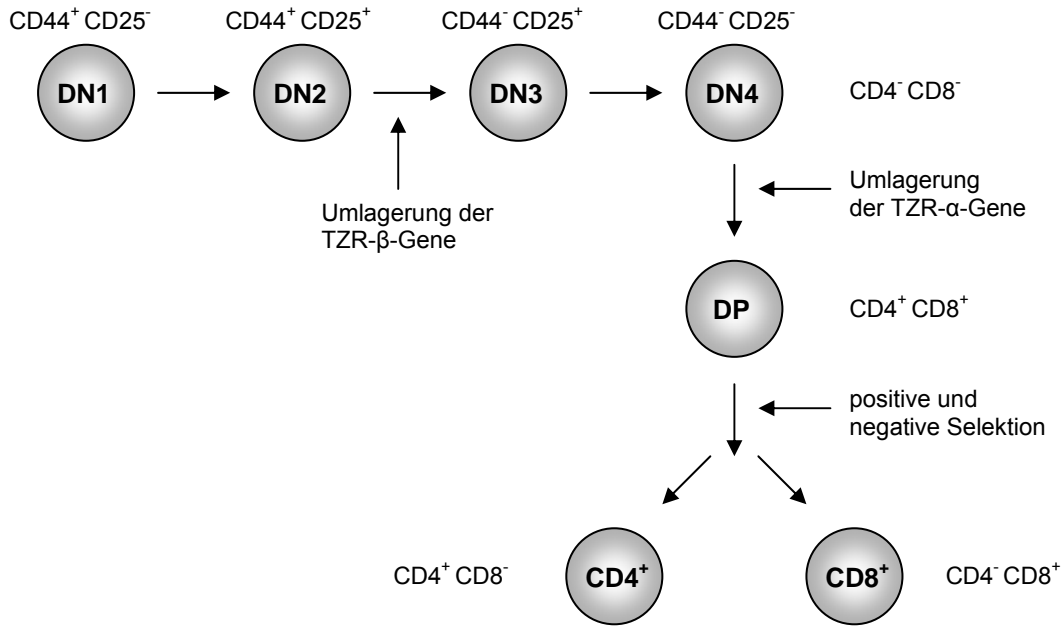


Abb. 2: T-Zell Entwicklung im Thymus. Die intrathymische Entwicklung von Vorläuferzellen über DN und DP zu reifen, einfach positiven T-Zellen. Die Subpopulationen lassen sich durch die Expression von CD44, CD25, CD4 und CD8 unterscheiden.

Aktivierte T-Zellen produzieren Interleukin-2 (IL-2), das ihre Proliferation und Ausdifferenzierung zu aktivierten T-Effektorzellen steuert. Die Stimulation der T-Effektorzellen durch einen Peptid:MHC-Komplex erfolgt unabhängig von einer Kostimulation, so dass jede Zielzelle, die das Antigen präsentiert, aktiviert oder zerstört werden kann (9, 28).

Die $CD8^+$ -Effektorzellen spielen eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Eliminierung von körpereigenen Zellen, die durch intrazelluläre Bakterien oder Viren infiziert sind oder durch toxische Agenzien geschädigt sind. Sie töten ihre Zielzellen entweder durch die Freisetzung von Perforin und Granzymen oder durch die Interaktion des Fas-Liganden mit dem Fas-Rezeptor auf der Zielzelle (58, 71).

Basierend auf ihrer Funktion, können $CD4^+$ -T-Zellen in verschiedene Untergruppen eingeteilt werden, die sich in der Sekretion der Effektor-Zytokine unterscheiden und eine zentrale Rolle bei adaptiven Immunantworten spielen. Die Ausdifferenzierung von Helfer-T-Zellen (T_H) in die Untergruppen ist durch Zytokin-Rezeptor-Signalwege und Signale von kostimulatorischen Rezeptoren beeinflusst (45).

$CD4-T_H1$ Zellen produzieren IL-2, Interferon gamma ($IFN\gamma$) und $TNF\alpha$ (Tumor Nekrose Faktor alpha) und regen damit einerseits Makrophagen zur Tötung von Erregern an und leiten andererseits die Differenzierung von B-Zellen ein. IL-2 wiederum fördert das Wachstum von B-, T- und NK-Zellen. T_H1 -Zellen sind somit für die zellvermittelte Immunabwehr verantwortlich. Unter pathologischen Bedingungen können T_H1 Zellen Autoimmun-

reaktionen und Abstoßungen von Transplantaten bei unterschiedlichem MHC-Allotyp verursachen (9, 28).

CD4-T_H2 Zellen dagegen sekretieren hauptsächlich IL-4 und IL-5 und unterstützen damit humorale Immunantworten, können aber auch an Autoimmunerkrankungen beteiligt sein. (45, 73). Sie bewirken einen Klassenwechsel der Immunglobuline auf B-Zellen und induzieren die Proliferation und anschließende Differenzierung zu Antikörper-sezernierenden B-Zellen (B-Lymphoblasten) und B-Gedächtniszellen.

T-Effektorzellen kontrollieren somit durch ihre Wechselwirkungen mit Zielzellen alle bekannten Effektormechanismen der adaptiven Immunantwort, wie in Abbildung 3 zusammengefasst (28).

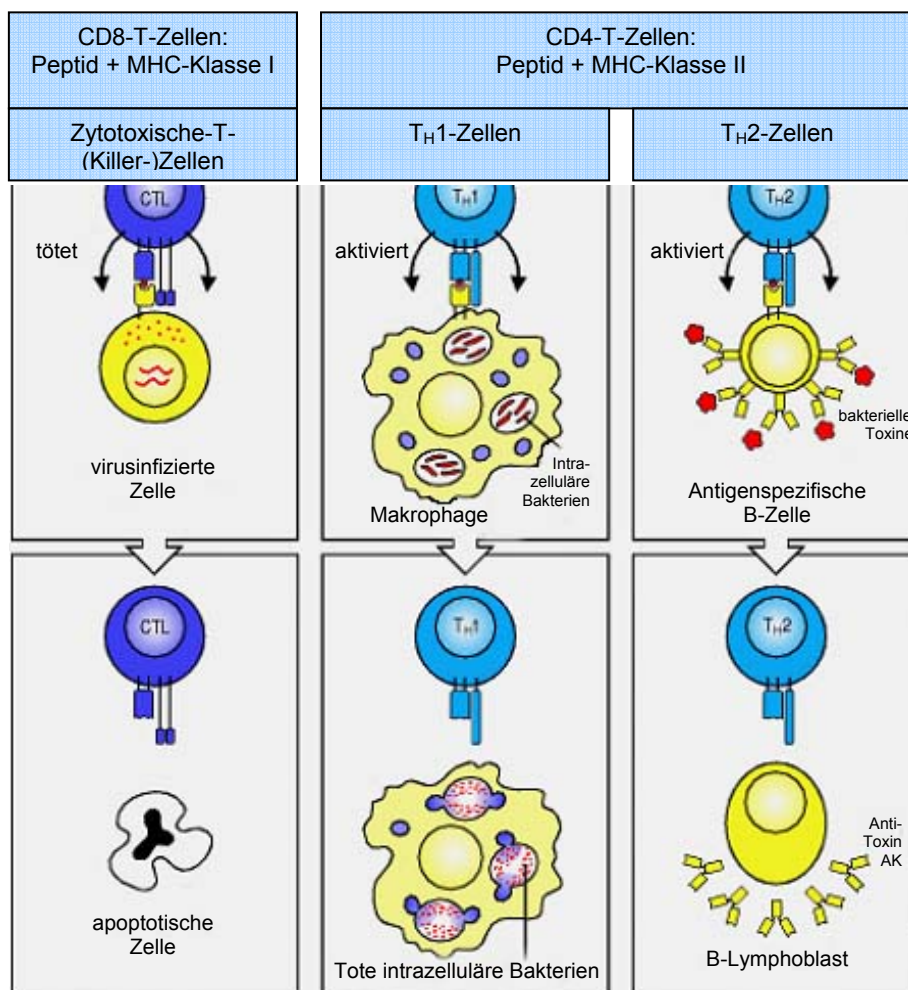


Abb. 3: Die drei Klassen von T-Effektorzellen. Zytotoxische T-Zellen (links) töten virusinfizierte Zielzellen, die Antigene gebunden an MHC-I Molekülen auf der Oberfläche tragen. T_H1-Zellen (mitte) und T_H2-Zellen (rechts) erkennen Antigene, die von MHC-II Molekülen präsentiert werden. T_H1-Zellen stimulieren Makrophagen, die dadurch intrazelluläre Mikroorganismen effektiver zerstören können. T_H2-Zellen regen B-Zellen zur Differenzierung, zum Isotypwechsel und zur Antikörper-Sezernierung an (aus (28)).

A.4 Adaptorproteine in Antigenrezeptor-Signalkaskaden

Die Antigen-vermittelten Stimulation von Lymphozyten erfolgt nur, wenn vom Antigen Rezeptor (AGR) empfangene, extrazelluläre Signale ins Zellinnere und schließlich in den Zellkern übertragen werden (Abb. 4).

Nach der Bindung des Antigens an den T-Zell Rezeptor werden Protein-Tyrosin-Kinasen (PTKs) der Src Familie, wie beispielsweise Lck (p56) und Fyn (p59), aktiviert. Diese Kinasen besitzen eine so genannte SH2 (Src-Homologie) Domäne (30, 36). Sie phosphorylieren Tyrosin-haltige ITAMs (Immunrezeptor-Tyrosin-Aktivator-Motive) der zytoplasmatischen Domänen von CD3 und dessen ζ -Kette. Lck ist zusätzlich mit den Korezeptoren CD4 oder CD8 assoziiert, was zur Stabilität der TZR-MHC:Antigen Interaktion beiträgt.

PTKs der Syk-Familie, der u.a. ZAP-70 und Syk (p72) angehören, binden an die phosphorylierten Tyrosine, werden selbst phosphoryliert und dadurch aktiviert. Diese Proteine sind im Zytoplasma lokalisiert und besitzen zwei SH2 Domänen, mit denen sie an die ITAMs binden. Dies führt wiederum zur Phosphorylierung des membranständigen Adaptorproteins LAT („Linker for activation of T cells“), das weitere Proteine rekrutiert und aktiviert, wie Phospholipase C gamma (PLC γ) und Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K). Diese Kaskade von Phosphorylierungen und die dadurch induzierten Aktivierungen führen zum Anschalten von „downstream“ gelegenen Signalwegen, wie den PLC γ /Ca²⁺, PKC (Protein Kinase C) und den Ras/MAP-Kinase (Mitogen-aktivierte Protein Kinase) Signalweg. Dies wiederum resultiert in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1, NFAT und NF κ B, welche zu zellulären Antworten wie Proliferation und Differenzierung der Lymphozyten, Zytokinproduktion, Apoptose oder Überleben der Zellen führen (46, 69).

Die Signalkaskaden in T- und B-Zellen sind sehr ähnlich aufgebaut, wobei einige Proteinkinasen durch andere Mitglieder derselben Familie ersetzt sind. Aus diesem Grund wird im Rahmen dieser Arbeit nicht auf die Signalkaskade in B-Zellen eingegangen.

Neben den Kinasen spielen Adaptorproteine in diesen Signalkaskaden eine große Rolle. Adaptorproteine sind Proteine, die keine enzymatischen und transkriptionellen Aktivitäten besitzen, sondern spezifische Protein-Protein oder Protein-Lipid Interaktionen ermöglichen. Adaptorproteine liegen entweder im Zytosol gelöst oder an die Zellmembran gebunden vor. Mit Hilfe ihrer funktionellen Domänen, wie SH2, SH3 (Src-Homolog 3) und SAM („sterile alpha motif“) sind sie an der Ausbildung eines komplexen Netzwerkes aus Signalmolekülen beteiligt (29, 34, 36).

SH2 Domänen eines Proteins binden an phosphotyrosinhaltige Motive anderer Proteine, SH3 Domänen an Prolinreiche Sequenzen (34, 38). Proteine mit ähnlichen SAM Domänen dagegen interagieren über ihre SAM Domänen miteinander und können Homo- oder Heterodimere ausbilden (53). Adaptorproteine regulieren die Lokalisation von Effektormolekülen in der Zelle und dadurch deren Aktivität. Sie ermöglichen Konformationsänderungen einzelner Proteine und die Bildung von Proteinkomplexen.

Außerdem spielen sie bei negativen oder positiven Regelkreisen in Signalkaskaden eine Rolle und steuern so die zellulären Antworten nach Antigenrezeptor Stimulation (29, 34, 36).

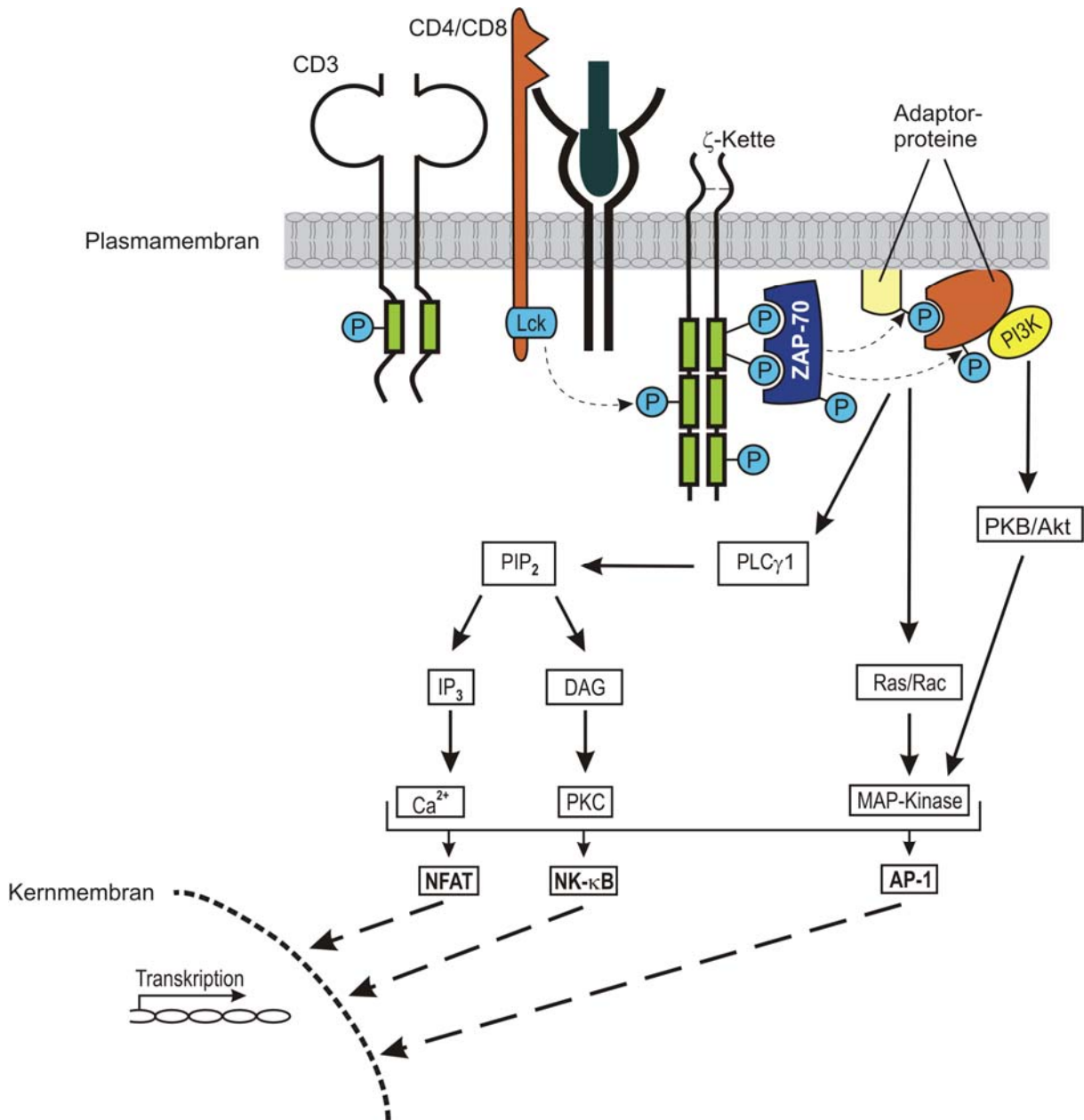


Abb. 4: T-Zell Rezeptor Signalkaskade. Nach Stimulation des TZR werden Adaptorproteine, wie ZAP-70 und Lck aktiviert. Über die verschiedenen Signalwege werden die Transkriptionsfaktoren NFAT, NF-κB und AP-1 angeregt, wandern in den Zellkern und lösen die Transkription von Zielgenen aus (PIP₂=Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, IP₃=Inositol-1,4,5-triphosphat, DAG=Diacylglycerin).

A.5 Die SLY Proteinfamilie

Beer et al (5) beschrieb erstmals SLY1 (SH3 domain containing protein expressed in lymphocytes), im folgenden SLY genannt, als ein potenzielles Adaptorprotein in Lymphozyten. Durch Vergleich der Proteinsequenz wurden zwei weitere Proteine mit großer Homologie zu SLY entdeckt, SLY2 (auch Nash1, HACSN1 und SAMSN1 genannt) und SASH1 (10, 70, 76). SLY, SLY2 und SASH1 zeigen eine ähnliche Organisation der funktionellen Einheiten mit einer zweigeteilten Kern-Lokalisations-Sequenz (NLS) am N-Terminus und kurz aufeinander folgend eine SH3 und eine SAM Domäne. SASH1 als größtes der drei Proteine weist zudem eine zweite SAM Domäne am C-Terminus auf, sowie einen verlängerten N- und C-terminalen Bereich (Abb. 5). Sequenzvergleiche zeigten, dass die SH3 und SAM Domänen dieser Proteine größere Homologien zueinander als zu den Domänen anderer Proteine besitzen, was auf eine neue Familie von Adaptorproteinen hinweist (4).

Das Sly-Gen ist X-chromosomal lokalisiert und besitzt 8 Exons. Das Protein besteht aus 380 Aminosäuren, ist 55 kDa groß und wird im Gegensatz zu den anderen Proteinen dieser Adaptorfamilie vor allem in T und B Lymphozyten exprimiert (5). Nach Stimulation des Antigenrezeptors wurde mit Hilfe eines phosphospezifischen Antiserums die Phosphorylierung an Serin27 von SLY nachgewiesen (3). Studien mit Kinase-Inhibitoren in Antigenrezeptor stimulierten Lymphozyten lassen vermuten, dass SLY ein Zielprotein der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), Protein Kinase C (PKC) oder einer Protein Kinase C abhängigen Kinase darstellt und somit eine zentrale Rolle in der AGR-Signalkaskade spielt.

mse	SASH1	MEEDAGAASPAPEPEPEVDPAELEPEAGVSEISRLWTDVMGILDGSLGNIDDLAQYADYNTCFSDVCERMEELRKR	80
mse	SASH1	RVSQDLDVEKPDASPTSLQLRSQIEESLGFCSAVSTPEVERKYPLHKSNSLEDGCVGKGDKKKNKYFWQNRKQKQKIMR	160
mse	SASH1	QTSKGEDVGVVASEITMSDEERIQLMVMVKEKMITIEEARLARKEYEAQHRQSSTLDPADWPDGSIPTLDGSSTCNSREQ	240
NLS1			
mse	SASH1	SDDETEDSVKFKLHKLVNSRRVRKGLIRVEEMKKPSAEGGEEHVFENSFVQDERSALYSGVHKKPPFYDGSPEKPPED	320
mse	SLY	MI RR KPSNASDKEPTQ KK LSLQ RS SS FF K	29
mse	SLY2	ML RR KPSNASDKEKH Q KPK --- RS SS F	24
mse	SASH1	DADSLTPSPSSSLDWTGAGRKLKVF SK GESRGLIKPPKMGTF FS YPEEKAQ KS RS SL TEGEM KK GL SL SHGR TC S	400
NLS2			
mse	SLY	DFAKSPSSPVVSEKEFNLDNIPEDDSGVLTPEDSGKSGK LG KKWR AV ISRTMNRKMGKMMVKALSEE-MGDTLEEGS	108
mse	SLY2	-GNFDRFRNNSVSKSDDSI EV HDR EL TNGSEEQSKTSSG GS LGKKVRA-ISWTM KK VGKKYIKALSEEKEEESGEEAL	102
mse	SASH1	FGGFDLTNRSLHVGSNNSDPAGKEGDFVYKEVIKSPAPRISL G KKVRSV-KETMRKRMSK Y SSPVSEQ---DSGLDGM	476
mse	SLY	ASPTSPDCSLDSPGPEKMA L AFTQEEREPPSLSRQ T STGSE-L--CSPGPGS-GSFLEES---PA Q Y T GP FF CG RA RVH	181
mse	SLY2	FYR-N SD -PMIGT HT EKISL K ASD S MD SL YS---GQSSSSG--ITSCSDGTSNRDSFRLDD---DSFYS GP FC GR AK VH	171
mse	SASH1	PS SP ASG-KP DS EHVDKPKLKAGGSVE SL RSSLSGQSSMSGQ T VSTTDSSTN RS SVKSE DG DEEPPYR GP FC GR AK VH	555
SH3			
mse	SLY	TDFTPSPYD H DSLK LQ KGDV I Q I VEKPPVGTWLG LN GL GS FKFIYDV LP EEAVG F VRPSRR Q SK GR KPK TL HELL	261
mse	SLY2	TDFTPSPYD T SLK IK KGDI I DI I CKT PM GM WT GMLN NK VGN FK FIYDV IL EEEA AP KK IK VPR SR RR EN H-Q TI Q E FL	250
mse	SASH1	TDFTPSPYD T SLK LK KGDI I DI I SK PP MGT WM GLLN NK VGT FK FIYDV LN EE E E K K R PT RR RR KK GR PS Q PK S V ED LL	635
SAM			
mse	SLY	ERIGLEEHTSTLLNGYQ T LEDFKELRE TH LNELN MD PQ H RAK LL TAAEL LD YDTGSEEAEEGAESSQEPVAHTVSEP	341
mse	SLY2	ERIH LQ EY T STLLNGYETL DD LK DI ESH L IELN IAD PE DR AR LL SAAE SL LD BE TTVEHEKESVPLSSNP DIL SAS QL	330
mse	SASH1	DRINLKEHMPT FL FNGYED LD TFK LE EED LD ELN IRD PEHRAV LL TA VEL LQ EM DS NS DQSGSQE KL LV DN QGLSG---	712
mse	SLY	KVDI PR DSGCFEGSESGRDEA EL AGT EE QLQGLSL SG AP*	381
mse	SLY2	-EDCPRDSGCYI IS SEN SD NGKEDLESEN LD SMVQ KIA IT ESS D*	372
mse	SASH1	--RS PR DSG CY ESSEN LE NA K THK PS V LS TK SS TES EN LK SF TRS Q PG NY PT LP L M K S GE VR KQ GE E GR L GR GL AP DT AK S	790
mse	SASH1	CDVPSVTDLSKNRRSLPVSICRSCETLEGPEPVESWPRSHSLDDLQGDADVGKNVPT EM PETCSQ NV PEV PQ TSACTSK	870
mse	SASH1	ALPRGRDPTADV ML L TQ SKR FSD PPK TMA KKL DG SV VAN GLI AP PQ CI PRDFEA QP VP KP GLTR TS LEGLR KGH DH H FL	950
mse	SASH1	GTKEGV DGE QSAPETR QSR HPS QPP VP AK KSRERLANGLH LV SP EA IL PL KKAS PASP VSPSDCPSPREPR SS GT	1030
mse	SASH1	EPGSPACTR PP WLAE LPE STSLQ EH GV KL GPV LS RK VS CV RG VDLEMLTEN KLQ AEGIDLTE EP YS DK HGR CG IPEALV	1110
mse	SASH1	QRYAEDLEQ PER DVATN MD QIR VK LLR KQ HMAI PS GG LT EIC RK PL SP GC VAS MS DW LIS IG L PM Y TS LS DAG F ST LS	1190
SAM			
mse	SASH1	Q V PSL SH SCL Q EAG IT EE RH IR KLI TAA RL FK LP SP EA M*	1230

Abb. 5: Sequenzvergleich der SLY-Proteine. Die Aminosäuresequenzen von SLY2 und SASH1 wurden mit SLY verglichen. Hervorgehoben durch die blau eingerahmten Boxen sind die zweigeteilte NLS und die SH3 und SAM Domänen. Orange hinterlegte Aminosäuren sind identisch. Das * markiert die Phosphorylierungsstelle Serin27 von SLY, die beiden Pfeile die Splice-Stellen im mutierten SLY Protein.

A.6 Vorarbeiten

A.6.1 Generierung der *Sly*^{d/d} Maus

Die genaue Funktion von SLY im Immunsystem ist bisher noch unbekannt, weshalb ein Mausstamm generiert wurde, bei dem weite Teile von Exon 2 und 3 durch homologe Rekombination deletiert wurden (Abb. 6a). Dies führt zum alternativen Splicing von Exon 1 bis 4, wodurch die durch den Targetingvektor eingeführte β -Galaktosidase- und die

Neomycin-Resistenzkassette, sowie ein Teil der NLS und die Phosphorylierungsstelle Ser27 entfernt werden (Abb. 6b). Mäuse mit der Mutation in *SLY* produzieren ein verkürztes Protein *SLY^d*, dem die Aminosäuren 20-100 fehlen. Durch Western-Blot Analyse mit einem Antiserum gegen *SLY* konnte gezeigt werden, dass das mutierte Protein eine Größe von 45 kDa und das WT Protein eine Größe von 55 kDa hat (4). Diese Deletion konnte auch mittels RT-PCR nachgewiesen werden, bei dem die *Sly*-mRNA von WT Zellen 243 bp mehr als die *Sly*-mRNA von *Sly^{d/d}* Zellen aufweist (Abb. 6c).

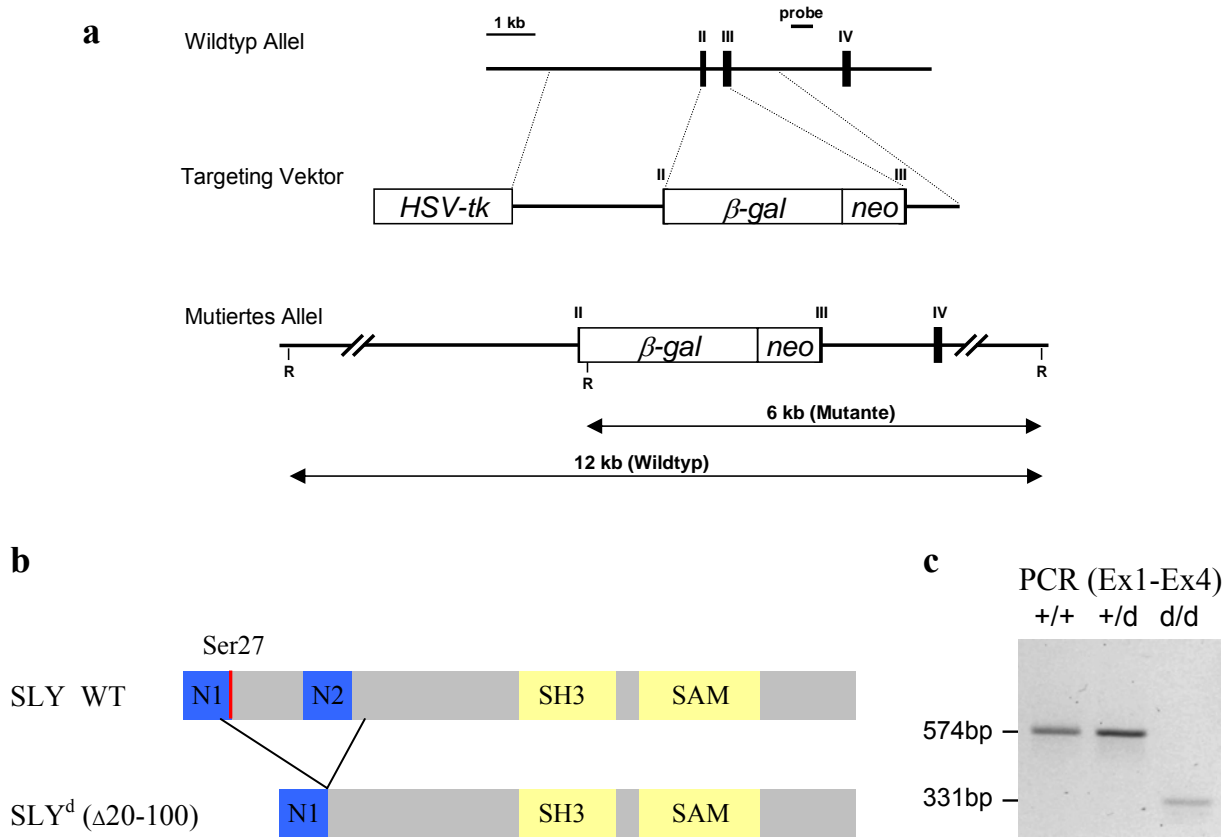


Abb. 6: Generierung der *SLY*-Mutation. a) die Organisation von einem Teil des murinen *Sly* Locus (oben), der linearisierte Targeting Vektor (mitte) und das mutierte Allel (unten). Die β -Galaktosidase c-DNA und die Neomycin-Resistenz Kassetten wurden in Teile von Exon 2 und 3 eingefügt. R=EcoR1-Schnittstellen. b) Schematische Darstellung des WT (oben) und mutierten *SLY* Proteins (unten) mit den funktionellen Domänen. N=NLS. c) Die RT-PCR zeigt das Fehlen von Exon 2 und 3 in *Sly^{d/d}* Zellen. WT *SLY*-Bande 574 bp, *SLY^d*-Bande 331 bp.

Erste Expressionsanalysen zeigten, dass WT *SLY* im Zytoplasma und im Kern von Lymphozyten nachgewiesen werden konnte. Das mutierte Protein dagegen, konnte nur im Zytoplasma detektiert werden. Es gelangt also entweder nicht in den Kern, wird dort abgebaut oder sofort wieder ausgeschleust (4). Die genaue Funktion der Lokalisation von *SLY* in der Zelle und der Mechanismus der Kern/Zytoplasma-Translokation sind bisher noch unbekannt.

A.6.2 Erste Analyse der *Sly^{d/d}* Maus

Erste Analysen der *Sly^{d/d}* Mäuse zeigte, dass sie fertil waren, sich nach den Mendel'schen Gesetzen vermehrten und keine Auffälligkeiten in der Anatomie und dem Verhalten zeigten. Die Gesamtzellzahl von Thymus, Milz, den peripheren Lymphknoten und den Peyer'schen Plaques war in Mäusen mit einer Mutation in SLY im Vergleich zu den Kontrolltieren jedoch signifikant erniedrigt. Im Gegensatz zu den peripheren Lymphknoten, waren die mesenterialen Lymphknoten nicht betroffen, was mit Daten einer unterschiedlichen Entwicklung dieser Organe in Einklang steht (2). Bei immunhistochemischen Untersuchungen der lymphoiden Organe wurden keine Veränderungen im Aufbau der Organe, dem Verhältnis der T- und B-Lymphozyten und der nicht-lymphoiden Zellen sichtbar (4).

Im Weiteren wurde die Funktionalität der T-Zellen überprüft. So zeigten *Sly^{d/d}* Splenozyten im Vergleich zu WT Splenozyten signifikant verringerte Proliferationsraten nach T-Zell Rezeptor Stimulation. Nur durch Zugabe von IL-2 konnte die Proliferation der *Sly^{d/d}* Zellen auf das Niveau der WT Zellen erhöht werden (Abb. 7a).

Nach Stimulation des AGR werden die IL-2 Rezeptoren stärker exprimiert, damit IL-2 auf die T-Zellen wirken kann. Durch FACS-Analyse der IL-2 Rezeptor- α -Kette (CD25) konnte dies auch bei den SLY mutierten T-Zellen nachgewiesen werden (4). Aus diesem Grund wurde die Zytokinproduktion (IL-2, TNF, IL-10, IFN- γ und IL-4) von T-Zellen nach Stimulation mit α CD3 und α CD3/ α CD28 mit Hilfe von ELISAs getestet. Hierbei konnte ein substantieller Defekt von *Sly^{d/d}* Zellen bei der Zytokinsynthese im Vergleich zu WT Zellen detektiert werden. Die Produktion von IL-2 (Abb. 7b), IL4 und IL-10 durch SLY mutierte T-Zellen war fast vollständig unterbunden, während TNF und IFN- γ noch in geringen Mengen freigesetzt wurden. Nach Stimulation mit PMA oder PMA/Ionomycin zeigten sich jedoch keine Unterschiede zwischen WT und *Sly^{d/d}* Zellen, dieser Defekt war somit nur spezifisch nach Stimulation des AGR zu beobachten. Exemplarisch wurde die Produktion von IL-2 in Abbildung 7b dargestellt.

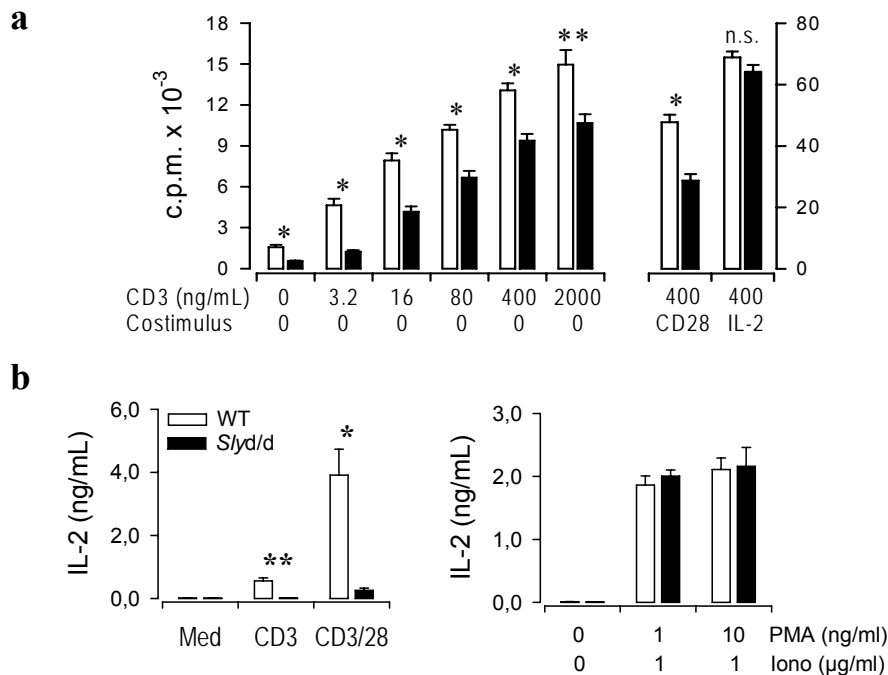


Abb. 7: T-Zell Proliferation und IL-2 Produktion. a) Splenozyten von WT (weiß) und *Sly^{d/d}* Mäusen (schwarz) wurden mit verschiedenen Konzentrationen von α CD3 alleine und α CD3/ α CD28 bzw. α CD3/IL-2 stimuliert. Nach 72h wurde für weitere 16h [³H]Thymidin zugegeben und der Einbau gemessen (n=6). b) Splenozyten wurden für 18h mit α CD3, α CD3/ α CD28 oder PMA/Iono stimuliert und die IL-2-Menge im Überstand mittels ELISA gemessen (n=4) (aus (4)).

Um die Rolle von SLY in der AGR-Stimulation weiter zu untersuchen, wurde der Einfluss der SLY Mutation auf die allogene MLR („mixed lymphocyte reaction“) getestet. Hierbei wurden die Splenozyten aus *Sly^{d/d}* Mäusen und WT Kontrolltieren mit Haplotyp H-2^b mit letal bestrahlten allogenen H-2^d Milzzellen stimuliert und der Thymidineinbau gemessen. Die Effektorzellen der *Sly^{d/d}* Mäuse zeigten eine deutlich reduzierte Antwort auf die Präsentation fremder MHC Moleküle im Vergleich zu den Kontrollzellen. Auch bei der Stimulation durch syngene Kontrollzellen gleichen Haplotyps war die Proliferation der *Sly^{d/d}* T-Zellen signifikant geringer. Diese Unterschiede waren sowohl bei Gesamtmilzzellen, als auch bei aufgereinigten CD4⁺ oder CD8⁺ Effektorzellen sichtbar (4). Dies zeigt, dass sowohl die CD4⁺ als auch die CD8⁺ T-Zellen durch die Mutation in SLY beeinträchtigt sind.

Neben den T-Zell Funktionen wurden auch die B-Zell Funktionen in *Sly^{d/d}* Mäusen untersucht. In *Sly^{d/d}* Mäusen wurde systemisch signifikant weniger IgM und IgG1 im Vergleich zu WT Tieren detektiert. Die basalen Serumspiegel von IgG2a, IgG3 und IgA hingegen waren normal. Durch Injektion von TNP-CGG bzw. TNP-Ficoll wurde die Antikörperproduktion der *Sly^{d/d}* B-Zellen bei T-Zell abhängigen und T-Zell unabhängigen Immunantworten *in vivo* getestet.

Die Analyse der TNP-spezifischen Antikörper im ELISA ergab eine signifikant geringere Menge an IgG1 und IgG2a bei der T-Zell abhängigen Immunantwort (Abb. 8b) und eine stark verminderte IgM und IgG3 Produktion bei der T-Zell unabhängigen Immunantwort in *Sly^{d/d}* Tieren verglichen mit *Sly^{+/+}* Tieren (Abb. 8a).

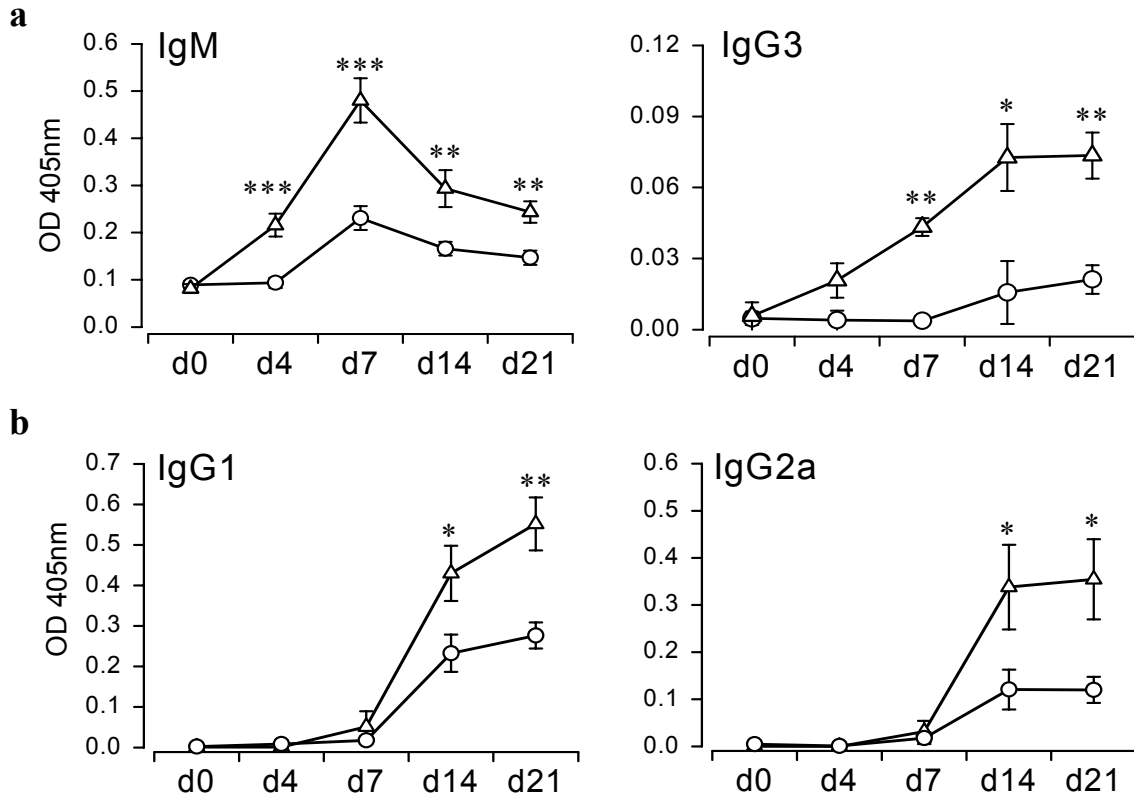


Abb. 8: Humorale Immunantworten. a) TNP-spezifische T-Zell unabhängige IgM und IgG3 Antikörper Spiegel im Serum von WT (Dreiecke) und *Sly^{d/d}* Mäusen (Kreise) nach Immunisierung mit TNP-Ficoll (n=7). b) T-Zell abhängige Produktion von TNP-spezifischem IgG1 und IgG2a nach Immunisierung mit TNP-CGG (n=4 an Tag 4 und 7, n=8 für Tag 0, 14 und 21)(aus (4)).

Diese ersten Ergebnisse verdeutlichen den Einfluss von SLY auf das Immunsystem. Einige lymphoide Organe waren hypoplastisch und die T-Zellen der *Sly^{d/d}* Tiere zeigten eine geringere Proliferationsrate und eine verminderte Zytokinproduktion nach Stimulation des T-Zell Rezeptors. Auch die B-Zellen waren durch die Mutation in SLY beeinträchtigt, was durch die verminderte Antikörperproduktion bei der T-Zell abhängigen und T-Zell unabhängigen Immunantwort zum Ausdruck kam.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Mutation in SLY spezifisch Antigenrezeptor-vermittelte Effektorleistungen von B und T Lymphozyten abschwächt.

A.7 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Phänotyp der *Sly^{d/d}* Mäuse genauer untersucht werden. Durch die ersten Analysen der Maus konnte ein deutlicher Einfluss von SLY auf das Immunsystem gezeigt werden. Die lymphoiden Organe dieser Mäuse zeigten signifikant weniger Zellen. Die genauen Auswirkungen der Mutation in SLY auf die Entwicklung der B- und T-Zellen und ihrer Subpopulationen wurde bisher aber noch nicht untersucht.

Des Weiteren sollte die Signalkaskade, in die SLY eingreift, genauer analysiert werden. Durch Zugabe eines PKC-Inhibitors konnte die Phosphorylierung von SLY nach Stimulation des AGR verhindert werden. Dies deutet auf eine Beteiligung von SLY in der AGR Signalkaskade über PKC hin. Deshalb sollten sowohl frühere als auch spätere Ereignisse im Antigenrezeptor Signalweg auf ihre Veränderung durch die Mutation in SLY überprüft werden.

Außerdem sollten sowohl die T- als auch B-Zell Funktionen von *Sly^{d/d}* Mäusen untersucht werden. Bei den T-Zellen wurde im Vorfeld eine verminderte Proliferation nach AGR Stimulation beobachtet. Mögliche Ursachen dafür, wie eine erhöhte Apoptoserate, sollten dazu analysiert werden. Ebenso sollte die Funktion der zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen überprüft werden.

Neben den T-Zellen sollten auch die B-Zellen in *Sly^{d/d}* Mäusen genauer betrachtet werden. Die verminderte Antikörperproduktion bei der T-Zell abhängigen und T-Zell unabhängigen Immunantwort zeigte einen Einfluss von SLY auf die Funktionalität der B-Zellen, doch sollte dies in verschiedenen B-Zell-Populationen noch genauer untersucht werden.

Zur besseren *in vivo* Analyse der T-Zell Funktionen sollten außerdem die Auswirkungen der SLY Mutation auf den Verlauf einer Graft-versus-Host Reaktion untersucht werden.

Durch diese Analyse der *Sly^{d/d}* Maus sollten die Auswirkungen einer Mutation in SLY genau definiert werden und somit die Rolle von SLY im Immunsystem näher geklärt werden.

B MATERIAL UND METHODEN

B.1 Bezugsquellennachweis

B.1.1 Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquellen
Acrylamidlösung (30% Acrylamid; 0,8% N,N' Methylbisacrylamid)	National Diagnostics, Atlanta, USA
Agarose (Ultrapure)	Invitrogen, Karlsruhe
AnnexinV-FITC	BD PharMingen, San Diego, USA
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Biorad, München
β -Mercaptoethanol (98%)	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma, Taufkirchen
Chloroform	Merck, Darmstadt
CpG 1668	MWG Biotech, Ebersberg
CFSE (Carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester)	Molecular Probes (Invitrogen), Karlsruhe
dNTP's	Eurogentec, Belgien
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Taufkirchen
Dithiothreitol (DTT)	Fermentas, St. Leon-Rot
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Taufkirchen
Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
Formaldehyd (37% ige Lösung)	Sigma, Taufkirchen
Formamid	Sigma, Taufkirchen
Fluo-4	Molecular Probes (Invitrogen), Karlsruhe
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Glyzerol	Sigma, Taufkirchen
H 33342 (Bispenzimid)	Calbiochem, Bad Soden
HBSS	Sigma, Taufkirchen
HEPES	Sigma, Taufkirchen
Interleukin-2 (human, rekombinant)	Eurocetus, Amsterdam, Niederlande
Ionomycin	Sigma, Taufkirchen
Magermilchpulver	Fluka, Ulm
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Marker 1 kb DNA-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
2-Methylbutan	Sigma, Taufkirchen
Mineralöl	Sigma, Taufkirchen
Natriumacetat (Trihydrat)	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, Taufkirchen

Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich, Seelze
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Seelze
Nucleotidmix (dCTP, dATP, dGTP, dTTP jeweils 200 µM)	Invitrogen, Karlsruhe
NP-40 (Igepal)	MP Biomedicals, Eschwege
Orange G	Sigma, Taufkirchen
Ovalbumin	Sigma-Aldrich, Seelze
Paraformaldehyd	Sigma, Taufkirchen
Fibronektin	Roche, Mannheim
VCAM-1/Fc Chimera (rekombinant Maus)	R&D Systems, Minneapolis, USA
ICAM-2/Fc Chimera (rekombinant Maus)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer	Invitrogen, Karlsruhe
Staurosporine	BD PharMingen, San Diego, USA
Sorbitol	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Biochrom, Berlin
Phenol Rotipuran®	Roth, Karlsruhe
Phosphate buffered saline (PBS)	Biochrom, Berlin
Pluronic F-127	Molecular Probes (Invitrogen), Karlsruhe
PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetat)	Sigma, Taufkirchen
Pneumokokken Polysaccharide 4, 6B und 19F	LGC Promochem, Wesel
Pneumokokken C-Polysaccharide	Statens Serum Institut, Kopenhagen, Dänemark
Protease Inhibitor Complete Mini	Roche, Mannheim
Random Primers	Invitrogen, Karlsruhe
Reaktionspuffer für PCR	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium ohne Phenolrot	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe
RPMI 1640 Medium	Biochrom, Berlin
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Sigma, Taufkirchen
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Roth, Karlsruhe
Streptavidin	BD Pharmingen, San Diego, USA
SIINFEKL (OVA Peptid 257-264)	Research Genetics, Huntsville, AL
Staphylococcus Enterotoxin B (SEB)	Toxin Technology, Serosota, USA
Substrat für ELISA (TMB)	Biosource, Camarillo, USA
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Roth, Karlsruhe
TEMED (N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin)	Invitrogen, Karlsruhe
Tween20	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma, Taufkirchen

B.1.2 Radiochemikalien

[Methyl-³H] Thymidin, spezifische Aktivität 5.0 Ci/mmol, $T_{1/2} = 13,3$ Jahre

⁵¹Cr als Na₂⁵¹CrO₄, spezifische Aktivität 35 mCi/ml, $T_{1/2} = 27,7$ Tage

Die Reagenzien wurden von der Firma Amersham (Braunschweig) bezogen und vor Ablauf der ersten Halbwertszeit eingesetzt.

B.1.3 Enzyme

Enzyme	Bezugsquellen
Expand High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim
Proteinase K	Sigma, Taufkirchen
RNAsin	Invitrogen, Karlsruhe
Superscript II Plus Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Taq DNA Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot

B.1.4 Verbrauchsmaterial und Sonstiges

Verbrauchsmaterialien	Bezugsquellen
3MM Whatman Filterpapier	GLW, Würzburg
ELISA Platten	Maxisorp, Nunc, Karlsruhe
Hyperfilm (Röntgenfilme)	Amersham, Braunschweig
Immunoassay KIT (p38 MAPK Total und pTpY180/182)	Biosource, Nivelles, Belgien
Magic Mark (Proteingrößenstandard)	Invitrogen, Karlsruhe
Mouse IgM ELISA Quantitation Kit	Bethyl, Montgomery, USA
MACS immunomagnetische Beads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MicroAmp [®] Optical Tubes	Applied Biosystems, Foster City, USA
MicroAmp [®] Optical Caps	Applied Biosystems, Foster City, USA
Plastikwaren	Falcon, New Jersey, USA
	Nunc, Naperville, USA
	Corning, New York, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNA-Größenstandard	Promega, Madison, USA
Neubauer-Zählkammer	Brand, Berlin
Spritzen	BD Pharmingen, San Diego, USA
Protran [®] Nitrocellulose Transfer Membran	Whatman [®] , Schleicher & Schuell, Dassel
Kanülen	B. Braun, Melsungen
Smart Ladder (DNA Größenstandard)	Eurogentec, Belgien
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
Luziferase-ECL Lösung 1 und 2	Amersham, Braunschweig

B.1.5 Geräte

Geräte	Bezugsquellen
β-Counter	Matrix TM 96, Packard, USA
Brutschrank	BB6220CU/CO ₂ , Kendro Laboratory Products GmbH, München
Durchflußzytometer (Fluorescence-activated cell-sorter (FACS))	BD FACS Calibur, BD, Heidelberg
Elektrophoresekammer für Agarosegele	Fischer Scientific, Ingolstadt
Elektrophoresekammer für Polyacrylamidgele	Biometra, Göttingen
ELISA-Reader	Mithras LB940, Berthold
γ-Counter	Cobra [®] Auto Gamma Reader, Packard, USA
Kühlzentrifugen	Biofuge 28RS, Heraeus, Hanau; Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg
Mikroskop	Zeiss ID03, Zeiss, Jena
MoFlo	Cytomation, 3 Laser, Dako, Hamburg
Nukleinsäuredetektion	Gel Doc 1000, Biorad, München
pH-Meter	Inolab pH Level 1, WTW, Weilheim
Photometer	Spectronic Genesys5, Spectronic Instruments
Proteintransfer	Transblot SD, Biorad, München
Reinstwasseranlage	Millipore, Eschborn
Rotationsrad	Mixing Rotor, Renner, Darmstadt
Schüttler	Celloshaker Variospeed, Cemetron Products, Biotec, Fischer
Sterilbank	Herasafe, Kendro Laboratory Products GmbH, München
Power Pack P25 (Stromquellen)	Biometra, Göttingen
Thermocycler	T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen; GeneAmp PCR System 9700; PE Applied Biosystems, Foster City, USA
Thermocycler für TaqMan	ABI Prism TM 7700 Sequence Detector
Tischzentrifugen	Picofuge, Heraeus, Hanau; Megafuge 2.0.R , Heraeus, Hanau
Ultrazentrifuge	L8-70M Beckmann, München (Rotor SW 41)
Waage	Sartorius, Göttingen
Wasserbäder	Köttermann Labor Technik
Zell-Harvester	Micro 96 Harvester, Skatron Instruments, UK

B.2 Medien und Puffer

B.2.1 Stammlösungen und Puffer

DEPC-H ₂ O	0,1% DEPC in H ₂ O _{dd} 12-24 h rühren und danach, zum Inaktivieren des nicht gebundenen DEPC, autoklavieren
6x DNA-Auftragspuffer	1 ml 10x TAE 1 ml Orange G (10 mg/ml) 5 ml Glyzerol 3 ml H ₂ O _{dd}
Erythrozyten-Lysepuffer	155 mM NH ₄ Cl 10% Tris-HCl, pH 7,65
Fluo-4 Färbelösung	50 µg Fluo-4 9 µl DMSO 10% Pluronic
RNA-Auftragspuffer	160 µl 10x RNA-Laufpuffer 80 µl Bromphenolblau (gesättigte Lösung) 720 µl Formamid 720 µl Formaldehyd 160 µl Glyzerol 120 µl H ₂ O _{dd}
10x RNA Laufpuffer	400 mM Natriumacetat, pH 4,8 20 mM EDTA, pH 8,0
50x TAE	2 M Tris, pH 8 0,5 M Eisessig 50 mM EDTA
10x TBST	500 mM NaCl 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 0,05% Tween20

Material und Methoden

Transblot	48 mM Tris-HCl, pH 7,5 0,004% SDS 39 mM Glycin 20% Methanol
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 M EDTA, pH 8,0
2x SDS-Probenpuffer	5% Bromphenolblau 30% Saccharose 2% SDS 80 mM Tris-HCl, pH 6,8
TNE	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 100 mM NaCl 1 mM EDTA, pH 8,0
Verdaulösung	500 µl TNE 50 µl SDS 10% 7,5 µl Proteinase K (10mg/ml)
Zellysepuffer	Stock: 1% NP-40 1% Triton-X-100 150 mM NaCl 50 mM Tris, pH 7,4 1 mM EDTA frisch zugeben: 10 mM NaF 1 mM Na-Orthovanadat, pH 10 Protease Inhibitor Complete Mini: 1 Tablette in 1 ml PBS auflösen, 1:10 einsetzen

B.2.2 Medien für die Zellkultur

Lymphozyten, EL-4	RPMI 1640 10% FKS 2 mM L-Glutamin 0.1 mM β -Mercaptoethanol
Ca ²⁺ -Messungen	RPMI 1640 ohne Phenolrot 25 mM HEPES
Einfriermedium	90% FKS 10% DMSO

B.3 Versuchstiere und Zelllinien

B.3.1 Versuchstiere

Alle Mäuse wurden im spezifisch pathogenfreien Bereich (SPF) im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München gezüchtet und gehalten.

Mausstämme	Alter	Bezugsquellen
C57BL/6	8-10 Wochen	Harlan-Winkelmann, Borcheln
BDF1 (C57BL/6 x DBA/2J)	8-10 Wochen	Charles River, Wilmington, USA
B6.SJL - Ptpcr<a> Pep3/BoyJ (CD45.1)	8-10 Wochen	Charles River, Wilmington, USA
B6B2(B6) – Tg (TcrHY)	8-10 Wochen	Charles River, Wilmington, USA
<i>Sly^{d/d}</i>	6-10 Wochen	Eigene Zucht

B.3.2 Zelllinien

Zelllinien	Eigenschaften	Referenz
Lymphozyten	primäre Milz- /Lymphknotenzellen, kultiviert nach Organhomogenisierung	
EL-4	Murine T Zell Lymphom Zelllinie (C57BL/6)	ATCC Nummer TIB-39

B.4 Antikörper und Primer

B.4.1 Antikörper

Antikörper	Klon/Spezies	Verwendung
Anti-Maus B220-PE	RA3-6B2/Ratte	FACS
Anti-Maus CCR7-PE	4B12/Ratte	FACS
Anti-Maus CD3 ϵ	145-2C11/arm. Hamster	Stimulation
Anti-Maus CD3 ϵ -biotin	145-2C11/arm. Hamster	Stimulation
Anti-Maus CD4-FITC	RM4-5/Ratte	FACS
Anti-Maus CD4-PE	GK1.5/Ratte	FACS
Anti-Maus CD4-PE-Cy5.5	RM4-5/Ratte	FACS
Anti-Maus CD8 α -APC	53-6.7/Ratte	FACS
Anti-Maus CD8 α -FITC	53-6.7/Ratte	FACS
Anti-Maus CD11a-biotin (α L)	2D7/Ratte	FACS
Anti-Maus CD11c-FITC	HL3/arm. Hamster	FACS
Anti-Maus CD21/CD35-FITC	7G6/Ratte	FACS
Anti-Maus CD25-FITC	7D4/Ratte	FACS
Anti-Maus CD25-PE	3C7/Ratte	FACS
Anti-Maus CD28	37.51/syr. Hamster	Stimulation
Anti-Maus CD29-PE (β 1)	6A267/Hamster	FACS
Anti-Maus CD40	3/23/Ratte	Stimulation
Anti-Maus CD44-PE	IM7/Ratte	FACS
Anti-Maus CD45-PE	30-F11/Ratte	FACS
Anti-Maus CD45.1-biotin	A20/Maus	FACS
Anti-Maus CD45.2-biotin	104/Maus	FACS
Anti-Maus CD49d-PE (α 4)	9C10/Ratte	FACS
Anti-Maus CD69-PE	H1.2F3/arm. Hamster	FACS
Anti-Maus CXCR4-PE	2B11/Ratte	FACS
Anti-Maus CXCR5-PE	2G8/Ratte	FACS
Anti-Maus HY-TCR-biotin	T3.70/Maus	FACS
Anti-Maus IgD-PE	11-26/Ratte	FACS
Anti-Maus IgM	LO-MM/Ratte	Stimulation
Anti-Maus IgM-APC	II/41/Ratte	FACS
Anti-Maus IgM-FITC	Ziege	FACS
Anti-Maus V β 8 TCR-biotin	F23.1/Maus	FACS
Streptavidin-PE		FACS

Alle Antikörper wurden von BD Pharmingen (San Diego, USA), Caltag (Burlingame, USA), Natutec (Frankfurt) oder Jackson ImmunoResearch (Cambridgeshire, UK) bezogen.

B.4.2 Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden alle von der Firma Metabion, München synthetisiert.

Screening/for: 5'-GAT CCA TGC CAG CGT TAC CA-3'

Screening/rev: 5'-AGT CAT AGC TCT CCA TCA GC-3'

Neo/for: 5'-TCG CCT TCT ATC GCC TTC TTG-3'

TCR-HY/for: 5'-GAG CCT CCA GTT TCT CCT CA-3'

TCR-HY/rev: 5'-AAA GAT GAG CTT CGC AGA CC-3'

Primer für die Real-Time PCR:

β-Aktin/for: 5'-AGC CAA GTC CAG ACG CAG G-3'

β-Aktin/rev: 5'-ACC CAC ACT GTG CCC ATC TAC-3'

Sly/for: 5'-GAG GCC CAA GCC CAA GAC TCT-3'

Sly/rev: 5'-GCA GTA GGG TGG ATG TGT GTT CCT-3'

B.5 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

B.5.1 Isolierung von chromosomaler DNA

Aus Proteinase-verdauten Mausschwanzproben wurde die genomische DNA nach Abtrennung von Proteinen und Festbestandteilen direkt durch "Ausspinnen" gewonnen.

Die Schwanzproben wurden ü.N. in Verdauungslösung bei 56°C inkubiert. Das Lysat wurde 3 min bei 15000 UpM abzentrifugiert und der Überstand in ein neues ERG überführt. Die Proteine wurden mit einem Volumen Phenol/Chloroform extrahiert. Nach Abnahme der wässrigen Phase wurde der DNA zweifaches Volumen absoluten Alkohols zugegeben und das ERG wurde mehrmals geschwenkt. Anschließend wurde die DNA mit der Pipettenspitze ausgesponnen, in 70% EtOH gewaschen und in 200 µl TE-Puffer bei 37°C für ca. 1h gelöst. Gelöste chromosomale DNA wird bei 4°C gelagert.

B.5.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR (60) können definierte DNA-Abschnitte mittels spezifischer Oligonukleotide, genannt Primer, amplifiziert werden.

Nach Hitzedenaturierung der doppelsträngigen DNA erfolgt die Anlagerung (*annealing*) der Primer an die einzelsträngige DNA. Dieser kurze Doppelstrang wird durch eine spezielle hitzestabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) verlängert, wobei aus

einem Doppelstrang zwei neue synthetisiert werden. Bei zyklischer Wiederholung von Hitzedenaturierung, Primerhybridisierung und Primerverlängerung kann der jeweilige DNA-Abschnitt exponentiell vervielfältigt werden.

In einem 50 µl-Ansatz wurden 100-150 ng DNA, 5 µl 10x Reaktionspuffer, 2,5 µl Nukleotidgemisch (je 200 µM aller vier Desoxynukleotide), jeweils 100 pmol der Primer und 0,5µl Taq-Polymerase (2,5 U) gemischt und mit H₂O_{dd} auf 50 µl aufgefüllt. Bei Verwendung eines Reaktionspuffers ohne MgCl₂ wurden noch 2-3 mM MgCl₂ hinzugefügt. Zum Schutz vor Verdunstung wurde der Ansatz mit 50 µl Mineralöl überschichtet.

Ein Reaktionszyklus umfaßte im allgemeinen die Denaturierung der DNA bei 95°C für 60 Sekunden. Darauf folgte die Anlagerung der Primer für ebenfalls 60 Sekunden, wobei die Temperatur einige Grad unter der Schmelztemperatur der Primer gehalten wurde. Daran schloß sich die Reaktionszeit der Polymerase (*extension*) für 60 Sekunden bei 72°C an. Dieser Zyklus wurde in der Regel 30 mal wiederholt. Nach dem letzten Zyklus blieb das Reaktionsgemisch für 10 Minuten auf 72°C zur vollständigen Primerverlängerung. Anschliessend wurde auf 4°C herunter gekühlt, um das Reaktionsprodukt bis zur Weiterverarbeitung zu lagern.

B.5.3 Isolierung von gesamtzellulärer RNA

Für die Arbeiten mit RNA wurden ausschließlich RNase-freie Lösungen, Pipettenspitzen und Geräte verwendet. Die Geräte wurden vor Gebrauch mit einer 3%-igen H₂O₂-Lösung oder mit einer 1N NaOH-Lösung behandelt, um eventuell vorhandene RNasen zu denaturieren.

RNA aus Zellen wurde mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit gewonnen. Dazu wurden die Zellpellets in 350 µl (<5x10⁶) bzw. 600 µl (<1x10⁷) RLT Puffer mit β-ME lysiert und anschließend mindestens 4-mal durch eine 20G-Kanüle gepresst, um die genomische DNA zu scheren. Die Zelllysate und 350 µl bzw. 600 µl 70% Ethanol wurden auf RNeasy mini columns (Säulchen) gegeben und für 15 s bei 13.000 UPM zentrifugiert, so dass die RNA an die Säulchen binden kann. Nach mehrmaligem Waschen mit RW1 und RPE Puffer, wurde die RNA mit 40 µl RNase freiem Wasser eluiert. Die RNA-Konzentration wurde durch eine OD₂₆₀-Bestimmung ermittelt (OD=1 entspricht RNA= 40 µg/ml).

B.5.4 cDNA-Synthese aus mRNA (Reverse Transkription)

Die Reverse Transkription dient der Umschreibung von mRNA in komplementäre DNA (cDNA). Dieses Verfahren beruht auf den aus der Replikation von Retroviren gewonnenen Erkenntnissen (19, 25, 35). Für die cDNA-Synthese wurden 2 µg RNA in einem Volumen von 8 µl eingesetzt. Als Primer dienten synthetische Oligonukleotide, die sich an den poly-A-Schwanz der mRNA anlagern. In einem ersten Schritt wurde die mRNA mit jeweils 1 µl 10 µM Oligo(dT)₁₂₋₁₈ und „random hexamer“-Primer für 10 min auf 70°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt, um Sekundärstrukturen in der RNA aufzulösen. Nach Zugabe

von 4 µl 5x Transkriptionspuffer, 2 µl 0,1 M DTT, 2 µl dNTP-Mix (200 µM), 0,5 µl RNasin und 1 µl Superscript II Plus (200 E/µl) wurde die mRNA während einer Inkubation bei 37°C in cDNA umgeschrieben. Die Reaktion wurde nach einer Stunde durch Denaturierung des Enzyms gestoppt, indem der Ansatz für fünf Minuten auf 95°C erhitzt wurde.

Die so erhaltene cDNA wurde als Template für RT-PCRs (s. B.5.5) eingesetzt.

B.5.5 Real-Time PCR mittels TaqMan

Mit Hilfe der TaqMan RT-PCR erhält man über die Menge der gebildeten cDNA eine direkte quantitative Aussage über die im Ausgangsmaterial vorhandene Menge an mRNA. Zur Durchführung der RT-PCRs wurde das SYBR[®] Green System verwendet, bei dem es sich um einen DNA interkalierenden Farbstoff handelt. Durch dessen Bindung in die „minor groove“ der doppelsträngigen DNA wird die emittierte Fluoreszenz bei gleicher Anregungsintensität um ein vielfaches verstärkt und man erhält ein Signal, dessen Intensität direkt proportional zur Zahl der vorhandenen Doppelstränge ist. Nach einer bestimmten Zyklenzahl wird Fluoreszenz messbar (Ct). Dieses Signal ist direkt proportional zur Menge an gebildeter DNA und steigt wie auch die DNA-Menge exponentiell bis zum Erreichen eines Maximums an. Korreliert man nun den logarithmischen Anstieg mit dem entsprechenden Zyklus und setzt dies ins Verhältnis zu einem „Housekeeping“-Gen wie β-Aktin, erhält man eine quantitative Aussage. Die PCR wurde auf dem ABI Prism[™] 7700 Sequence Detector durchgeführt und mit Hilfe des Programms Sequence Detector v.1.6.3 ausgewertet.

B.6 Proteinanalytische Methoden

B.6.1 Aufbereitung der Proben

Zur Western Blot Analyse wurden pro Spur 1-5x10⁶ Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden zunächst in 25 µl Zellysepuffer bei 4°C 15 Minuten lysiert. Dann wurden die Zellmembranen, Zytoskelettbestandteile und Nuklei bei 14 000 Upm für 10 Minuten abzentrifugiert, wobei die Proteine in Lösung verblieben. Der Überstand wurde mit 15 µl 2x SDS Probenpuffer/β-Mercaptoethanol versetzt und 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht, um die Proteine zu denaturieren.

B.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht (37).

Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) zerstört fast alle nicht-kovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen. β-Mercaptoethanol, das im Laemmli-Auftragspuffer enthalten ist, reduziert Disulfidbrücken. Die negativ geladenen SDS-Moleküle lagern sich an

die Hauptkette der Proteine an und kompensieren so Ladungsdifferenzen zwischen unterschiedlichen Proteinen. Die Auftrennung im Polyacrylamid erfolgt daher hauptsächlich aufgrund der Masse der Proteine. Um eine optimale Auftrennung der Proteine im Gel zu erhalten, kann die Porengröße des Gels variiert werden. Die Porengröße wird bei der Polymerisation durch das Verhältnis Acrylamid/Bisacrylamid bestimmt. Die in den Vorschriften angegebenen Gelkonzentrationen beziehen sich auf die Acrylamid-Konzentration im Gel. Im Laemmli-System werden die Proteinproben zunächst im Sammelgel konzentriert und wandern dann ins Trenngel ein.

Zunächst wurde das Trenngel gegossen und nach Polymerisation mit dem Sammelgel überschichtet, in das sofort der Probenkamm eingesetzt wurde. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde der Kamm entfernt und die Platten in die Elektrophoresekammer eingespannt. Die Kammer wurde mit Laufpuffer gefüllt. Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer mit β -Mercaptoethanol fünf Minuten aufgeköcht, kurz abzentrifugiert und in die Taschen des Gels aufgetragen. Parallel wurde ein Molekulargewichtsmarker zur späteren Größenbestimmung der Proteinbanden aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 30 mA bis das Bromphenolblau des Probenpuffers die untere Grenze des Gels erreicht hatte.

Sammelgel (3%)	0,5 ml	Acrylamidlösung (30%/0,8%)
	1,2 ml	0,5 M Tris/HCl pH 6,8
	50 μ l	10% SDS
	3,3 ml	H ₂ O
	50 μ l	10% APS
	2,5 μ l	TEMED
Trenngel (10%)	6,7 ml	Acrylamidlösung (30%/0,8%)
	5 ml	0,5 M Tris/HCl pH 8,8
	230 μ l	10% SDS
	8 ml	H ₂ O
	11,4 μ l	10% APS
	2,5 μ l	TEMED

B.6.3 Western-Blot (Immunoblot)

Der Western-Blot dient dem Nachweis von Proteinen mit Hilfe spezifischer Antikörper.

Im Anschluss an eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (vgl. B.6.2) wurde zunächst ein Elektro-Trockenblot mit einer „Semidry-Blotapparatur“ durchgeführt, um die Proteine auf eine Protranmembran zu überführen. Dazu wurden sechs Filter in Transblot getränkt und blasenfrei auf die Anode gelegt. Darauf folgte die, mit Transblot befeuchtete Protranmembran (Nitrocellulose), sowie das ebenfalls befeuchtete Gel. Den Abschluss bildeten sechs Filter,

wiederum mit Transblot getränkt. Dann wurde die Kathode aufgesetzt, und die Proteine wurden für 1 Stunde bei 2 mA/cm^2 auf die Membran geblottet.

Für die Western Blot-Analyse wurde die Nitrocellulosemembran für 1 Stunde bei Raumtemperatur in 5% Magermilchpulver in TBST geblockt. Danach wurde die Membran mit dem ersten Antikörper in 3% Magermilchpulver in TBST 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Darauf folgten drei Waschschriffe von jeweils 10 Minuten mit TBS bzw. TBST. Der zweite Antikörper, an Peroxidase gekoppelt, wurde ebenfalls in 3 % Magermilchpulver in TBST unter leichtem Schütteln für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurde nochmals dreimal für 10 Minuten mit TBST gewaschen.

Die Detektion des spezifisch gebundenen Antikörpers erfolgte mit Hilfe des Luziferase-ECL-Systems. Die Detektionslösungen eins und zwei ($0,125 \text{ ml/cm}^2$ Membran) wurden zu gleichen Teilen gemischt. Die Membran wurde für eine Minute inkubiert und anschließend zwischen eine Plastikfolie gelegt. Die spezifischen Signale wurden mittels Röntgenfilm detektiert.

B.7 Zellkultur

B.7.1 Kultivierung von EL-4 Zellen

Alle Zellkulturarbeiten wurden in Sterilbänken durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte in Brutschränken bei 37°C , 7% CO_2 und wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Die Zellen wurden regelmäßig mit frischem Medium versorgt und spätestens bei Erreichen der Konfluenz passagiert.

B.7.2 Organhomogenisierung

Nach Entnahme (B.8.1) wurden die Organe in Medium mit Hilfe eines $70 \mu\text{m}$ Zellsiebs homogenisiert. Um die Zellsuspension von Erythrozyten zu befreien, wurde nach Zentrifugation (1500 UpM für 3 min) das Zellpellet in 3 ml Erythrozyten-Lysepuffer aufgenommen und für 3 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 7 ml Medium gestoppt und die verbleibenden Leukozyten durch Zentrifugation und gegebenenfalls nochmaliges Sieben von Zellresten abgetrennt. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde mit Trypanblau gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Tote Zellen sind anhand ihrer Blaufärbung von vitalen Zellen zu unterscheiden und werden nicht mitgezählt.

B.7.3 Kultivierung von Lymphozyten

Nach der Organhomogenisierung (B.7.2) wurden die Zellen in einer U-Boden 96-well Platte in $200 \mu\text{l}$ Medium kultiviert und stimuliert. Pro Vertiefung wurden $2\text{-}5 \times 10^5$ Zellen eingesetzt.

B.7.4 Einfrieren und Auftauen von EL-4 Zellen

Zur langfristigen Lagerung wurden EL-4 Zellen bei -196°C in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden die EL-4 Zellen einer gut bewachsenen 10 cm Platte in 1ml Einfriermedium aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Dann wurden die Röhrchen 30 Minuten bei -20°C und 24h bei -80°C gelagert, ehe sie in Tanks mit flüssigem Stickstoff überführt wurden.

Für das Auftauen der Zellen wurde der Inhalt der Röhrchen mit 1 ml warmen Medium aufgenommen und in einer 10 cm Zellkulturschale mit 10 ml äquilibriertem Medium ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

B.8 Tierversuche

B.8.1 Organentnahme

Zur Entnahme von Organen oder Zellen aus Mäusen, wurden diese durch Genickbruch schmerzfrei getötet und die jeweiligen Organe nach Desinfektion des Operationsgebietes mit 70% EtOH steril entnommen.

B.8.2 Spülung des Peritoneums

In der Peritonealhöhle befinden sich verschiedene Zellpopulationen und Antikörper. Um diese zu analysieren, spült man das Peritoneum nach Tötung des Tieres mit 10 ml PBS mit einer 20G-Kanüle. Nachdem die Peritonealhöhle 2-3-mal gespült wurde, wird die Flüssigkeit wieder aufgenommen. Für die Analyse der Zellpopulationen wurde die Lösung abzentrifugiert und das Zellpellet verwendet. Der Überstand wird zur Bestimmung der Antikörpermenge direkt im ELISA eingesetzt.

B.8.3 Immunisierung von Mäusen

B.8.3.1 Immunisierung für Chrom-Assay

Um die zytotoxische CD8 T Zell Funktion in einem Chrom-Assay zu testen, wurde den Mäusen in beide hinteren Füße subkutan je 50 μl Immunisierungslösung injiziert. Diese enthielt 150 μg Ovalbumin und als Adjuvans 5 nmol des Oligonukleotids CpG 1668 (5' – TCCATGACGTTCCCTGATGCT – 3'). Vier Tage nach Injektion wurden die poplietalen und inguinalen Lymphknoten isoliert und die daraus gewonnen Zellen mit 10 U/ml IL-2 für weitere 4 Tage inkubiert. Die Durchführung des ^{51}Cr -Zytotoxizitätstests ist unter B.9.6 beschrieben.

B.8.3.2 Immunisierung für T-Zell unabhängige Immunantwort

Für die Analyse der T-Zell unabhängigen Immunantwort wurde den Mäusen 1 µg Pneumovax in 200 µl PBS intraperitoneal injiziert. Pneumovax ist ein Gemisch aus 23 Kapselpolysacchariden von *Streptococcus pneumoniae* und führt zu einer T-Zell unabhängigen Antikörperproduktion gegen diese pneumokokkale Polysaccharide (pPS). Die Produktion der spezifischen Antikörper wurde mittels ELISA nachgewiesen. (B.9.7.1)

B.8.4 Generierung von *Sly*^{d/d} Mäusen mit HY spezifischem TCR

Zur detaillierten Untersuchung der positiven und negativen Selektion im Thymus, wurden *Sly*^{d/d} Mäuse mit transgenen Mäusen gekreuzt, die einen TCR exprimieren, der spezifisch für das männliche Antigen HY ist (B6B2(B6) – Tg (TcrHY)).

Nach der Typisierung wurden *Sly*^{+/+}TCR-HY und *Sly*^{d/d}TCR-HY Mäusen im Alter von 6 Wochen der Thymus entnommen und mittels FACS-Analyse untersucht.

B.8.5 Generierung von Knochenmarks-Chimären Mäusen

Zur Generierung von Knochenmarks-Chimären Mäusen wurden die Empfängermause mit 6 Gy letal bestrahlt. 24 Stunden später wurden ihnen intravenös 1×10^7 Spenderknochenmarkszellen injiziert. 4 Wochen danach wurden die Organe der Chimären Mäuse mittels FACS-Analyse untersucht.

Zur Unterscheidung der Spender- von den Empfängerzellen, wurden CD45.1 Mäuse gewählt, die sich von den C57BL/6 WT Tieren und den *Sly*^{d/d} Mäusen unterscheiden (CD45.2). Die CD45.1 Mäuse wurden sowohl als Spender- als auch als Empfängertiere gewählt um den Knochenmarkstransfer in beide Richtungen zu analysieren.

B.8.6 Akute Graft-versus-Host-Disease

Die akute Graft-versus-Host-Disease (aGVHD) stellt eine spezielle Situation in der Transplantationsimmunologie dar, bei der die Lymphozyten des Spenders aus dem Transplantat (Graft) mit Alloantigenen des Empfängers (Host) reagieren. Die T-Zellen des Spenders werden durch Antigenpräsentierende Zellen des Empfängers aktiviert, erkennen die Zellen des Empfängerorganismus als fremd und verursachen ein systemisches Krankheitsbild mit spezifischer Einbeziehung von Haut, Leber und Darm (18).

Zur Induktion der aGVHD wurden nach subletaler Bestrahlung (6 Gy) der BDF1-Empfängermause (H-2^{bxd}) 5×10^7 bzw. 2×10^7 Milzzellen aus WT oder *Sly*^{d/d} Mäusen (beide H-2^b) intravenös injiziert. Als syngene Kontrolle diente die Injektion von F1 Milzzellen. Bei den Mäusen wurden dann Überleben, Gewicht und Organschäden analysiert (67).

B.9 Immunologische und zellbiologische Methoden

B.9.1 Adhäsionsassay

Um die Adhäsion von Zellen an gereinigten Proteinliganden zu untersuchen, wurden aus der Milz T-Zellen mit Miltenyi MACS Beads aufgereinigt. Dazu wurden B220-, CD11b- und CD11c-MicroBeads zu der Einzelzellsuspension gegeben und die unmarkierten T-Zellen laut Anweisung aufgereinigt. $3-4 \times 10^6$ Zellen/Vertiefung wurden in 2 ml Medium in einer 24-well Platte für 72 h mit 20 ng PMA/2 μg Ionomycin stimuliert. Danach wurden die Zellen einmal gewaschen, erneut gezählt und in 2 ml Medium mit 20 ng IL-2 für weitere 48 h kultiviert.

Für den Assay wurde eine 96-well ELISA Platte bei 4°C über Nacht mit gereinigtem ICAM-2 (1,5 μg /Loch in 100 μl PBS), VCAM-1 (0,8 μg /Loch in 100 μl PBS), Fibronektin (1 μg /Loch in 100 μl 50mM Natrium-Carbonat) und zur Kontrolle mit gereinigtem Fc (0,5 μg /Loch in 100 μl PBS) beschichtet. Letzteres wurde zuvor mit ICAM-1 und VCAM-1 zu deren Expression und Aufreinigung fusioniert (63). Die Platten wurden gewaschen und 1h bei 37°C mit HBSS-Puffer plus 1% BSA blockiert. In der Zwischenzeit wurde die für eine Konzentration von ca. 2×10^6 T-Zellen/ml benötigte Zellzahl abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und in 2 ml HBSS-Puffer resuspendiert. Hierzu wurden 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ H33342 Fluoreszenz-farbstoff gegeben und die Zellen 30 Minuten bei 37°C gefärbt. Danach wurden die Zellen zweimal mit HBSS gewaschen und in einer Konzentration von $2 \times 10^6/\text{ml}$ in HBSS aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit 5 mM Mg^{2+} oder 5 mM $\text{Mg}^{2+}/2 \mu\text{g}/\text{ml}$ αCD3 für 30 min bei 37°C stimuliert. Pro Loch wurden je 100 μl Zellen auf die beschichtete ELISA Platte gegeben. Die Platten wurden 10 min bei 10g zentrifugiert und anschließend in einem Biolumineszenzgerät vermessen (100% Wert). Nach 30 min Inkubation im Brutschrank wurden die Platten in einer mit PBS befüllten Wanne untergetaucht und mit einer Folie abgeklebt. Danach wurden die Platten mit der Oberseite nach unten 10 min bei 50g zentrifugiert. Indem man die Plattenöffnungen auf Zellstoffpapier drückte, konnte ein Großteil des Puffers aus den Löchern entfernt werden. Reste wurden sorgfältig abgesaugt und anschließend die Löcher mit 100 μl HBSS gefüllt. Nach nochmaliger Messung der Platte konnten die Prozentzahlen der gebundenen Zellen durch Verrechnung der 100% Werte aus der ersten Messung ermittelt werden.

B.9.2 Proliferationsassay

Ruhende Zellen können durch eine Reihe von polyklonalen Aktivatoren zur Proliferation angeregt werden. Die proliferative Antwort ist anhand des [^3H]-Thymidineinbaus in die DNA messbar. Zur Untersuchung der AGR-vermittelten Zell-Aktivierung wurden Splenozyten in der Konzentration von 2×10^5 Zellen pro Vertiefung mit verschiedenen Stimulatoren für 72 h inkubiert. Für die letzten 16 h wurde in jede Vertiefung 1 μCi [^3H]-Thymidin zugegeben. Der Einbau des [^3H]-Thymidins wurde anschließend mit Hilfe eines β -Counters vermessen.

B.9.3 Induktion von Apoptose

Zur Analyse der Apoptoserate wurde der Anteil der AnnexinV⁺-Zellen nach Stimulation bestimmt. Dazu wurden jeweils 2×10^5 Zellen der peripheren Lymphknoten für 3 Tage mit 2 μg αCD3 , 0,4 μg CD3/2,5 μg CD28 oder 2 μg CD3/10 ng IL-2 pro ml kultiviert und anschließend mit AnnexinV gefärbt. AnnexinV ist ein Kalzium-abhängiges Phospholipid-bindendes Protein mit einer sehr hohen Affinität für Phosphatidylserine, welche an der Außenseite der Membran apoptotischer und nekrotischer Zellen vorkommen (72). Die AnnexinV⁺ Zellen sind somit in Apoptose oder Nekrose gegangen.

Zur Induktion von Apoptose durch Stress, wurden die Lymphozyten in 1,5% Serum oder in serumfreiem Medium gehalten. Eine Veränderung in der Phospholipidzusammensetzung der Membran wurde durch Zugabe von 200 mM Sorbitol erreicht. Nach 30 Minuten wurden die Zellen einmal gewaschen und über Nacht in Medium kultiviert. Andere Zellen wurden für 30 bzw. 60 Minuten auf 40°C erhitzt und danach bei 37°C über Nacht in Kultur gehalten. Als Positivkontrolle diente die Zugabe von 1 mM Staurosporine, das als starker Protein-Kinase-Inhibitor bei bis zu 95% der Zellen Apoptose auslöst. Am nächsten Tag wurden die Lymphozyten mit AnnexinV gefärbt und der Anteil der nekrotischen und apoptotischen Zellen durch eine FACS-Analyse ermittelt.

B.9.4 Durchflusszytometrische Analyse von Antigenen auf der Zelloberfläche

Durch eine Durchflusszytometrische Analyse (FACS-Analyse) können einzelne Zellen aufgrund ihrer Größe, Granularität und Fluoreszenz, die durch Bindung von Fluoreszenz gekoppelten Antikörpern bewirkt wird, charakterisiert werden. Aus der Intensität der Fluoreszenz kann auf die Menge der gebundenen Fluoreszenz-markierten Antikörper geschlossen werden. So ist eine Aussage über die Expressionsdichte von markierten Oberflächenantigenen auf der Zelloberfläche möglich.

Pro Färbung wurden ca. 5×10^5 Zellen in 100 μl PBS resuspendiert und in 96-V-Mikrotiterplatten mit 1 μg Antikörper pro Färbung für 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen, falls diese mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt wurden, in PBS resuspendiert und binnen ein bis zwei Stunden im Fluoreszenz-Zellsorter analysiert. Bei Färbungen mit unmarkierten Primärantikörpern wurde ein Färbeschritt mit direkt markierten Sekundärantikörpern angeschlossen.

B.9.5 Zellsortierung im Hochleistungsdurchflusszytometer MoFlo

Mit Hilfe des MoFlo können Zellen auf Grund der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle separiert werden. Hierfür wurden die Zellen wie unter B.9.4 beschrieben gefärbt. Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von 1×10^8 Zellen/ml in PBS aufgenommen. Direkt vor dem Sortieren wurde mittels eines Zellsiebes (60 μm) eine

Einzelzellsuspension hergestellt. Die gesorteten Zellen wurden entweder in Medium aufgenommen und für weitere Experimente stimuliert oder zur Gewinnung von RNA in RLT-Puffer resuspendiert.

B.9.6 Ca²⁺-Messungen

Um den Kalziumeinstrom in Splenozyten nach AGR Stimulation zu messen, wurde aus den Milzen eine Einzelzellsuspension hergestellt. 3×10^6 Zellen wurden in 2ml PBS mit 2 μ l Fluo-4-Färbelösung für 30 Minuten bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Nach 2 maligem Waschen mit Medium (ohne Phenolrot) wurden die Zellen in eine 96well Platte überführt und mit anti-CD4-PE-Cy5, anti-CD8-APC und anti-CD3 ϵ -biotin für 30 Minuten auf Eis im Dunkeln gefärbt. Nach erneutem Waschschrift wurde jede Probe in 600 μ l Medium aufgenommen und direkt vor der Messung am FACS-Gerät für 50 Sekunden bei 37°C vorgewärmt. Auch während der Messung wurden die Zellen mit Hilfe eines Wasserbades auf 37°C gehalten. Nach den ersten 20 Sekunden wurden 4 μ g Streptavidin zugegeben, um die Zellen über den biotinylierten anti-CD3 ϵ -AK zu stimulieren. Nach weiteren 3 Minuten wurde die Messung beendet.

Als Kontrollen dienten Färbungen ohne Zugabe von anti-CD3 ϵ -biotin.

B.9.7 CTL Chrom-Assay

Die zytotoxische CD8 T-Zell Funktion kann in einem CTL Chrom-Assay analysiert werden, indem die spezifische Lyse einer Zielzelle durch eine aktivierte zytotoxische T-Zelle gemessen wird. Lebende Zellen nehmen radioaktiv markiertes Natrium-Chromat ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$) auf, geben es aber spontan wieder ab. Wenn diese markierten Zielzellen abgetötet werden, wird das radioaktive Chromat freigesetzt und kann im Überstand von Kulturgemischen aus Zielzellen und zytotoxischen Effektor T-Zellen gemessen werden.

Nach Entnahme der poplietalen und inguinalen Lymphknoten vier Tage nach Injektion von Ovalbumin/1668 wurden die Lymphozyten für vier Tage mit 10 U/ml IL-2 in 24-well Platten mit $3-4 \times 10^6$ Zellen pro Loch kultiviert.

Einen Tag vor Durchführung des Assays wurden die EL-4 Zellen, die als Zielzellen eingesetzt wurden, umgesetzt. Am nächsten Tag wurden 2×10^6 Zielzellen mit 12,5 MBq $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ für 1 h bei 37°C zur Markierung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurde die Hälfte der Zielzellen mit der aus Ovalbumin stammenden Peptidsequenz SIINFEKL für weitere 30 min inkubiert, was die spezifische Erkennung und anschließende Lyse durch die aktivierten T-Zellen ermöglicht. Nach weiteren zwei Waschsritten wurden 100 μ l (10^3) Zielzellen im Verhältnis 1:1 zu seriell verdünnten Effektor-Zellen in 96-well V-Boden Platten zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 4 h bei 37°C. Daraufhin wurden 100 μ l Überstand aus jeder

Vertiefung entnommen und die Radioaktivität im γ -Counter vermessen. Dabei errechnet sich die spezifische Lyse nach folgender Formel:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = [\text{cpm (Probe)} - \text{cpm (Spontanlyse)}] / [\text{cpm (Maximallyse)} - \text{cpm (Spontanlyse)}] \times 100$$

Für die Messungen der Spontanlyse (8-fach Bestimmung) und der Maximallyse (4-fach Bestimmung) wurden Überstände aus Vertiefungen entnommen, in denen sich während der Inkubationszeit nur Zielzellen befanden. Die Maximallyse wurde durch starke Resuspension der Zellen vor der Messung erreicht.

B.9.8 ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

Das grundlegende Prinzip eines ELISAs (Enzyme linked immunosorbent assay) ist die Verwendung eines Enzyms zur Detektion einer Antigen-Antikörper Bindung. Das Enzym setzt ein farbloses Substrat (Chromogen) in ein farbiges Produkt um. Je nach ELISA können Antikörper oder Antigene, wie z.B. Zytokine, nachgewiesen werden. Die Farbintensität ist proportional zur Menge des gebundenen Antikörpers bzw. Antigens.

B.9.8.1 Detektion von spezifischen pneumokokkalen Polysaccharid-Antikörpern im Serum

Direkt vor, 7 und 14 Tage nach der Immunisierung (siehe 2.7.2) wurde den Mäusen Blut aus der Augenvene entnommen und das Serum bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C aufbewahrt. Zur Bestimmung der Menge der spezifischen pneumokokkalen Polysaccharid-Antikörpern, wurden die unspezifischen Antikörper gegen Polysaccharide vorher mit $20 \mu\text{g}$ C-Polysaccharid pro ml verdünntem Serum (1:2500 in PBS) abgefangen.

Der gesamte Assay wurde bei 37°C durchgeführt und nach jedem Schritt folgte dreimaliges Waschen mit PBS/0,05% Tween20.

Eine Flachboden 96-well Platte wurde UN mit $0,5 \mu\text{g}$ Pneumokokken Polysaccharid (4, 6B oder 19F) in PBS konjugiert und dann für eine Stunde mit 1% BSA geblockt, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Danach wird das verdünnte Serum mit dem C-Polysaccharid für 3 Stunden auf die Platte gegeben, so dass die spezifischen Antikörper für die Pneumokokken Polysaccharide 4, 6B oder 19F an die Platte binden können. Anschließend werden diese durch den Peroxidase-gekoppelten goat-anti-mouse-IgM (1:10.000) Antikörper gebunden (1 Stunde) und mit Hilfe des Substrats TMB nachgewiesen. Die Farbreaktion wird nach 5 Minuten mit $1,8 \text{ N H}_2\text{SO}_4$ gestoppt und die Platte bei 405 nm vermessen.

B.9.8.2 Bestimmung der IgM-Menge im Peritoneum

Die Überstände aus den Spülungen wurden zum Nachweis der IgM-Menge im Peritoneum eingesetzt. Der ELISA wurde nach dem Mouse IgM ELISA Quantitation Kit von Bethyl laut Anweisung durchgeführt.

B.9.8.3 Detektion von p38/P-p38 in stimulierten Lymphozyten

Zum Nachweis von phosphoryliertem p38 im Verhältnis zur Gesamtmenge p38 in T-Zellen, wurden 3×10^6 Zellen aus peripheren Lymphknoten stimuliert und danach in 60 μ l Cell Extraction Buffer (Biosource) aufgenommen. Der p38 und P-p38 ELISA wurde mit dem Immunoassay Kit von Biosource laut Anweisung durchgeführt. Anschließend wurde das Verhältnis von phosphoryliertem zu totalem p38 von jeder Probe ausgerechnet und ins Verhältnis zur unstimulierten Probe gesetzt.

B.9.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels des *Student's t*-Test für gepaarte Daten. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SD aufgeführt. Unterschiede zwischen den Experimentalgruppen werden als signifikant bezeichnet, wenn $p < 0,05$ ist, d. h. wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit für die Aussage unter 5% liegt.

C ERGEBNISSE

In den Vorarbeiten, die als Grundlage für diese Arbeit dienten, konnte mit Hilfe der *Sly^{d/d}* Maus ein deutlicher Effekt von SLY auf die Entwicklung und Funktionen von Leukozyten gezeigt werden. So wiesen einige lymphoide Organe der *Sly^{d/d}* Mäuse geringere Zellzahlen auf und T-Zellen zeigten nach AGR Stimulation eine signifikant verminderte Proliferationsrate und Zytokinproduktion. Ebenso war der basale Immunglobulin-Spiegel im Serum der Mäuse erniedrigt. Bei T-Zell abhängigen wie auch unabhängigen Immunantworten verminderte die Mutation in SLY die spezifische Antikörperproduktion. Um den Einfluss von SLY auf die T- und B-Zell Entwicklung und deren Funktionen, sowie die Funktionen von SLY im AGR Signalweg genauer zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere Analysen der *Sly^{d/d}* Maus durchgeführt.

C.1 B-Zellen

C.1.1 B-Zell Entwicklung in *Sly^{d/d}* Mäusen

Die Analyse lymphoider Organe ergab, dass *Sly^{d/d}* Mäuse signifikant geringere Zellzahlen in Thymus, Milz und den peripheren Lymphknoten aufwiesen, als die entsprechenden Kontrolltiere. Mesenteriale Lymphknoten und Knochenmark SLY mutierter Mäuse zeigten dagegen keine Auffälligkeiten (4).

		% positive Zellen			Zellzahl x 10 ⁶		
		WT	<i>Sly^{d/d}</i>	p	WT	<i>Sly^{d/d}</i>	p
Knochenmark	B220 ^{lo} IgM ⁻	29,9±6,0	25,0±6,4	0,29	9,4±1,4	10,0±2,2	0,69
	B220 ^{lo} IgM ^{lo}	11,3±6,0	13,8±7,3	0,61	3,7±1,7	6,2±2,8	0,32
	B220 ^{hi} IgM ^{hi}	7,0±2,5	4,9±2,5	0,26	2,0±0,7	1,9±1,0	0,16
Peritoneum	IgM ^{hi} IgD ^{lo}	16,0±2,3	17,2±5,0	0,79	n.a.	n.a.	n.a.
Milz	IgM ^{hi} IgD ^{lo}	6,2±2,1	2,7±1,0	<0,01	3,5±0,9	1,3±0,4	<0,01
	IgM ^{lo} IgD ^{hi}	32,3±8,6	29,1±11,8	0,62	23,9±4,1	15,2±9,8	0,15

Tab. 1: B-Zell Subpopulationen in lymphatischen Organen. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen der relativen (links) und absoluten (rechts) Zellzahlen in Knochenmark, Peritoneum und Milz von WT und *Sly^{d/d}* Mäusen (n=6 bis 12; n.a.= nicht analysiert).

Die B-Zell Entwicklung in *Sly^{d/d}* Mäusen wurde anhand der B-Zell Marker B220, IgM und IgD mittels FACS-Analyse untersucht. In Tabelle 1 sind sowohl relative als auch absolute Zellzahlen angegeben. Im Peritoneum der *Sly^{d/d}* und WT Mäuse wurden vergleichbare Mengen an B1-B-Zellen (IgM^{hi}IgD^{lo}) gefunden. Auch im Knochenmark wurden keine

signifikanten Unterschiede zwischen den B-Zellpopulationen von WT und *Sly^{d/d}* Mäusen beobachtet. Sowohl die B220^{lo}IgM⁻ Pro-B Zellen, die Prä-B Zellen (B220^{lo}IgM^{lo}) und die B220^{hi}IgM^{hi} B-Zellen, sind in normaler Anzahl vorhanden. In der Milz dagegen befanden sich in der *Sly^{d/d}* Maus im Vergleich zu WT Kontrollen signifikant weniger Marginalzonen B-Zellen (MZB; IgM^{hi}IgD^{lo}), aber eine gleich hohe Anzahl an folliculären B-Zellen (FB; IgM^{lo}IgD^{hi}).

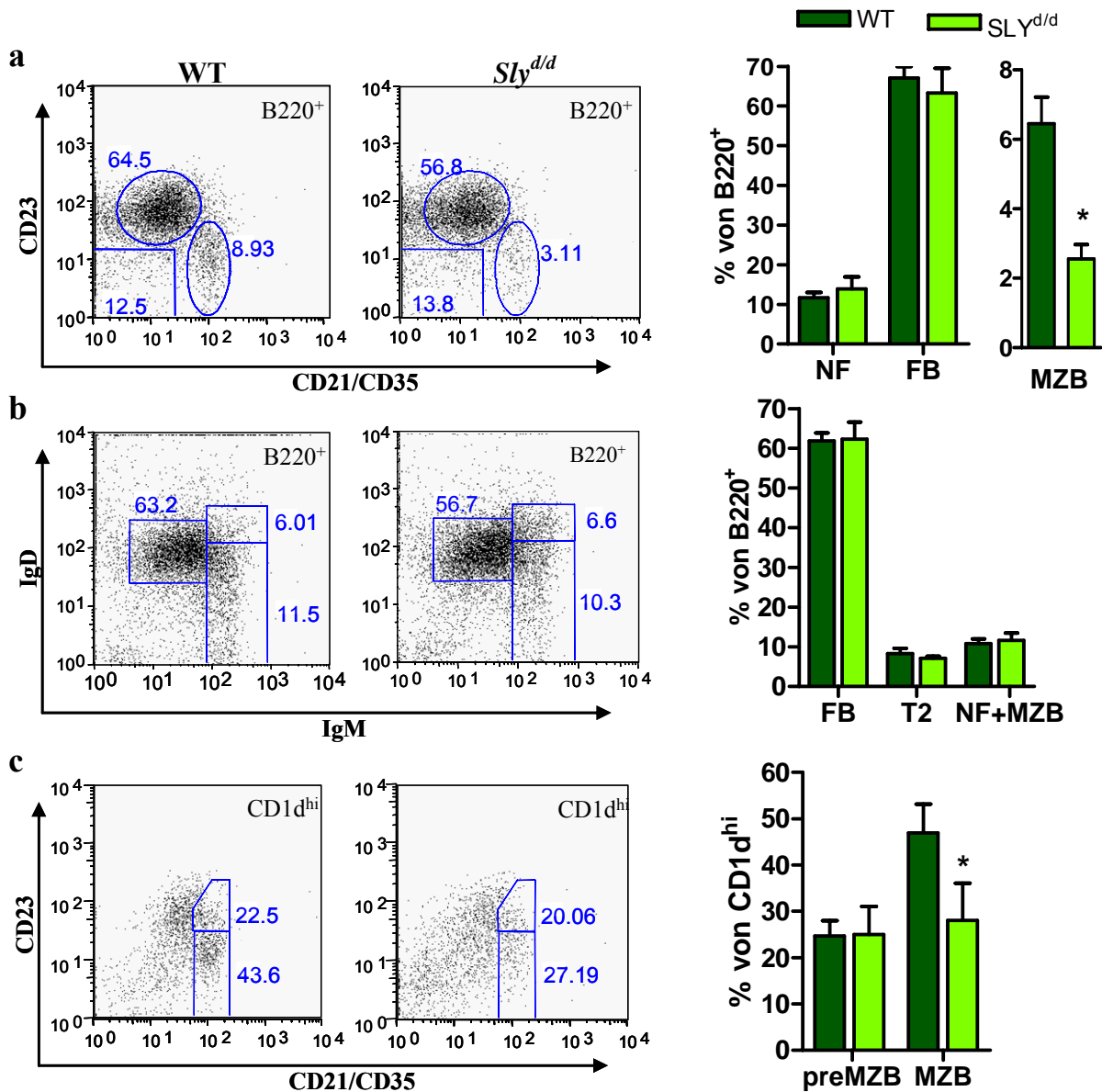


Abb. 9: B-Zell Entwicklung in der Milz. Dargestellt ist links jeweils eine repräsentative FACS-Analyse. Die Balkendiagramme beziehen sich auf die in den Diagrammen markierten Zellpopulationen und stellen relative Werte dar. WT (dunkelgrün) und *Sly^{d/d}* (hellgrün). a) NF (newly formed), FB (folliculäre B-Zellen) und MZB (Marginalzonen B-Zellen) von B220⁺ Zellen b) FB, T2 (transitionelle B-Zellen Typ 2), NF und MZB von B220⁺ Zellen c) preFB (Vorläufer der FB) und MZB von CD1d^{hi} Zellen (n=6; * p < 0,05).

Da die Entwicklung der B-Zellen, die aus dem Knochenmark in die Milz einwandern über mehrere Entwicklungsstufen zu den FB und MZB führt (siehe Abb. 1), wurden diese ebenfalls mittels FACS-Analysen untersucht.

Es fanden sich keine Veränderungen bei der Anzahl der NF ($\text{IgM}^{\text{hi}}\text{IgD}^{\text{lo}}\text{CD21}^{\text{int}}\text{CD23}^{\text{lo}}\text{CD1d}^{\text{lo}}$), preFB ($\text{IgM}^{\text{hi}}\text{IgD}^{\text{hi}}\text{CD21}^{\text{hi}}\text{CD23}^{\text{hi}}\text{CD1d}^{\text{lo}}$), preMZB ($\text{IgM}^{\text{hi}}\text{IgD}^{\text{hi}}\text{CD21}^{\text{hi}}\text{CD23}^{\text{hi}}\text{CD1d}^{\text{hi}}$) und FB ($\text{IgM}^{\text{lo}}\text{IgD}^{\text{hi}}\text{CD21}^{\text{int}}\text{CD23}^{\text{hi}}\text{CD1d}^{\text{lo}}$) in $\text{Sly}^{\text{d/d}}$ Mäusen im Vergleich zu WT Tieren. Allerdings waren die MZB ($\text{IgM}^{\text{hi}}\text{IgD}^{\text{lo}}\text{CD21}^{\text{hi}}\text{CD23}^{\text{lo}}\text{CD1d}^{\text{hi}}$) in signifikant geringerer Anzahl vorhanden (Abb. 9a und c).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass SLY die B-Zell Entwicklung im Knochenmark und in der Milz sehr selektiv beeinflusst, da nur die Marginalzonen B-Zellen in $\text{Sly}^{\text{d/d}}$ -Mäusen betroffen waren.

C.1.2 Analyse der $\text{Sly}^{\text{d/d}}$ B-Zellen

C.1.2.1 Basale Antikörpermenge im Peritoneum

Eine Untersuchung der basalen Immunglobulin-Spiegel im Serum zeigte in $\text{Sly}^{\text{d/d}}$ Mäusen signifikant reduzierte Spiegel an IgM und IgG1 im Vergleich zu WT Tieren. Die B1-B-Zellen im Peritoneum produzieren ebenfalls IgM, welches dann systemisch wird. Das bedeutet, das IgM im Serum wird von MZB und B1-B-Zellen produziert, IgM im Peritoneum nur von B1-B-Zellen.

Um zu überprüfen, ob im Peritoneum ebenfalls weniger IgM vorhanden war, wurde nach Spülung des Peritoneums ein ELISA zum Nachweis von IgM durchgeführt. Hierbei zeigte sich bei den $\text{Sly}^{\text{d/d}}$ Mäusen signifikant weniger IgM im Peritoneum als in WT Tieren (Abb. 10). Obwohl die Menge an B1-B-Zellen im Peritoneum von $\text{Sly}^{\text{d/d}}$ Mäusen normal war, produzieren diese jedoch weniger Antikörper.

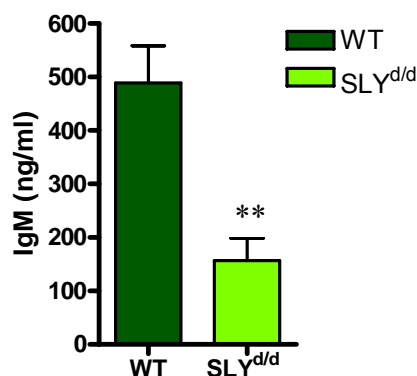


Abb. 10: Basaler IgM Spiegel im Peritoneum von WT (dunkelgrün) und $\text{Sly}^{\text{d/d}}$ Mäusen (hellgrün) (n=8; ** p<0,01).

C.1.2.2 Bestimmung des *Sly*-mRNA Spiegels in B-Zellen

SLY beeinflusst die Entwicklung der B-Zell Populationen der Milz unterschiedlich. Ob SLY in allen Zellen gleichermaßen exprimiert wird, wurde mittels TaqMan PCR bestimmt. Dazu wurden aus den Gesamtmilzzellen Marginalzonen und folliculäre B-Zellen durch MoFlo Aufreinigung separiert. Anschließend wurde mRNA isoliert, die *Sly* Expression bestimmt und gegen β -Aktin geeicht. Der Wert von Gesamtmilz wurde 1 gesetzt und die anderen darauf bezogen, so dass sich eine relative Expression von *Sly* in den B-Zellen im Verhältnis zur Gesamtmilz ergab.

Dabei wurden vergleichbare Mengen an *Sly* mRNA in den FB und den MZB detektiert. Der *Sly*-mRNA Gehalt von *Sly*^{d/d} B-Zellen im Vergleich zu WT B-Zellen war jedoch um mehr als 80% erhöht. Die Mutation in SLY erhöht somit die Expression von SLY sowohl in folliculären als auch in Marginalzonen B-Zellen.

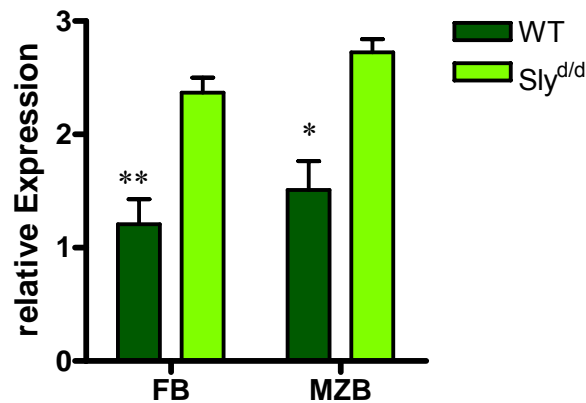


Abb. 11: *Sly*-mRNA Spiegel in B-Zellen. Dargestellt ist die relative Expression der *Sly*-mRNA Menge von FB und MZB aus WT (dunkelgrün) und *Sly*^{d/d} Mäusen (hellgrün), bezogen auf die *Sly*-Expression in der Gesamtmilz (n=4; * p<0,05, ** p<0,01).

C.1.2.3 Integrinexpression auf B-Zellen

Für die Immigration der B-Zellen in den Kompartimenten der Milz spielen Integrine wie LFA-1 (α L β 2) und α 4 β 1, die auf B-Zellen exprimiert werden, und deren Liganden ICAM-1, VCAM-1 und Fibronektin eine große Rolle. Marginalzonen B-Zellen haben eine höhere Expression dieser Integrine auf ihrer Oberfläche und binden deswegen wahrscheinlich stärker an ICAM-1 und VCAM-1 auf den hämatopoetischen und endothelialen Zellen in der Marginalzone als die folliculären B-Zellen (41). Eine veränderte Integrinexpression in B-Zellen mit einer Mutation in SLY könnte somit die verringerte Anzahl an MZB in *Sly*^{d/d} Mäusen erklären. Um diese Frage zu beantworten, wurde die Expression von Integrinen auf den B-Zellpopulation der Milz mittels FACS-Analyse untersucht.

Sowohl auf Follikulären als auch auf Marginalzonen B-Zellen von WT und *Sly^{d/d}* Mäusen waren vergleichbare Mengen an $\alpha 4$, $\beta 1$, und αL zu erkennen. Die erhöhte Expression von αL auf MZB im Vergleich zu FB war bei WT und *SLY* mutierten Zellen gleichermaßen sichtbar (Abb. 12).

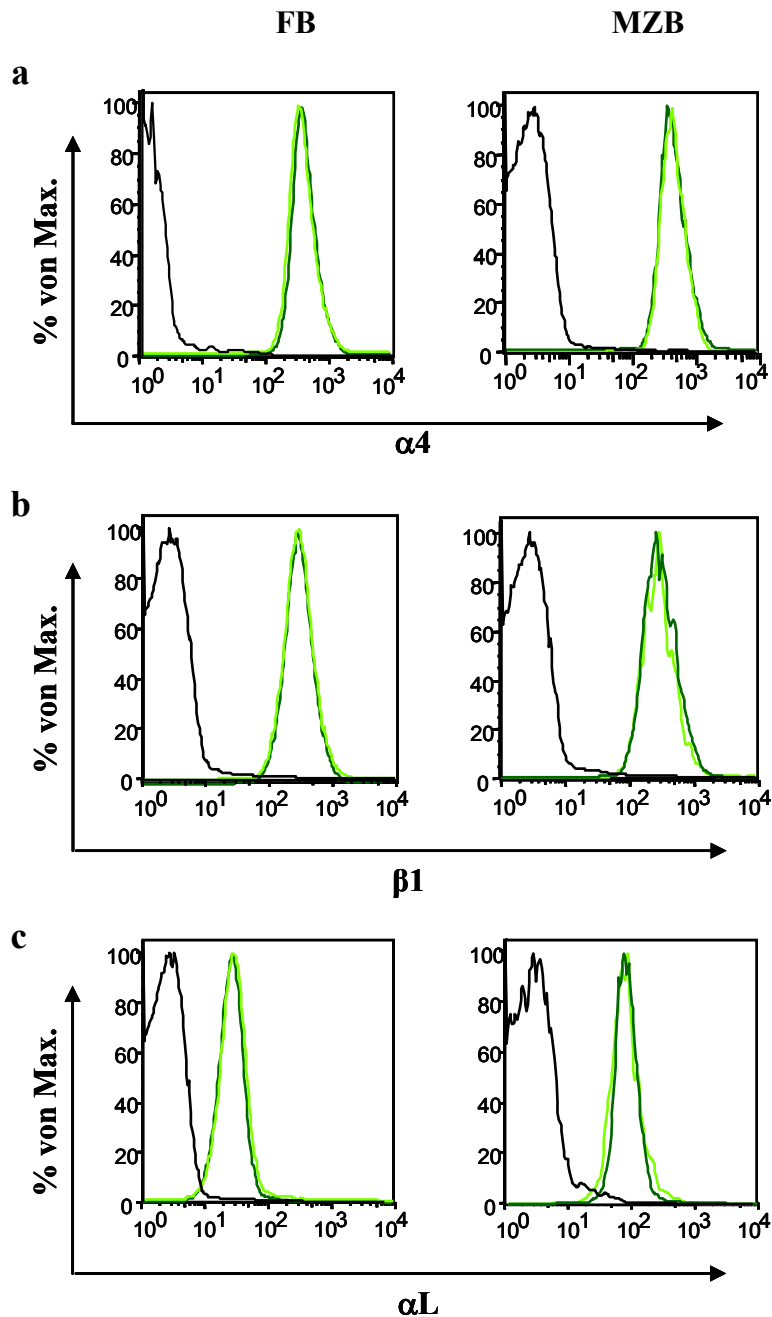


Abb. 12: Integrinexpression auf B-Zellen. Die Expression von $\alpha 4$ (a), $\beta 1$ (b) und αL (c) von FB ($CD21^{int}CD23^{hi}$) und MZB ($CD21^{hi}CD23^{-}$) der Milz wurde mittels FACS-Analyse bestimmt (WT=dunkelgrün, *Sly^{d/d}*=hellgrün, Isotypkontrolle=schwarz; n=5).

C.1.2.4 Expression von Chemokinrezeptoren auf B-Zellen

Nachdem Lymphozyten in die Milz eingewandert sind, werden sie durch Chemokine in die Kompartimente gelockt. Bei den B-Zellen sind die Liganden der Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR5 dafür verantwortlich (14). Anti-Integrin Antikörper zusammen mit einer Blockierung der Chemokinsignale verursachen ein Verschwinden der MZB in der Milz (40). Würde SLY die Expression der Chemokinrezeptoren auf den B-Zellen beeinflussen, könnte dies ein Grund für die verringerte Anzahl an MZB in *Sly^{d/d}* Mäusen sein. Deshalb wurde die Expression dieser Chemokinrezeptoren auf FB und MZB von *Sly^{d/d}* und WT Mäusen durch eine FACS-Analyse verglichen. Die Follikulären und die Marginalzonen B-Zellen von beiden Gruppen zeigten jedoch eine ähnliche Expression von CXCR5 und CCR7, wie in Abbildung 13 dargestellt ist.

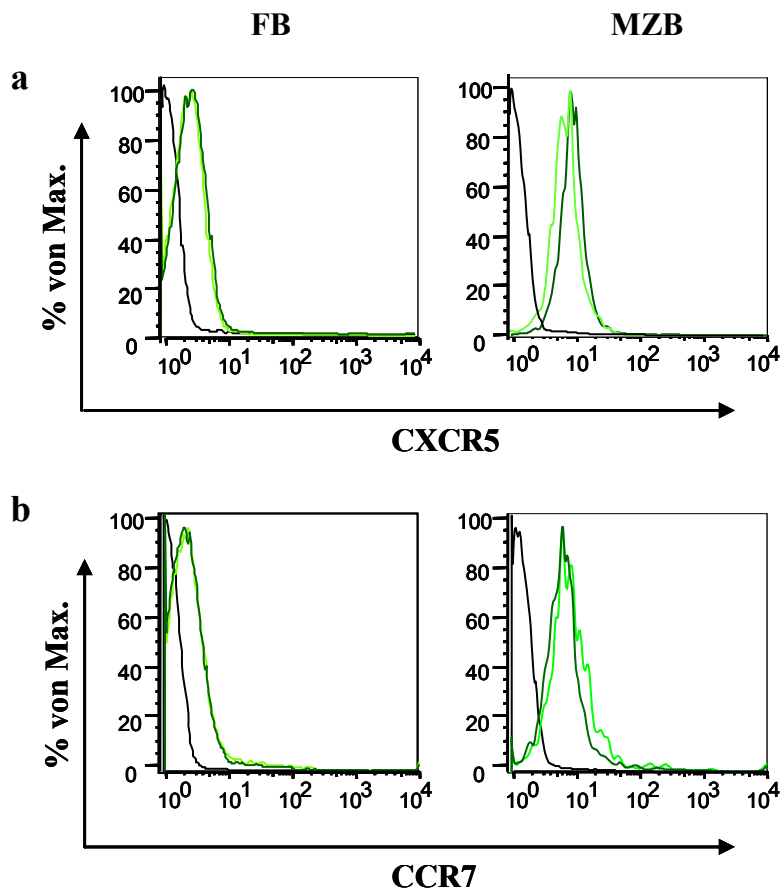


Abb. 13: Expression von CXCR5 und CCR7 auf B-Zellen. FB ($CD21^{int}CD23^{hi}$) und MZB ($CD21^{hi}CD23^{-}$) von WT (dunkelgrün) und *Sly^{d/d}* (hellgrün) Mäusen wurden auf ihre Expression von CXCR5 (a) und CCR7 (b) mittels FACS-Analyse untersucht (Isotypkontrolle=schwarz; abgebildet ist eines von 7 unabhängigen Experimenten).

Die Expression der untersuchten Integrine und Chemokinrezeptoren weist keine Veränderung in den *Sly^{d/d}* Mäusen auf. Die stark dezimierte Anzahl an MZB ist somit nicht auf eine veränderte Einwanderung der B-Zellen in die Kompartimente der Milz zurückzuführen.

C.1.3 Analyse der B-Zell Funktionen in SLY mutierten Mäusen

C.1.3.1 Proliferation von B-Zellen

Neben der B-Zell Entwicklung wurde im Rahmen dieser Arbeit die Funktionalität der B-Zellen untersucht. Dies geschah zunächst durch Analyse des Proliferationsverhaltens. MoFlo aufgereinigte MZB ($B220^+CD21^{hi}CD23^{lo}$) und FB ($B220^+CD21^{int}CD23^{hi}$) von WT und $Sly^{d/d}$ Mäusen wurden für Proliferationsassays eingesetzt. Nach AGR Stimulation mit α IgM und α IgM/ α CD40 zeigten die FB von WT und $Sly^{d/d}$ Mäusen ein ähnliches Proliferationsverhalten (Abb. 14a). Die $Sly^{d/d}$ Marginalzonen B-Zellen dagegen proliferierten im Vergleich zu $Sly^{+/+}$ MZB weniger. In Abbildung 14b sind zwei von vier repräsentativen Experimenten dargestellt. Die Mutation in SLY beeinflusst also nicht nur die Entstehung und/oder das Überleben von MZB, sondern auch ihre Fähigkeit nach AGR Stimulation zu proliferieren.

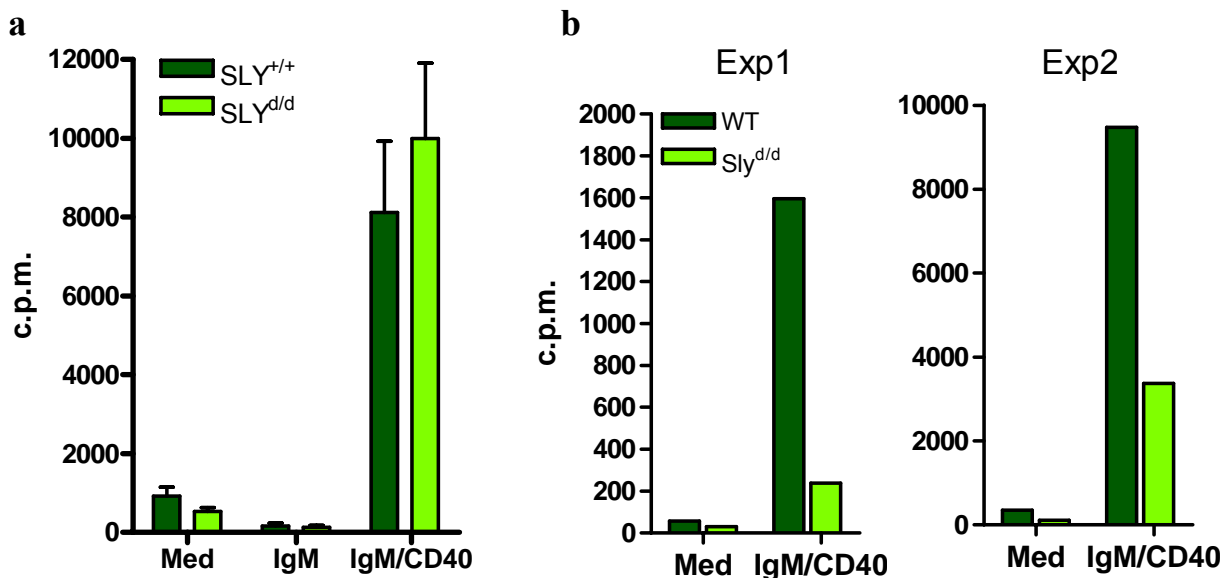


Abb.14: B-Zell Proliferation. Aufgereinigte FB (a) und MZB (b) wurden mit 20 μ g/ml α IgM alleine oder α IgM/ α CD40 (jeweils 20 μ g/ml) stimuliert; der [3 H]-Thymidin Einbau wurde nach 3 Tagen gemessen (n=4 Experimente).

C.1.3.2 T-Zell unabhängige Immunantwort

Bei einer T-Zell unabhängigen Immunantwort werden Antikörper hauptsächlich von MZB und B1-B-Zellen freigesetzt. Da der basale IgM-Spiegel im Serum und im Peritoneum von $Sly^{d/d}$ Mäusen signifikant niedriger war als in WT Tieren und die Anzahl der Marginalzonen B-Zellen verringert war, könnte auch die T-Zell unabhängige Immunantwort durch die Mutation in SLY beeinträchtigt sein. In Vorversuchen zeigten die Sly mutierten Mäuse nach einer Immunisierung mit dem Protein TNP-Ficoll eine stark verminderte TNP-spezifische IgM Produktion (Abb. 8). Da manche Proteine der B-Zell Rezeptor Signalkaskade, wie z.B. Btk, einen größeren Einfluss auf die Immunantwort gegen Polysaccharide als gegen Proteine zeigen (32), wurde die T-Zell unabhängige Immunantwort gegen Pneumokokken

Polysaccharide (pPS) analysiert. Dazu wurde ein Gemisch aus verschiedenen bakteriellen Polysacchariden intraperitoneal injiziert (1 µg in 200 µl PBS), so dass eine vom zeitlichen Ablauf unterschiedliche spezifische AK-Produktion hervorgerufen wird. Den Mäusen wurde vor der Immunisierung und an Tag 7 und 14 Blut entnommen und die Menge der spezifischen Antikörper gegen einige dieser pPS im ELISA nachgewiesen.

Bei den WT Tieren wurde ein deutlicher Anstieg der spezifischen IgM-Mengen 7 Tage nach Injektion beobachtet. Die Menge der Antikörper gegen pPS 4 und pPS 6B stieg an Tag 7 an und nahm nach 14 Tagen wieder ab, die Anzahl der spezifischen IgM-Moleküle gegen pPS 19F nahm nach 14 Tagen sogar noch zu.

Bei *Sly^{d/d}* Mäusen war nur ein sehr geringer Anstieg bei der Menge der AK gegen pPS 4 und 6B nach 7 und 14 Tagen sichtbar. Die Antikörper gegen pPS4 waren sogar schon vor der Immunisierung in geringerer Anzahl als in WT Tieren vorhanden. Die IgM-Produktion gegen pPS 19F stieg nach 7 und 14 Tagen an, jedoch signifikant geringer als bei den WT Tieren (Abb. 15).

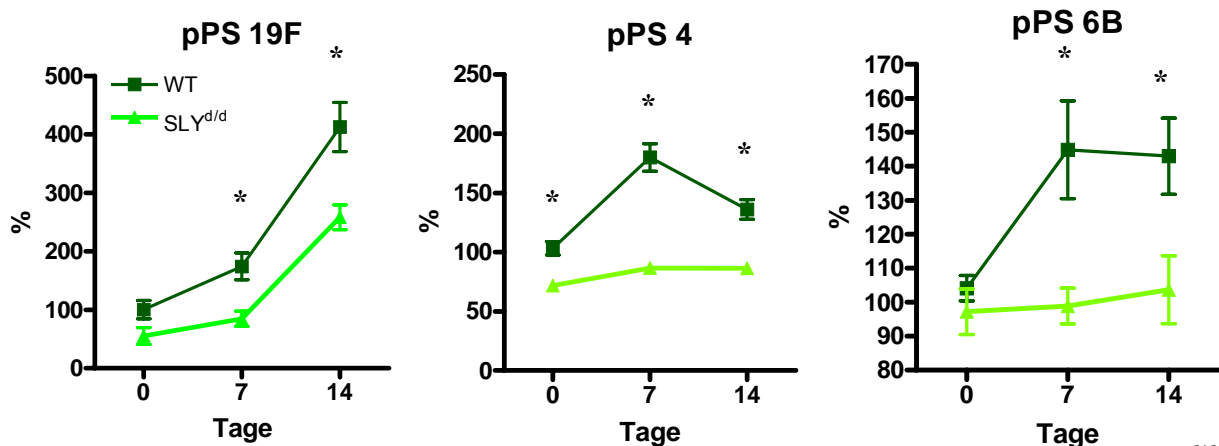


Abb. 15: T-Zell unabhängige Immunantwort. WT (dunkelgrüne Vierecke) und *Sly^{d/d}* Tiere (hellgrüne Dreiecke) wurden mit 1 µg Pneumokokken Polysacchariden immunisiert und an Tag 0, 7 und 14 die Menge der spezifischen IgM Antikörper im ELISA gemessen (n=7; * p<0,05).

Die T-Zell unabhängige Immunantwort gegen Pneumokokken Polysaccharide in *Sly^{d/d}* Mäusen ist somit stark eingeschränkt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark nicht beeinflusst wurde, obwohl die Anzahl der Marginalzonen B-Zellen in der Milz signifikant geringer war. Eine Erklärung dafür lieferten weder die Expression von Integrinen noch Chemokinrezeptoren auf den B-Zell Populationen. Neben der Anzahl war auch die Funktionalität der B-Zellen eingeschränkt, da die Proliferationsrate und die AK-Produktion nach AGR Aktivierung verringert war, was zu einer stark verminderten T-Zell unabhängigen Immunantwort führte.

C.2 T-Zellen

C.2.1 Entwicklung der T-Zellen in *Sly^{d/d}* Mäusen

Die verringerten Zellzahlen in Thymus, Milz und den peripheren Lymphknoten von *Sly^{d/d}*-Mäusen deuteten auf eine Beeinflussung von SLY auf die Entwicklung der B- und T-Zellen hin. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit die Entwicklung der T-Zellen im Thymus und die Anzahl der T-Zellen in den peripheren lymphatischen Organen genauer untersucht.

C.2.1.1 T-Zell Populationen in Thymus und Milz

Die Durchflusszytometrische Analyse von Thymus und Milz zeigte eine veränderte Verteilung der T-Zell Populationen. Im Thymus von *Sly^{d/d}* Mäusen war die Anzahl der CD4⁺CD8⁺ (DP) und CD4⁺CD8⁻ Zellen im Vergleich zu WT Mäusen signifikant erniedrigt. Die Fraktion der CD4⁻CD8⁻ (DN) T-Zellen war prozentual gesehen erhöht, die absoluten Zellzahlen dagegen normal. Bei der genauen Analyse der Entwicklungsstufen der DN ergaben sich prozentual weniger DN1 Zellen in *Sly^{d/d}*-Mäusen (4,9±1,4) im Vergleich zu WT Tieren (7,7±2,0), der prozentuale Anteil der anderen Entwicklungsstufen war mit denen der Kontrolltiere vergleichbar (Tab. 2).

		% positive Zellen			Zellzahl x 10 ⁶		
		WT	<i>Sly^{d/d}</i>	p	WT	<i>Sly^{d/d}</i>	p
Thymus	CD4 ⁺ CD8 ⁺	81,6±2,8	79,1±2,7	0,04	110,5±25,9	59,9±14,5	<0,001
	CD4 ⁺ CD8 ⁻	10,8±1,4	9,0±1,8	<0,01	18,7±5,2	8,7±3,9	<0,001
	CD4 ⁻ CD8 ⁺	3,5±0,9	4,0±1,1	0,21	5,4±1,8	3,9±1,2	0,10
	CD4 ⁻ CD8 ⁻	3,6±1,4	6,2±1,2	<0,001	5,1±1,8	5,7±1,8	0,46
	DN1 von DN	7,7±2,0	4,9±1,4	<0,005	n.a.	n.a.	
	DN2 von DN	3,0±0,6	3,4±1,5	0,6	n.a.	n.a.	
	DN3 von DN	54,0±4,6	55,8±8,8	0,6	n.a.	n.a.	
	DN4 von DN	35,7±6,1	34,0±1,5	0,5	n.a.	n.a.	
Milz	CD3 ⁺ CD4 ⁺	61,0±1,8	49,2±3,0	<0,001	14,2±4,4	7,1±1,5	<0,01
	CD3 ⁺ CD8 ⁺	32,9±1,5	39,7±2,4	<0,001	6,9±1,2	5,7±1,1	0,11
	CD4 ⁺ CD25 ⁺	2,0±0,2	2,0±0,1	0,86	1,2±0,6	0,7±0,2	0,20

Tab. 2: T-Zell Subpopulationen im Thymus und der Milz. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen der relativen (links) und absoluten (rechts) Zellzahlen in Thymus und Milz von WT und *Sly^{d/d}* Mäusen (n=6 bis 12; n.a.=nicht analysiert).

In der Milz befanden sich relativ gesehen weniger $CD4^+$ und mehr $CD8^+$ T-Zellen als in WT Tieren. In absoluten Zellzahlen dagegen war die Anzahl der $CD8^+$ Zellen normal und die Anzahl der $CD4^+$ Zellen verringert (Tab. 2). Zu einem vergleichbaren Ergebnis kam es bei den T-Zell Populationen in den peripheren Lymphknoten (Daten nicht gezeigt). Die Minimierung einer Zellpopulation führt prozentual gesehen oft zu einer Veränderung anderer Populationen, die absoluten Zellzahlen beschreiben dann die tatsächliche Situation. Die $CD4^+CD25^+$ T-Zellen in der Milz, die unter anderem die regulatorischen T-Zellen beinhalten, waren in den SLY mutierten Mäusen unverändert (Tab. 2).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Thymus weniger DN1, DP und $CD4^+CD8^-$ Zellen und in der Milz weniger $CD4^+$ T-Zellen in $Sly^{d/d}$ Mäusen im Vergleich zu WT Tieren vorhanden waren und SLY neben der B-Zell Entwicklung auch in die T-Zell Entwicklung eingreift.

C.2.1.2 TZR $V\beta$ -Repertoire der T-Zellen

Die in C.2.1 gezeigten Daten zeigen im Thymus von $Sly^{d/d}$ Tieren ein verändertes $CD4/CD8$ Verhältnis. Während der intrathymischen Entwicklung ordnen die T-Zellen die Gene der α - und β -Kette des TZR um (Abb. 2), damit eine große Vielfalt an T-Zell Rezeptoren erreicht werden kann. Läuft dieser Vorgang nicht korrekt ab oder werden aufgrund von Positiv- und Negativselektion nur bestimmte Gene für die Expression der T-Zell Rezeptoren verwendet, kann sich dies bei der Verteilung der $V\beta$ -Regionen bemerkbar machen. Deshalb wurde mittels FACS-Analyse ein $V\beta$ Repertoire auf Thymozyten und T-Zellen der peripheren Lymphknoten untersucht.

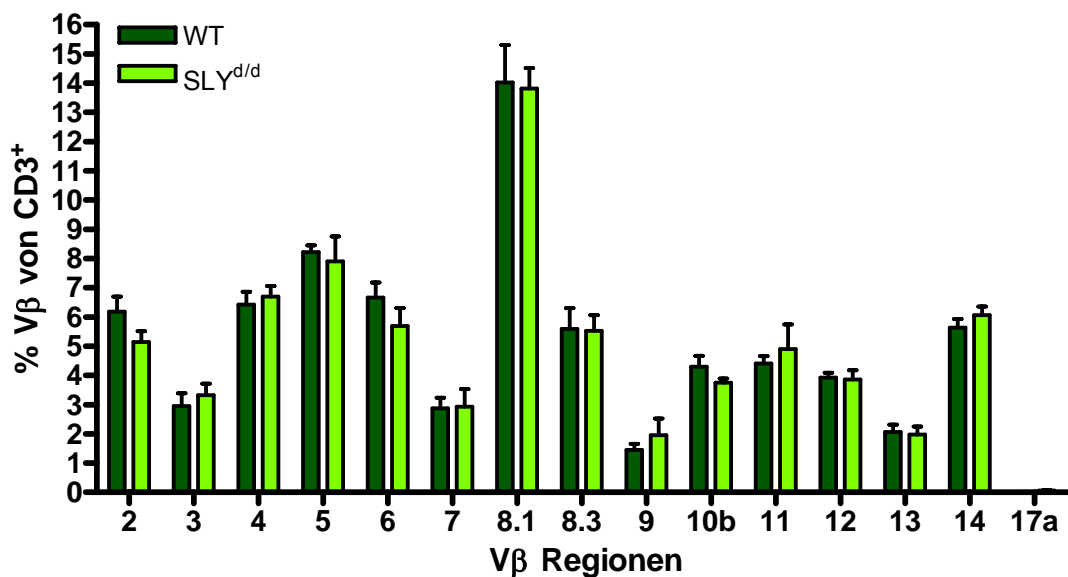


Abb. 16: TZR $V\beta$ Regionen im Thymus. In WT (dunkelgrün) und $Sly^{d/d}$ Mäusen wurde die Verteilung einiger $V\beta$ Regionen auf Thymozyten nachgewiesen (n=6).

Die untersuchten V β Regionen der T-Zell Rezeptoren waren sowohl im Thymus (Abb. 16) als auch in den peripheren Lymphknoten (Daten nicht gezeigt) in *Sly*^{+/+} und *Sly*^{d/d} Mäusen ähnlich verteilt, d.h. die Umordnung der β -Ketten Gene und somit die Entwicklung der T-Zellen ist durch SLY nicht beeinflusst.

C.2.1.3 Positive und negative Selektion im Thymus von *Sly*^{d/d} Mäusen

Die veränderte Verteilung der T-Zell Subpopulationen im Thymus von *Sly*^{d/d} Mäusen könnte auch auf eine Beeinflussung der positiven oder negativen Selektion bei der Reifung der Thymozyten zurückzuführen sein. Um dies zu überprüfen, wurden transgene TCR-HY *Sly*^{d/d} Mäuse generiert, die neben der Mutation in SLY den transgenen T-Zell Rezeptor spezifisch für das Antigen HY exprimieren. Bei den Weibchen, die das männliche HY Antigen nicht selber exprimieren, kommt es zur positiven Selektion und somit zur Ausreifung dieser transgenen T-Zellen mit TCR-HY. Bei den Männchen, die das HY Antigen exprimieren, erfolgt eine negative Selektion der autoreaktiven Zellen mit transgenem TCR-HY und damit zur Eliminierung fast aller Thymozyten während der Entwicklung. Störungen bei der positiven oder negativen Selektion würden also bei den männlichen bzw. weiblichen transgenen Tieren sichtbar werden (17, 27).

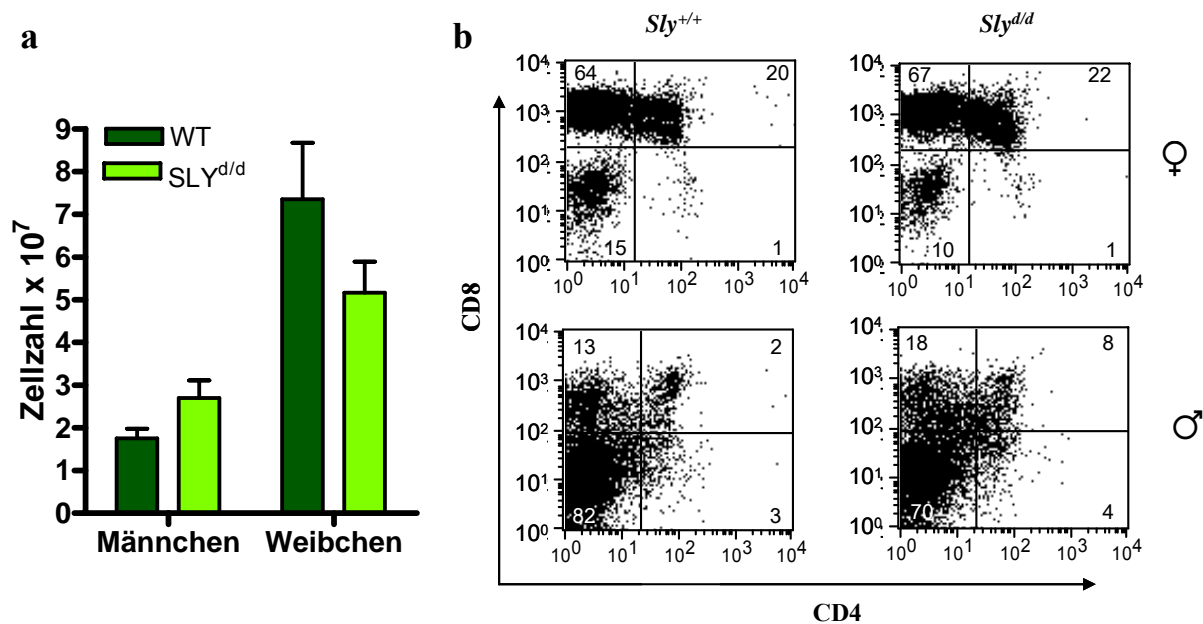


Abb. 17: T-Zellen mit TCR-HY. a) Gesamtzellzahl im Thymus von WT (dunkelgrün) und *Sly*^{d/d} Mäusen (hellgrün) mit transgenem TCR-HY im Alter von 6 Wochen (♀n=3; ♂WT n=5, *Sly*^{d/d} n=11). b) TCR-HY^{hi} Thymozyten von WT (links) und *Sly*^{d/d} (rechts) wurden auf ihre Expression von CD4 und CD8 untersucht. Dargestellt ist eine repräsentative Färbung, wobei die relativen Werte in den Quadranten angegeben sind. Die weiblichen Tiere sind oben, die männliche Tiere unten abgebildet (♀n=3; ♂WT n=5, *Sly*^{d/d} n=11).

Weibliche *Sly*^{d/d} Mäuse, die den transgenen TCR-HY exprimierten, wiesen im Vergleich zu TCR-HY exprimierenden WT Weibchen keine Veränderungen auf. Nur die Gesamtzellzahl des Thymus war bei Weibchen mit SLY Mutation tendenziell geringer als bei WT Weibchen, vergleichbar mit den Mäusen ohne transgenem T-Zell Rezeptor (Abb. 17a).

Bei den Männchen, die nur noch einen kleinen Thymus sowohl in WT als auch in *Sly*^{d/d} Tieren aufwiesen, zeigten sich leichte Unterschiede in der Verteilung der T-Zell Populationen (Abb. 17b). Die *Sly*^{d/d} Mäuse hatten weniger DN (WT: 82,12±4,34 *Sly*^{d/d}: 70,16±6,34) und mehr DP (WT: 2,36±0,85 *Sly*^{d/d}: 8,33±3,89) und CD8⁺CD4⁻ (WT: 11,83±3,22 *Sly*^{d/d}: 18,05±2,76) T-Zellen. Die CD4⁺CD8⁻ (WT: 3,05±1,63 *Sly*^{d/d}: 3,47±1,36) Zellen waren sowohl bei WT als auch bei *Sly*^{d/d} Tieren in nur sehr geringer Anzahl vorhanden. Da aber auch die nicht-transgenen *Sly*^{d/d} Mäuse ein verändertes Verhältnis der T-Zell Subpopulationen im Thymus aufwiesen (Tab. 2), lassen diese Ergebnisse nicht auf eine Beeinflussung der positiven oder negativen Selektion durch SLY schließen.

C.2.1.4 Analyse der Knochenmarks-Chimären Mäuse

Obwohl die SLY Expression nur in lymphoiden Zellen nachgewiesen wurde, ist ein Einfluss durch die SLY Mutation auf die Funktion von nicht-lymphatischem Gewebe bei der Entwicklung von B- und T-Zellen nicht auszuschließen. Dazu wurden Thymus, Milz und die peripheren Lymphknoten von Knochenmarks-Chimären Mäusen auf ihre T- und B-Zell Populationen mittels FACS-Analyse untersucht. In der ersten Gruppe wurde das Knochenmark von letal bestrahlten CD45.1⁺ WT Mäusen mit Knochenmark von kongenen *Sly*^{+/+} bzw. *Sly*^{d/d} Spendern (CD45.2⁺) substituiert. In einer zweiten Gruppe wurden *Sly*^{+/+} bzw. *Sly*^{d/d} Mäuse bestrahlt und mit Knochenmark von CD45.1⁺ WT Mäusen substituiert.

In der ersten Gruppe bestand der Thymus aller Empfängertiere vier Wochen nach der Injektion aus mehr als 97% CD45.2⁺ Spenderzellen. Die Organgrößen waren vergleichbar mit denen der entsprechenden Spendertiere, d.h. die Thymi waren bei SLY mutierten Spenderzellen im Vergleich zu WT Spendern deutlich kleiner. Betrachtete man bei der Zusammensetzung der Thymi aus CD4⁺, CD8⁺, DP und DN Zellen nur die CD45.2⁺-Spenderzellen, spiegelte sich die geringere Zellzahl bei *Sly*^{d/d}-Spendern in allen Zellpopulationen wieder, ist jedoch besonders deutlich bei DP und CD4⁺ Zellen (Abb.18a).

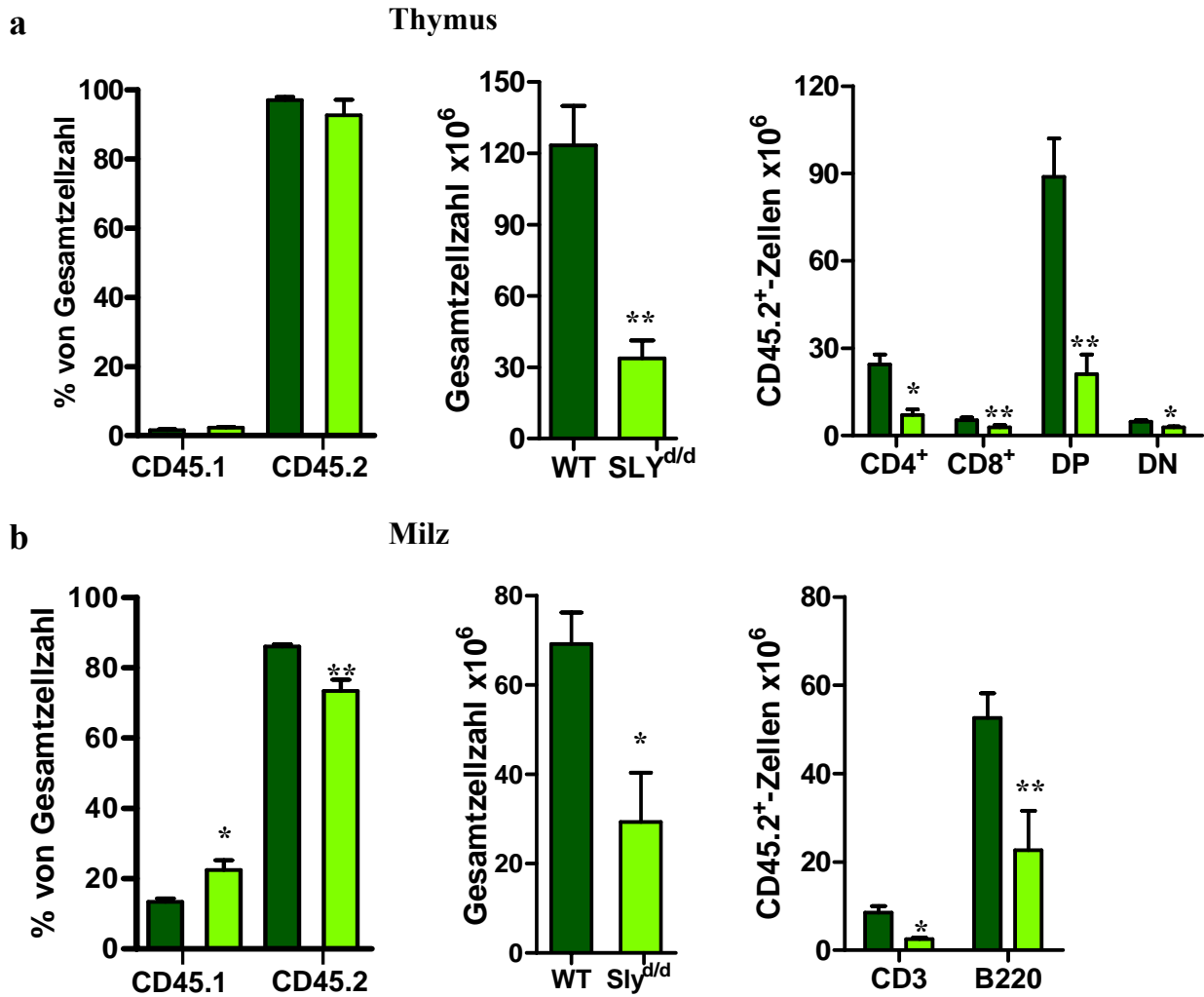


Abb. 18: KM-Rekonstitution CD45.2→CD45.1. In Thymus (a) und Milz (b) der WT Empfängertiere wurde die Anzahl der CD45.1⁺ und CD45.2⁺ Zellen (links), die Gesamtzellzahl (mitte) und die CD45.2⁺ Zellpopulationen (rechts) betrachtet (WT=dunkelgrün, *Sly*^{d/d}=hellgrün; n=5; * p<0,05, ** p<0,01).

In der Milz und den peripheren Lymphknoten war die Anzahl der *Sly*^{d/d} Spenderzellen nach 4 Wochen geringer als die der WT Spender, d.h. die Rekonstitution mit *Sly* mutierten Zellen war weniger effektiv. Die Größe der Organe, bestehend aus Spender- und Empfängerzellen, und die Anzahl der CD45.2⁺ CD3⁺ und B220⁺ Zellen war bei Mäusen mit *Sly*^{d/d} Empfängerzellen ebenfalls geringer, was nach den bekannten Daten der *Sly*^{d/d} Mäuse zu erwarten war (Milz Abb. 18b).

In der zweiten Gruppe wurde letal bestrahlten *Sly*^{+/+} und *Sly*^{d/d} Empfängern (CD45.2⁺) Knochenmarkszellen aus WT Spendern (CD45.1⁺) injiziert. Dabei zeigte sich ein ähnliches Verhältnis von Empfänger- zu Spenderzellen in den einzelnen Organen, wie im vorigen Modell, d.h. im Thymus bis zu 99% und in Milz und den peripheren Lymphknoten bis zu 86% CD45.1⁺ Spenderzellen. Allerdings waren die Organgrößen und die Zusammensetzung

der T- und B-Zell Populationen im Thymus (Abb. 19a), Milz (Abb. 19b) und den peripheren Lymphknoten (Daten nicht gezeigt) bei WT und *Sly^{d/d}* Empfängern identisch, was sich auch in den einzelnen Zellpopulationen wieder spiegelt. Die Rekonstitution durch die WT Zellen war somit durch die *Sly^{d/d}* Empfängerzellen nicht beeinträchtigt.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Mutation in SLY die Fähigkeit von Knochenmarkszellen, die T und B Zell Kompartimente zu rekonstituieren, beeinflusst, nicht aber die Funktion des Stromas von lymphoiden Organen verändert.

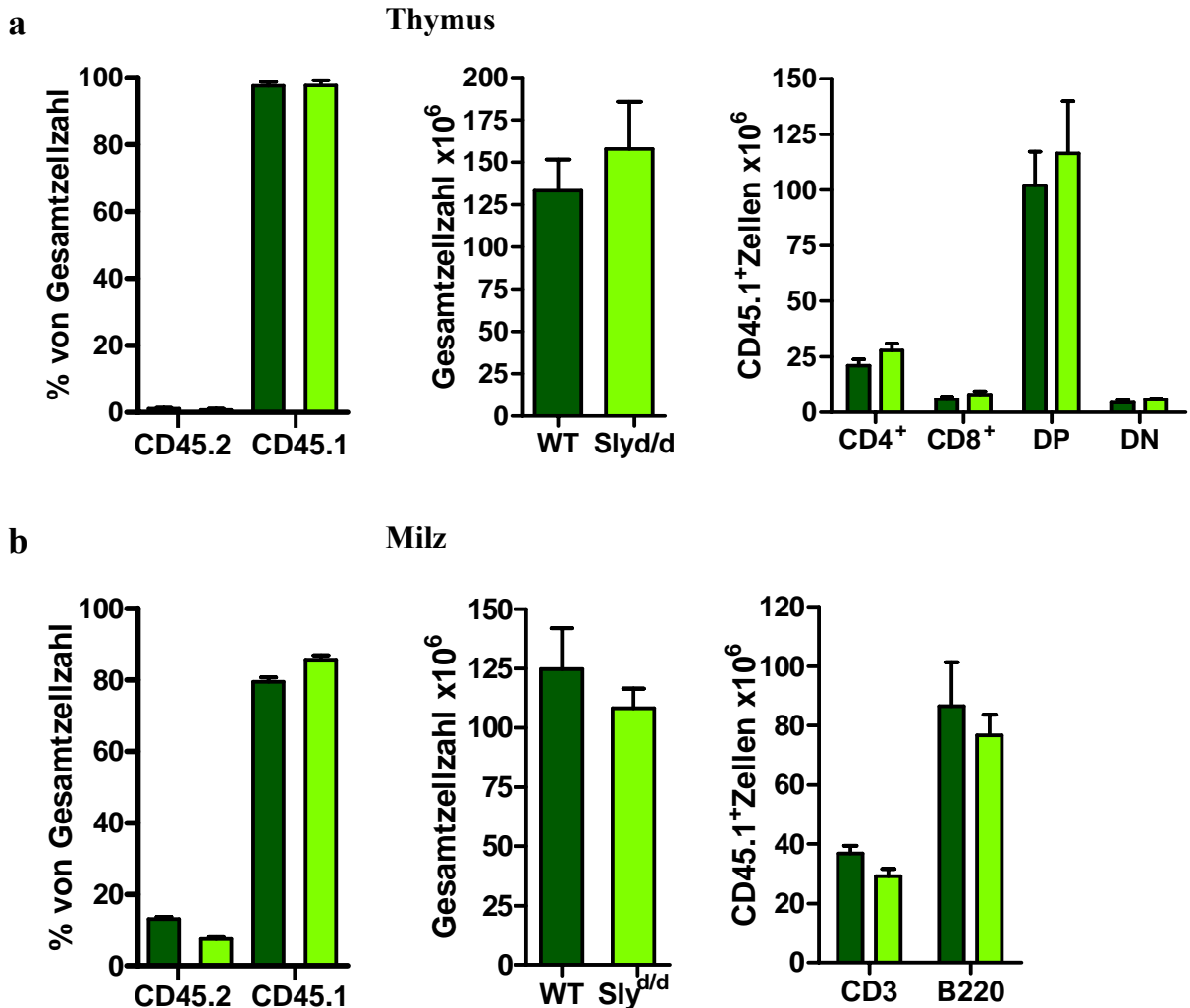


Abb. 19: KM-Rekonstitution CD45.1→CD45.2. In Thymus (a) und Milz (b) der Empfängertiere wurde die Anzahl der CD45.2⁺ und CD45.1⁺ Zellen (links), die Gesamtzellzahl (mitte) und die CD45.1⁺ Zellpopulationen (rechts) betrachtet (WT=dunkelgrün, *Sly^{d/d}*=hellgrün; n=4).

C.2.2 Funktionen der T-Zellen mit einer Mutation in SLY

In den *Sly^{d/d}* Mäusen ist nicht nur die T-Zell Entwicklung, sondern auch deren Funktionalität verändert. In Vorversuchen konnte eine verringerte Proliferationsrate und Zytokinproduktion nach AGR Stimulation beschrieben werden. Welche weiteren Funktionen durch die Mutation in SLY beeinflusst wurden, wird im Folgenden gezeigt.

C.2.2.1 Adhäsion von *SLY* mutierten T-Zellen

Die Integrin-vermittelte Adhäsion von T-Zellen an APCs oder Endothel spielt eine wichtige Rolle bei deren Zirkulation (ICAM-2), Einwanderung in Gewebe (VCAM-1) und Aktivierung über den TZR (LFA-1, ICAM-1) (1, 26). Eine veränderte Adhäsionseffektivität würde somit den TZR-Signalweg und die Funktionalität der T-Zellen beeinflussen. Um die Adhäsion der T-Zellen an verschiedene Liganden zu untersuchen, wurden Adhäsionsassays mit voraktivierten T-Zellen aus der Milz durchgeführt. T-Zellen wurden mit PMA/Ionomycin für 72h stimuliert und für weitere 48h mit IL-2 kultiviert. Anschließend wurde die spezifische Bindung der Zellen an immobilisiertes Fibronectin, VCAM und ICAM-2 ohne und mit α CD3 Stimulation gemessen. Fibronectin bindet an α 4 β 1 (VLA-4), α 4 β 7 und α 5 β 1 auf den T-Zellen. VCAM wird von α 4 β 1 und α 4 β 7 erkannt und ICAM-2 ist ein Ligand von LFA-1 (α L β 2) (54). Durch ein verändertes Expressionsmuster der Integrine in *Sly*^{d/d} Zellen nach der Kultivierung würde die Adhäsion der T-Zellen beeinflusst werden. Damit dies ausgeschlossen werden konnte, wurde vor dem Adhäsionsassay mittels FACS-Analyse die Stärke der Expression von α 4, α 5, β 1 und α L überprüft. Dabei ergaben sich wie bei den B-Zellen die gleichen Expressionsmuster in WT und *Sly*^{d/d} Zellen und somit die gleiche Ausgangssituation für die Experimente (Daten nicht gezeigt).

Bei den Adhäsionsassays war die spezifische Bindung an Fibronectin, VCAM und ICAM-2 nach 40 Minuten α CD3 Stimulation bei den WT und *Sly*^{d/d}-T-Zellen leicht erhöht, aber nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 20).

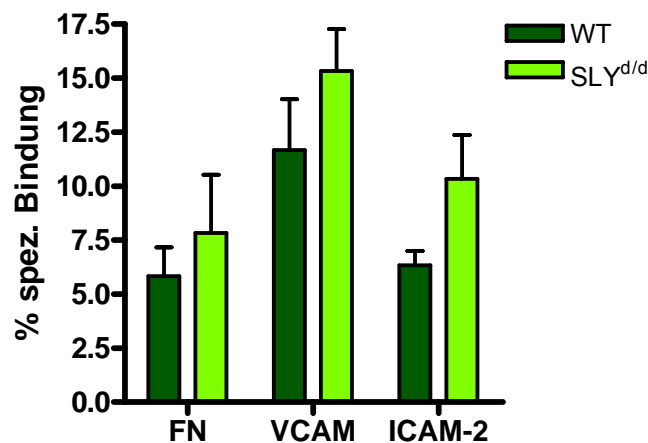


Abb. 20: Adhäsion von T-Zellen. Dargestellt ist die spezifische Bindung der WT (dunkelgrün) und *Sly*^{d/d} T-Zellen nach α CD3 Stimulation an Fibronectin (FN), VCAM und ICAM-2 verglichen mit den jeweiligen unstimulierten Zellen (n=3 bei ICAM-2, n=6 bei VCAM und FN).

Die Funktionalität der *Sly*^{d/d} T-Zellen wird also nicht durch ein verändertes Adhäsionsverhalten an den untersuchten Liganden beeinflusst.

C.2.2.2 *In vivo* Stimulation von T-Zellen mit SEB

Bakterielle Superantigene, wie das Staphylokokken Enterotoxin B (SEB) von *Staphylococcus aureus*, können T-Zellen unabhängig von ihrer Antigen-spezifität durch Bindung an MHC Klasse II-Moleküle Antigen-Präsentierender Zellen stimulieren. Auf T-Zellen bindet SEB an die V β 8 Region der β -Kette des TZR, wodurch ca. 20% der T-Zellen angeregt werden (74). In *Sly^{d/d}* Mäusen konnte keine Veränderung bei der Verteilung der V β -Regionen des TZR festgestellt werden und folglich auch eine normale Anzahl an T-Zellen mit V β 8 (Abb. 16). Nach Injektion von SEB ist zunächst eine Deletion, dann eine Expansion und schließlich wieder eine Deletion der V β 8⁺ T-Zellen zu beobachten. Dies wird durch gezielte Apoptose und klonale Expansion der Zellen hervorgerufen (43).

Ob diese Vorgänge durch SLY ebenso beeinflusst werden wie die *in vitro* Proliferation nach TZR Stimulation, wurde durch Injektion von 5 μ g SEB in 50 μ l PBS / Hinterpfote analysiert. Nach 1, 3 und 7 Tagen wurden die poplitealen Lymphknoten entnommen und die Anzahl der V β 8⁺ T-Zellen mittels FACS-Analyse bestimmt.

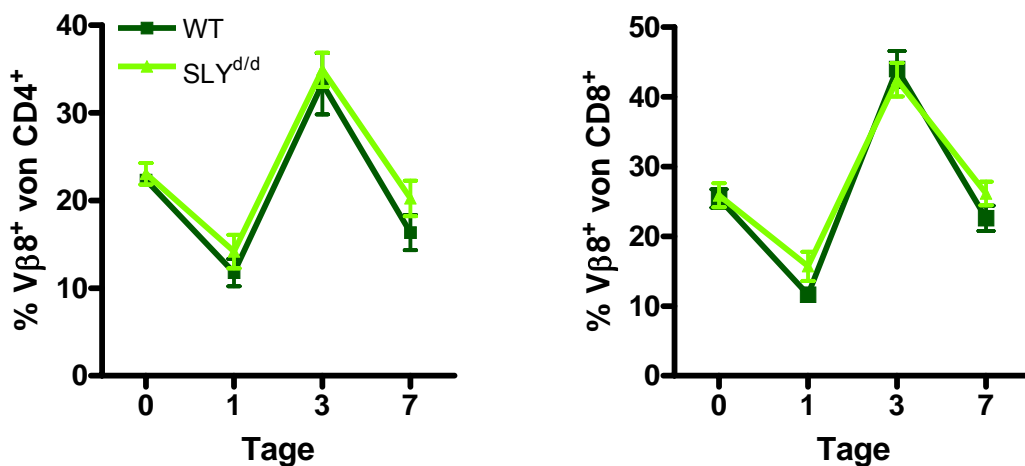


Abb. 21: Anzahl der V β 8⁺ T-Zellen nach SEB-Injektion. Die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, die einen TZR mit V β 8 besitzen, wurden vor und 1, 3 und 7 Tage nach Injektion von 10 μ g SEB analysiert (WT=dunkelgrün, *Sly^{d/d}*=hellgrün; n=4).

24 Stunden nach Injektion des Superantigens zeigte sich eine geringere Anzahl an V β 8⁺ CD4⁺ (12%) und V β 8⁺ CD8⁺ (12%) T-Zellen in den Lymphknoten von *Sly^{+/+}* und *Sly^{d/d}* Tieren verglichen mit der Ausgangssituation (22% CD4⁺ und 27% CD8⁺). Nach 3 Tagen waren 33% CD4⁺ T-Zellen und 44% der CD8⁺ T-Zellen V β 8⁺. 7 Tage nach Injektion von SEB fiel die Menge der V β 8⁺ T-Zellen wieder knapp unter das Ausgangsniveau. Hierbei konnten zu keinem der Zeitpunkte Unterschiede zwischen den *Sly^{d/d}* Mäusen und den Kontrolltieren festgestellt werden (Abb. 21).

Die klonale Expansion und die Deletion durch gezielte Apoptose der V β 8⁺ T-Zellen *in vivo* nach Injektion des Superantigens waren folglich durch SLY nicht beeinträchtigt.

C.2.2.3 Einfluss von SLY auf die Apoptoserate

Eine Erklärung für den geringeren Thymidineinbau bei *Sly*^{d/d} Lymphozyten nach AGR Stimulation könnte eine erhöhte Apoptoserate sein. Obwohl nach Stimulation mit SEB die *in vivo* Apoptose der V β 8⁺ T-Zellen in *Sly*^{d/d} Mäusen nicht beeinflusst war, könnte nach Stimulation mit α CD3, α CD3/ α CD28 oder α CD3/IL-2 die Apoptoserate von *Sly* mutierten T-Zellen *in vitro* verändert sein. 3 Tage nach Stimulation wurden die AnnexinV⁻ Zellen mittels FACS-Analyse bestimmt. AnnexinV ist ein Kalzium-abhängiges Phospholipid-bindendes Protein mit einer sehr hohen Affinität für Phosphatidylserin, welche an der extrazytoplasmatischen Seite der Membran apoptotischer und nekrotischer Zellen vorkommen (72). AnnexinV⁺ Zellen sind somit Zellen, die in Apoptose oder Nekrose gegangen sind.

Bei der Anzahl der AnnexinV⁻ CD4⁺ T-Zellen waren nach 3 Tagen keine Unterschiede zwischen WT und *Sly*^{d/d} Mäusen zu erkennen. Bei den CD8⁺ T-Zellen zeigte sich eine geringere Überlebensrate der *Sly*^{d/d} Zellen nach α CD3 Stimulation. Mit α CD3/ α CD28 und α CD3/IL-2 Stimulation war die AnnexinV-Färbung bei WT und *Sly*^{d/d} CD8⁺ T-Zellen vergleichbar (Abb. 22).

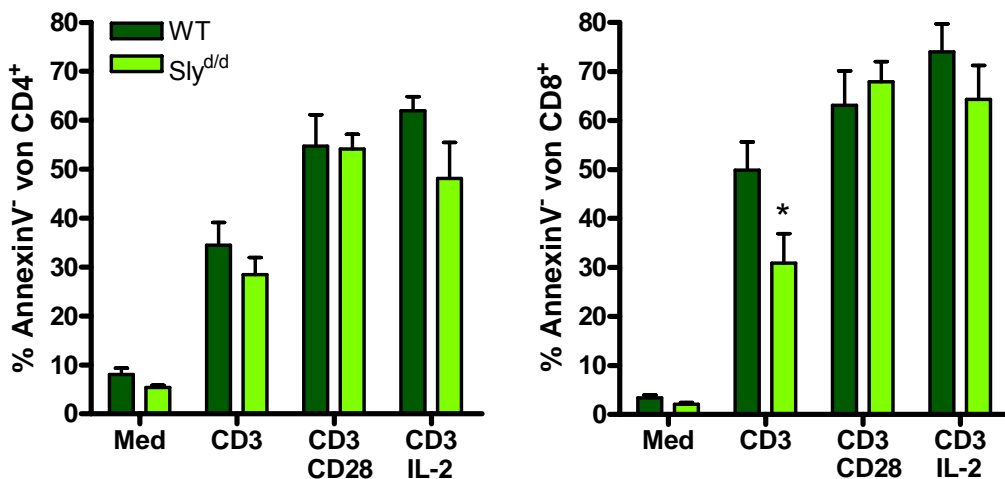


Abb. 22: Apoptose bei T-Zellen. CD4⁺ (links) und CD8⁺ (rechts) T-Zellen von WT (dunkelgrün) und *Sly*^{d/d} (hellgrün) Mäusen wurden 3 Tage mit 2 μ g α CD3, 0,4 μ g α CD3/2,5 μ g α CD28 oder 2 μ g α CD3/10 ng IL-2 pro ml stimuliert und mittels FACS-Analyse die Anzahl der AnnexinV⁻ Zellen bestimmt (n=6; * p<0,05).

Nach allogener Stimulation der *Sly*^{d/d} T-Zellen konnte sowohl bei CD4⁺ als auch bei CD8⁺ T-Zellen eine geringere Proliferationsrate im Vergleich zu WT Zellen beobachtet werden (siehe A.6.2). Der geringe Unterschied bei der Überlebensrate von CD8⁺ T-Zellen kann dies allerdings nicht erklären.

Um eine erhöhte Stressanfälligkeit als Auslöser von Apoptose auszuschließen, wurden Thymozyten den verschiedensten Stressbedingungen, wie Serumentzug, Hitze oder Sorbitol, ausgesetzt und über Nacht kultiviert. Durch Verminderung des Serumgehaltes wird die

Nährstoffzufuhr vermindert, Sorbitol ist eine Hexose die einen osmotischen Schock verursacht. Als Positivkontrolle des Assays diente Staurosporin, ein starker Protein-Kinase-Inhibitor, der eine hohe Apoptoserate auslöst (33). Der Anteil der AnnexinV⁺ Zellen, d.h. apoptotische oder nekrotische Zellen, wurde mittels FACS-Analyse bestimmt (Abb. 23). Auch hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und SLY mutierten T-Zellen.

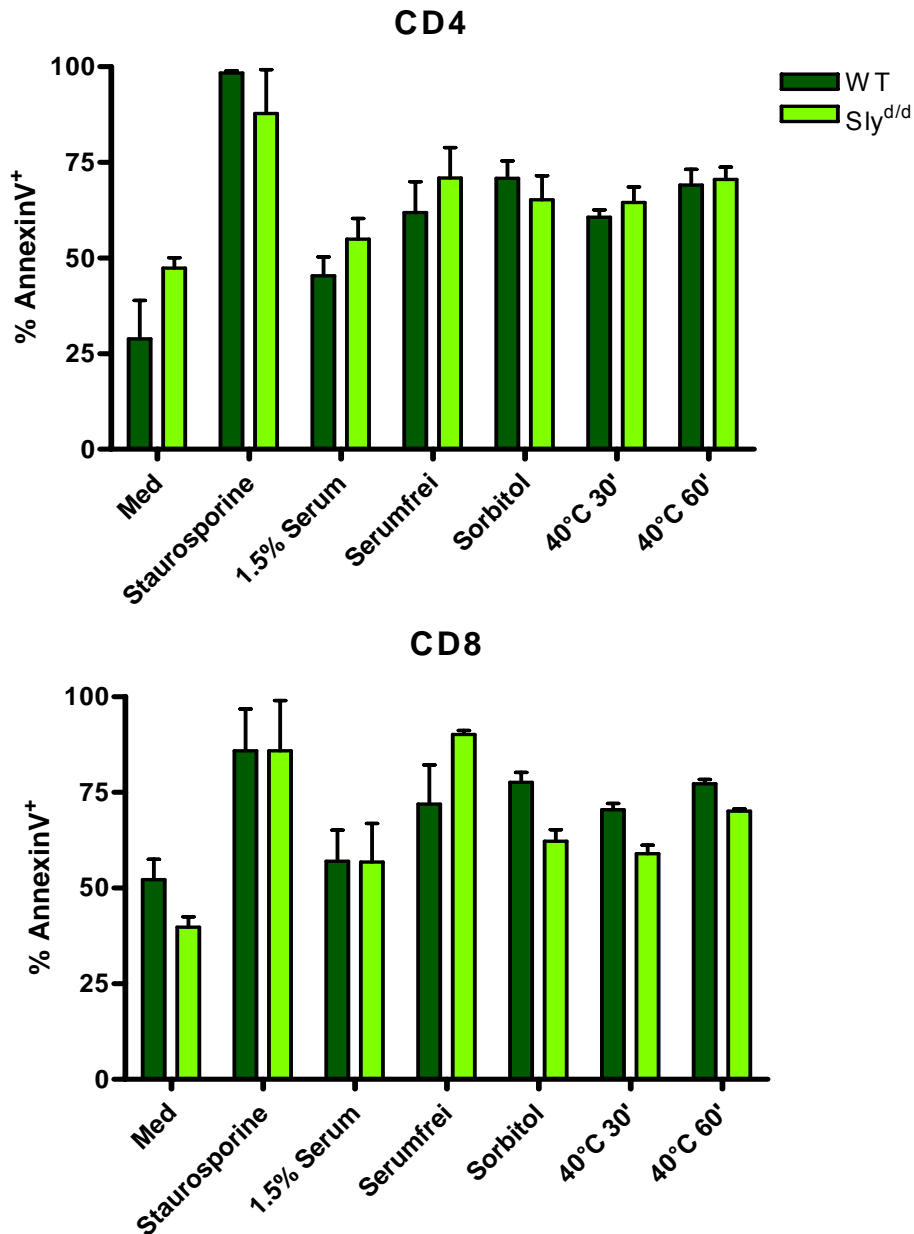


Abb. 23: T-Zell Apoptose. CD4⁺ (oben) und CD8⁺ (unten) T-Zellen von WT (dunkelgrün) und *Sly^{d/d}* (hellgrün) Mäusen wurden durch Verringerung des Serumgehaltes (1,5% oder Serumfreie Bedingungen), Zugabe von Sorbitol (200 mM für 30') oder Staurosporin (1 mM) und durch kurzzeitige Erhöhung der Temperatur (30' bzw. 60' 40°C) gestresst und anschließend über Nacht in Medium kultiviert. Durch FACS-Analyse wurde die Anzahl der AnnexinV⁺ Zellen bestimmt (n=4).

Eine erhöhte Anfälligkeit für Apoptose ist also nicht die Erklärung für die verminderte Proliferation SLY mutierter Zellen.

C.2.2.4 Zytotoxische T-Zell Aktivität von *Sly^{d/d}* Mäusen

Nachdem bei *Sly^{d/d}* Mäusen ein Defekt in der T-Zell Aktivierung und Proliferation festgestellt werden konnte, wurde in einem nächsten Schritt die zytotoxische Aktivität der SLY mutierten CD8⁺ T-Zellen analysiert. Dazu erhielten die Tiere eine Injektion aus Ovalbumin (OVA) als Antigen zusammen mit CpG 1668 als Adjuvans subkutan in die Hinterpfoten, Kontrollgruppen wurden lediglich mit Ovalbumin immunisiert. CpG 1668 wirkt als Adjuvans, indem es das Immunsystem über den Toll-like Rezeptor 9 (TLR9) stimuliert.

Nach vier Tagen wurden die poplitealen und inguinalen Lymphknoten auf beiden Seiten entnommen und die daraus gewonnenen Zellen für weitere vier Tage *in vitro* expandiert. Anschließend wurde die spezifische Zytotoxizität der aktivierten CD8⁺ T-Zellen in einem CTL Chrom-Assay ermittelt. Als Zielzellen dienten mit ⁵¹Cr markierte EL-4 Zellen, welche mit dem SIINFEKL-Peptid, das aus der Ovalbuminsequenz abgeleitet ist, beladen wurden. Die Zielzellen sollten von den *in vivo* induzierten und *in vitro* expandierten T-Zellen lysiert werden, und so dass radioaktive Chrom freisetzen. EL-4 Zellen ohne Peptid dienten als Negativkontrolle. Das Effektor/Zielzell-Verhältnis wurde von 50/1 in 1:2 Verdünnungsschritten titriert. Nach 4h wurde das freigesetzte radioaktive Chrom im Überstand mit einem γ -Counter vermessen.

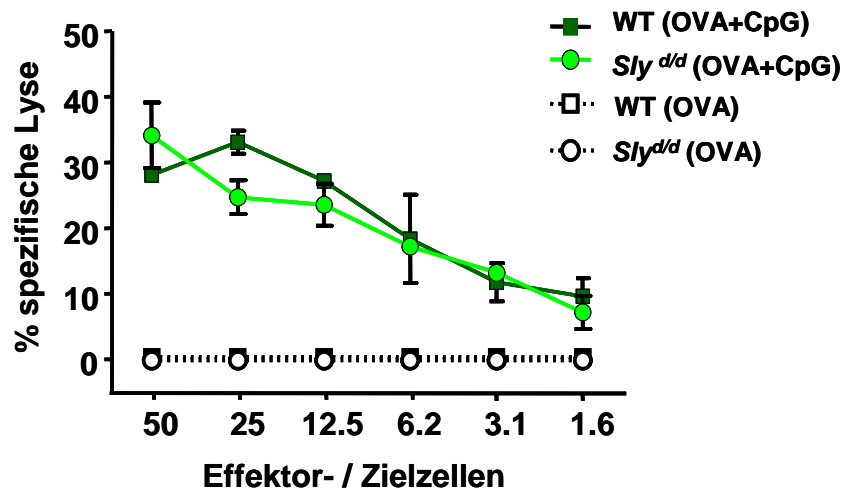


Abb. 24: Zytotoxizität. Spezifische Lyse der Zielzellen durch WT (dunkelgrüne Vierecke) und *Sly^{d/d}* (hellgrüne Kreise) CD8⁺ T-Zellen nach Stimulation mit OVA/CpG und als Kontrolle mit Ovalbumin (OVA) alleine (gepunktete Linien) (n=3).

Hierbei ergaben sich, wie in Abbildung 24 zu erkennen ist, gleiche zytotoxische Eigenschaften der CD8⁺ WT und *Sly^{d/d}* Zellen mit CpG 1668 als Adjuvans und Ovalbumin als Antigen. Zur Kontrolle wurde Mäusen nur Ovalbumin injiziert. Diese isolierten CD8⁺ T-

Zellen zeigen weder bei WT noch bei *Sly^{d/d}* Mäusen zytotoxische Aktivitäten. Die zytotoxische Funktion der CD8⁺ T-Zellen wird unter diesen Bedingungen nicht durch die Mutation in SLY beeinflusst.

C.2.3 Signalkaskaden bei *Sly^{d/d}* T-Zellen nach AGR Stimulation

C.2.3.1 Analyse des Ca²⁺ Flusses

Nach Stimulation des TZR ist eines der frühesten Signal-Ereignisse in der Zelle die Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels. Die Phosphorylierung von SLY nach TZR Stimulation weist auf einen Einfluss von SLY auf den T-Zell Rezeptor Signalweg hin (3).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Milzzellen mit biotinylierten α CD3 beladen, mit α CD4 bzw. α CD8 gefärbt, mit dem Ca²⁺-bindenden Farbstoff Fluo-4,AM beladen und anschließend durch Vernetzung der biotinylierten α CD3-Antikörper mit Streptavidin stimuliert. Vor und nach der Stimulation wurde der intrazelluläre Ca²⁺-Spiegel an Hand der Fluoreszenzintensität von Fluo-4,AM ermittelt. Fluo-4,AM ist das Acetyloxymethylester-Derivat des Fluoreszenzfarbstoffs, der in die Zelle diffundiert und dort durch Abspaltung der Estergruppen aktiv wird. Nach Bindung von Ca²⁺ erhöht sich die Fluoreszenzintensität bei 488 nm bis auf das 100-fache im Vergleich zu dem Farbstoff, der kein Ca²⁺ gebunden hat.

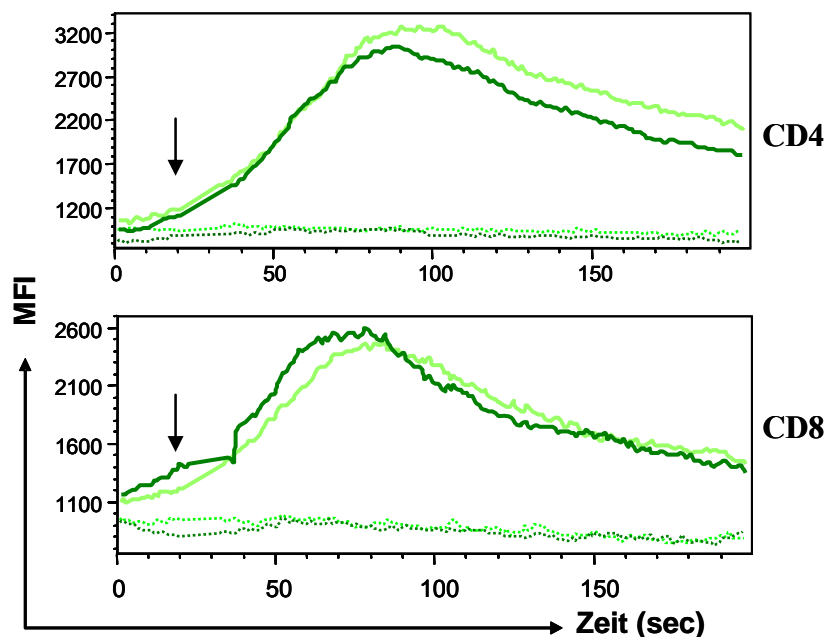


Abb. 25: Ca²⁺-Fluss bei T-Zellen. Bei CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von WT (dunkelgrün) und *Sly^{d/d}* Mäusen (hellgrün) wurden nach Zugabe von Streptavidin (↓) die gebundenen α CD3-Antikörper quervernetzt und dadurch die Zellen stimuliert. Als Kontrollen dienten T-Zellen ohne α CD3 Zugabe (gepunktete Linien) (n=4).

In beiden Zelltypen konnte eine Erhöhung des Ca^{2+} Spiegels nach Stimulation nachgewiesen werden, jedoch zeigten sich weder bei den CD4^+ noch bei den CD8^+ T-Zellen Unterschiede beim Ca^{2+} -Fluss zwischen WT und $\text{Sly}^{d/d}$ Zellen. Dieses frühe Ereignis in der Signalkaskade nach AGR Stimulation ist also nicht von SLY abhängig.

C.2.3.2 Tyrosin-Phosphorylierung nach AGR Stimulation

Nach Stimulation des AGR wird intrazellulär eine Signalkaskade ausgelöst, die verschiedene Protein-Tyrosin-Kinasen aktiviert und viele Proteine phosphoryliert, unter anderem auch SLY. Um den Effekt der SLY Mutation auf die AGR induzierte Tyrosin-Phosphorylierung zu untersuchen, wurden aufgereinigte T-Zellen der Milz mit $2 \mu\text{g}$ αCD3 stimuliert und mittels Western-Blot (WB) mit einem anti-Phospho-Tyrosin-Antikörper analysiert. Dabei zeigte sich bei keinem der untersuchten Zeitpunkte ein reproduzierbarer Unterschied im Tyrosin-Phosphorylierungsmuster von WT und $\text{Sly}^{d/d}$ -T-Zellen (Abb. 26).

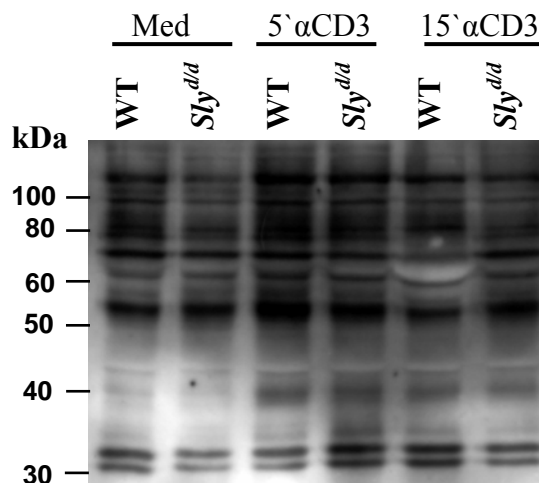


Abb. 26: Gesamt-Tyrosin-Phosphorylierung. WT und $\text{Sly}^{d/d}$ T-Zellen der Milz wurden mit αCD3 stimuliert und mit einem Anti-Phospho-Tyrosin-Antikörper die Tyrosin-Phosphorylierung der Proteine im Westen-Blot nachgewiesen (n=3).

Betrachtet man diese Daten zusammen mit dem unveränderten Ca^{2+} -Fluss nach AGR Stimulation, zeigten $\text{Sly}^{d/d}$ -T-Zellen im Vergleich zu WT-Zellen keine Veränderung in den frühen Ereignissen der TZR Signalkaskade. Eine Beeinflussung von späteren Signalereignissen durch SLY ist aber nicht auszuschließen.

C.2.3.3 Analyse der MAP-Kinasen

Nach TZR Stimulation kommt es zur Phosphorylierung von verschiedenen MAP-Kinasen, wie p38, ERK und JNK, mit nachfolgender Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Für die Analyse von aktiviertem p38 und ERK wurden T-Zellen mit $2 \mu\text{g}$ αCD3 für verschiedene

Zeitpunkte stimuliert und die Phosphorylierung von ERK mittels Western-Blot und die Phosphorylierung von p38 mittels ELISA nachgewiesen. Die Werte von P-p38 wurden mit gesamtem p38 normalisiert und auf unstimuliert bezogen. Es konnten aber bei beiden MAP-Kinasen keine Unterschiede zwischen WT und *Sly*^{d/d} Zellen festgestellt werden. Als Kontrolle diente die Stimulation mit 10 ng PMA/1 µg Ionomycin, das die Zellen nicht über den TZR aktiviert, sondern intrazellulär über PKC und so zu einer starken Phosphorylierung der MAP-Kinasen führt. Dies war sowohl bei WT als auch bei *Sly*^{d/d} Zellen zu erkennen. Die MAP-Kinasen p38 und ERK sind somit nicht durch SLY reguliert (Abb. 27a und b) und liefern damit keinen Hinweis auf die genaue Funktion von SLY im AGR Signalweg.

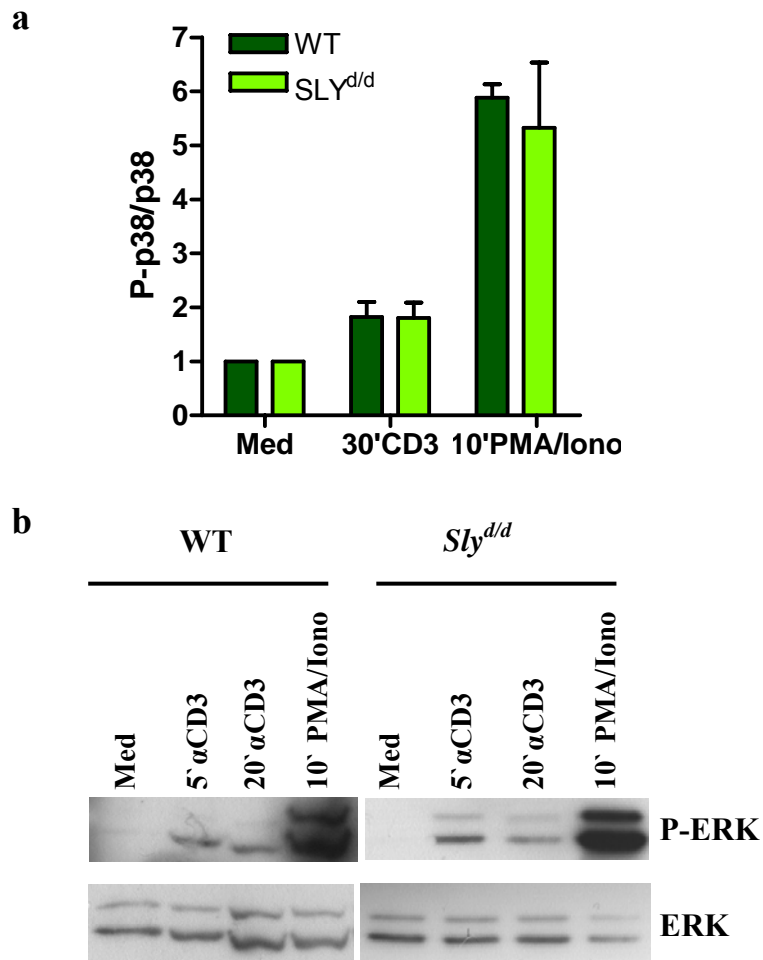


Abb. 27: MAP-Kinasen Aktivierung. a) Das Verhältnis von P-p38 zu p38 von WT (dunkelgrün) und *Sly*^{d/d} (hellgrün) Mäusen, bezogen jeweils auf die unstimulierte Probe (n=5). b) WB von WT und *Sly*^{d/d} T-Zellen nach Stimulation mit αCD3 bzw. PMA/Ionomycin zum Nachweis von P-ERK und ERK (n=4).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die bisherige Analyse der Signalkaskade in AGR stimulierten Zellen keinen Hinweis auf die Funktion von SLY im Antigen Rezeptor-Signalweg liefert.

C.3 In vivo Modell aGVHD

Die Graft-versus-Host-Disease stellt eine spezielle Situation in der Transplantationsimmunologie dar, bei der Lymphozyten des Spenders aus dem Transplantat (Graft) mit Alloantigenen des Empfängers (Host) reagieren. Die T-Zellen des Spenders erkennen die Zellen des Empfängerorganismus als fremd und verursachen ein systemisches Krankheitsbild mit spezifischer Einbeziehung von Haut, Leber, Darm und Auge. Um die GVHD zu minimieren, sollten bei einer Transplantation Spender und Empfänger möglichst ähnliche Gewebeantigene (Haupthistokompatibilitätskomplexe, HLA) besitzen. Obwohl die GVHD bei allogenen Stammzell- oder Knochenmarkstransplantationen ein Gesundheitsrisiko darstellt, kann eine moderate Form dem Empfänger nutzen, wenn die T-Zellen des Transplantats Tumorzellen des Wirtes zerstören (Graft-versus-Tumor-Effekt) (62).

Murine GVHD Experimente dienen als Modell für akute und chronische GVHD nach allogener Knochenmarkstransplantation sowie zur Analyse von T-Zell-Funktionen, Induktion von Toleranz und Autoimmunerkrankungen (16, 56). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die akute GVHD nach Transfer von allogenen Lymphozyten in subletal bestrahlte Empfängertiere als *in vivo* Modell für die Funktionalität der *Sly^{ddl}* T-Zellen verwendet. Dazu wurden parentale Spenderzellen (H-2^b) in F1-Empfänger (H-2^{bxd}) übertragen, wodurch hauptsächlich die T-Zellen des Spenders aktiviert werden (31).

Die akute GVHD ist ein mehrstufiger Prozess. In der ersten Phase werden die APCs des Empfängers konditioniert. Durch die Bestrahlung kommt es zu Gewebeschäden und zur Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen, wie TNF- α und IL-1, die die APCs aktivieren. In der zweiten Phase nach der Transplantation präsentieren die Empfänger-APCs den Spender-T-Zellen Alloantigene und aktivieren diese. Die T-Zellen proliferieren, differenzieren zu Effektorzellen aus und sekretieren Zytokine, wie IL-2 und INF- γ . Dadurch werden zytotoxische T-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen aktiviert und weitere Zytokine, wie TNF- α und IL-1, sekretiert. Diese inflammatorischen Zytokine fördern die Produktion von inflammatorischen Chemokinen, die die Effektorzellen in die Zielorgane locken. In der dritten Phase werden die Makrophagen durch systemische Endotoxine stimuliert, die aus dem durch die Bestrahlung beschädigten Gastrointestinaltrakt (GI) kommen. Dies verursacht lokale Gewebeschäden und eine weitere Sekretion von inflammatorischen Zytokinen und eine systemische Entzündung. Zusammen mit den NK- und zytotoxischen T-Zellen führt dies zum Organversagen bis hin zum Tod des Empfängertieres (Abb. 28). In dieser Phase der akuten GVHD ist sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem involviert (18, 55). Somit stellt dieses System ein gutes *in vivo* Modell zur Analyse der Effektivität der Immunantworten in *Sly^{ddl}*-Mäusen dar, wobei besonderes Augenmerk auf die T-Zellen gelegt wird.

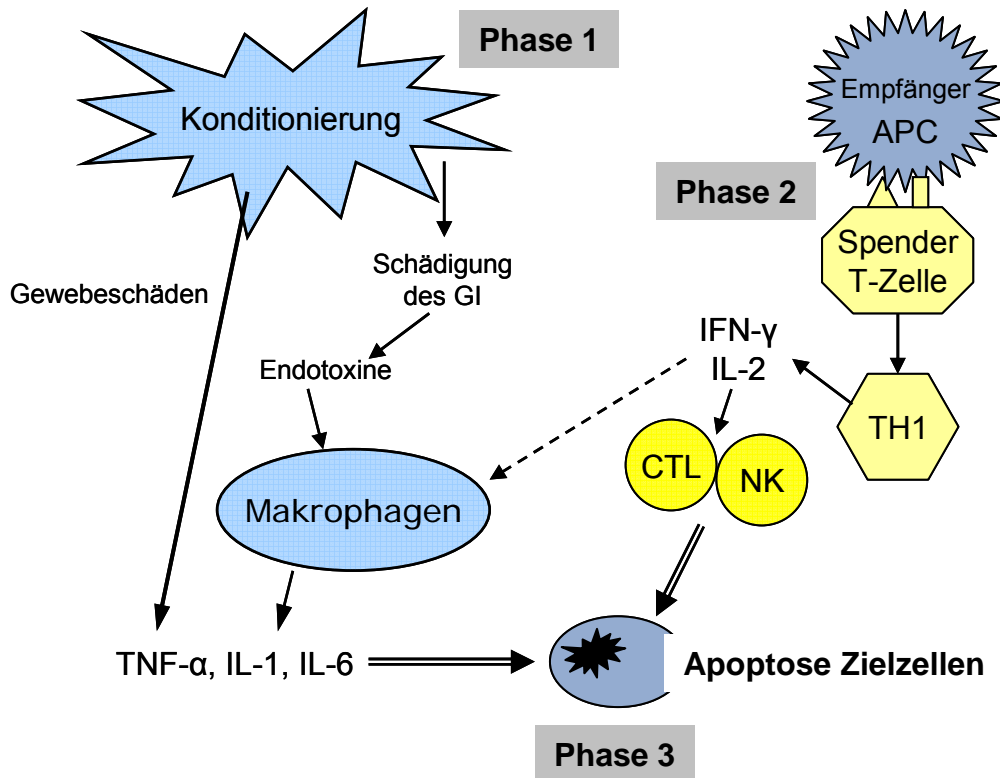


Abb. 28: Die drei Phasen der akuten GVHD. In der ersten Phase werden die APCs des Empfängers konditioniert und inflammatorische Zytokine ausgeschüttet. In Phase 2 werden die Spender T-Zellen aktiviert, differenzieren zu Effektorzellen und produzieren IFN- γ und IL-2. In der dritten Phase verursachen die Effektorzellen Gewebeschäden bis hin zum Organversagen (GI=Gastrointestinaltrakt, CTL=cytotoxische T-Zelle, NK=Natürliche Killerzellen; nach (13)).

C.3.1 Überleben nach Induktion einer aGVHD

Nach Bestrahlung der F1-Empfängermäuse ($H-2^{bxd}$) wurden 5×10^7 C57BL/6 bzw. $Sly^{d/d}$ Milzzellen (beide $H-2^b$) i.v. in die Schwanzvene injiziert. Als syngene Kontrolle dienten F1-Mäuse, denen F1-Zellen injiziert wurden. Nach 15 Tagen waren alle Mäuse mit WT-Spenderzellen verstorben, bei den $Sly^{d/d}$ Spenderzellen dauerte dies 22 Tage (Abb. 29a). Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Das tendenziell längere Überleben der Mäuse mit $Sly^{d/d}$ -Empfängerzellen lässt sich vermutlich auf die verringerte Proliferation und Zytokinproduktion der T-Zellen nach Stimulation zurückführen.

Um eventuelle Unterschiede zu verdeutlichen, wurden die gleichen Experimente mit einer geringeren Spender-Zellzahl durchgeführt. Mit 2×10^7 Milzzellen lebten 100 Tagen nach Injektion 12,5% der Mäuse mit WT und 25% der Mäuse mit $Sly^{d/d}$ Spenderzellen (Abb. 29b). Auch diese Differenz ist nicht signifikant. Obwohl die Proliferation von SLY mutierten T-Zellen nach Antigen Präsentation durch APCs verringert war (siehe A.6.2), zeigte sich kein gravierender Unterschied im Überleben nach Induktion einer GVHD.

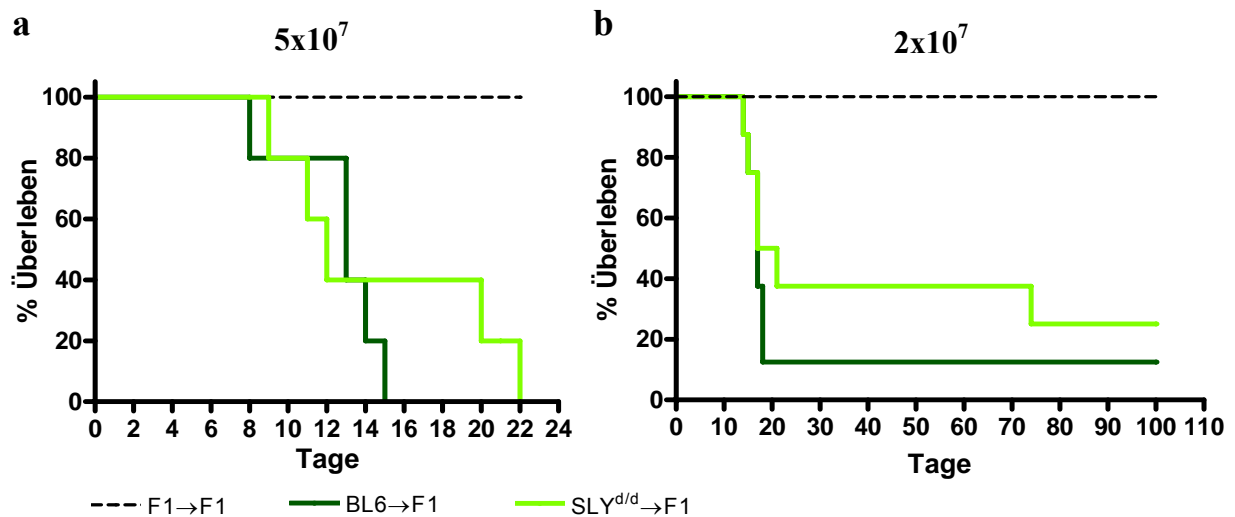


Abb. 29: GVHD Überlebenskinetik. Überlebenskinetik der Empfängermäuse nach Injektion von a) 5×10^7 Spenderzellen (n=5) und b) 2×10^7 Spenderzellen (n=8) von F1 (schwarz gestrichelt), WT (dunkelgrün) und $Sly^{d/d}$ (hellgrün) Mäusen.

C.3.2 Gewichtsverlust während einer aGVHD

Die akute GVHD äußert sich frühzeitig durch einen Gewichtsverlust der Empfängertiere. Vier Tage nach der Bestrahlung hatten die Empfängertiere bis zu 10% ihres Körpergewichtes verloren. Kam es wie bei den F1-Spendern zu keiner akuten GVHD, erholten sich die Mäuse und erreichten 3-4 Tage später wieder ihr Ausgangsgewicht. Erkrankte die Maus an einer akuten GVHD, führte dies weiter zu Gewichtsverlust. Die mit 5×10^7 Spenderzellen injizierten Tiere nahmen bis ca. Tag 8 ab und dann bis zu Tag 12 langsam wieder zu. Bei den bis dahin überlebenden Tieren kam es dann zu einem weiteren starken Verlust des Körpergewichtes bis

zu ihrem Tod (Abb. 30a). Die mit 2×10^7 Spenderzellen injizierten Tiere nahmen ebenfalls alle stark ab. Die Mäuse, die bis Tag 20 noch am Leben waren, erholten sich langsam wieder und nahmen dann weiter zu. Nach ca. 30 Tagen kam es erneut zu einem Verlust des Körpergewichtes, der dann aber wieder ausgeglichen werden konnte (Abb. 30b). Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Mäusen mit WT und $Sly^{d/d}$ Empfängerzellen, weder nach Injektion von 5×10^7 noch von 2×10^7 Zellen.

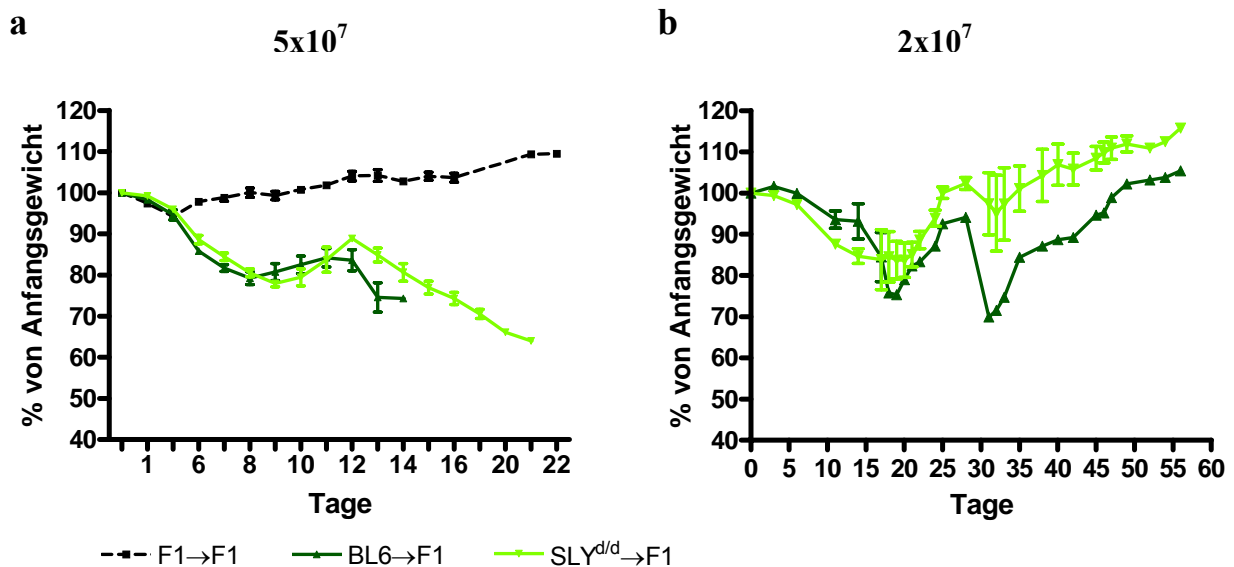


Abb. 30: GVHD Gewichtsveränderungen. a) Gewichtsveränderungen der Empfängermäuse nach Injektion von 5×10^7 Spenderzellen (F1 n=3, BL6 und $Sly^{d/d}$ n=5) b) Gewichtsveränderungen nach Injektion von 2×10^7 Spenderzellen (n=5). F1=schwarz gestrichelt, WT=dunkelgrün, $Sly^{d/d}$ =hellgrün.

C.3.3 Analyse der Organschäden während einer aGVHD

7 Tage nach Injektion von 5×10^7 Spenderzellen wurde den Mäusen Blut entnommen und die Menge an Alanin-Amino-Transferase (ALT) im Serum nachgewiesen. ALT kommt vor allem im Zytosol von Leberzellen vor und gelangt innerhalb von 12h nach Schädigung dieser Zellen ins Blut der Tiere. Ein erhöhter ALT-Spiegel ist somit ein Indikator für einen Leberschaden. Mäuse mit F1-Spenderzellen hatten wie erwartet einen niedrigen, Mäuse mit BL6 und $Sly^{d/d}$ -Spenderzellen einen stark erhöhten ALT-Spiegel (Abb. 31). Die vergleichbaren ALT-Werte in den Mäusen mit WT und $Sly^{d/d}$ Spenderzellen deuteten auf einen ähnlich starken Leberschaden hin.

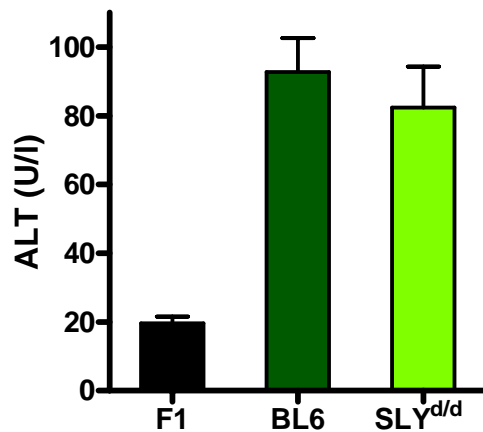


Abb. 31: GVHD ALT-Werte. 7 Tage nach Injektion von 5×10^7 F1 (schwarz), C57BL/6 (dunkelgrün) und *Sly^{d/d}* (hellgrün) Spenderzellen wurde die Menge an Alanin-Aminotransferase (ALT) im Serum der Mäuse nachgewiesen (F1 n=5, BL6 und *Sly^{d/d}* n=7).

Sly^{d/d} Lymphozyten führten somit zu keiner veränderten akuten GVHD in F1 Spenderzellen. Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den WT und *Sly^{d/d}* Spenderzellen in Überleben, Organschäden und Gewichtsverlauf zu erkennen.

Zusammenfassend zeigte sich in diesem *in vivo* Modell keine signifikante Beeinflussung von SLY auf die Effektivität der Immunzellen. Bei der GVHD sind vor allem $CD8^+$ -T-Zellen beteiligt. Durch die normale zytotoxische Funktion, die ebenfalls im CTL-Assay nachgewiesen wurde, wurden mögliche andere Beeinflussungen durch SLY nicht sichtbar.

D DISKUSSION

Die Stimulation des Antigenrezeptors in B und T Zellen führt zur Aktivierung von verschiedenen Signalwegen, die das Überleben und die Differenzierung unreifer Lymphozyten sowie die Proliferation und die Effektorfunktionen reifer, aktivierter B und T Zellen steuern (28). Ist ein Protein in einem dieser Signalwege in seiner Funktion z.B. durch eine Mutation gestört, hat dies oft weit reichende Folgen für Zellen und ihre Funktionen. Eine wichtige Rolle in diesen Signalkaskaden spielen Adaptorproteine, die Protein-Protein-Interaktionen ermöglichen und so unter anderem die Funktion von Kinasen steuern (29). Manche Adaptorproteine kommen in fast allen Zellen vor, andere, wie das Lymphozyten-spezifische Adaptorprotein SLY, werden zellspezifisch exprimiert (5). SLY wird nach Aktivierung des Antigenrezeptors in B und T Lymphozyten phosphoryliert (3) und spielt eine bisher noch unbekannt Rolle im Immunsystem. Um die Funktion von SLY zu analysieren, wurde ein Mausstamm *Sly^{d/d}* generiert, der eine Mutation in SLY enthält (4). Diese Mutation führt zum Verlust der Phosphorylierungsstelle Ser27 und dem C-terminalen Teil der Kernlokalisations-Sequenz. Das mutierte Protein konnte im Gegensatz zum WT Protein, das im Kern und Zytoplasma lokalisiert ist, nur im Zytoplasma der Zellen detektiert werden. Die Auswirkungen der Mutation in SLY auf die Funktion sowie die Rolle von SLY im Immunsystem sollten im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht werden.

D.1 Der Einfluss von SLY auf B-Zellen

Aus Vorversuchen war bekannt, dass *Sly^{d/d}* Mäuse geringere Zellzahlen in Thymus, Milz und den peripheren Lymphknoten aufwiesen. Nach Antigenrezeptor Stimulation von T-Zellen war die Proliferation genauso wie die Zytokinproduktion signifikant verringert. Auch war der basale Immunglobulinspiegel im Serum von *Sly^{d/d}* Mäusen erniedrigt. Ebenso konnte eine verminderte Immunantwort auf T-Zell abhängige und unabhängige Antigene festgestellt werden. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass SLY einen starken Einfluss auf die Funktion und die Entwicklung von B-Lymphozyten haben könnte.

Die genaue Analyse der B-Zell Entwicklung zeigte eine selektive Veränderung in *Sly^{d/d}* Tieren. Die B-Zell Entwicklung im Knochenmark war unauffällig und im Peritoneum befanden sich vergleichbare Mengen an B1-B Zellen. Allerdings wurden in der Milz signifikant weniger Marginalzonen B-Zellen gefunden. Alle anderen Entwicklungsstufen in der Milz, wie die „newly formed“, die Vorläufer der folliculären und der Marginalzonen B-Zellen und die reifen folliculären B-Zellen waren in normaler Anzahl vorhanden.

Ein Grund für die verringerte Anzahl an MZB in *Sly^{d/d}* Mäusen könnte eine veränderte Expression von SLY in Marginalzonen B-Zellen sein. Dies konnte jedoch durch die Analyse

der *Sly*-mRNA Mengen in MZB und FB ausgeschlossen werden. Die Expression von *Sly* war in den *Sly*^{d/d} Zellen höher als in den WT Zellen, jedoch wurden vergleichbare mRNA Mengen von *Sly* in Follikulären und Marginalzonen B-Zellen einer Maus detektiert.

Eine andere Erklärung für die geringeren Mengen an MZB könnte ein Defekt in der Einwanderung der Zellen in die Marginalzone der Milz sein. Integrine wie LFA-1 (α L β 2) und α 4 β 1 sind für die Einwanderung der B-Zellen in die Milz und in deren Kompartimente verantwortlich (39, 41). Marginalzonen B-Zellen haben eine höhere Expression dieser Integrine auf ihre Oberfläche als die follikulären B-Zellen und binden so wahrscheinlich stärker an ICAM-1 und VCAM-1 auf den hematopoetischen und endothelialen Zellen in der Marginalzone (40, 41). Diese Bindung hält vermutlich die MZB im Ruhezustand in der Marginalzone. Nach FACS-Analysen der FB und MZB konnten aber keine Unterschiede in der Expression von α 4, β 1 und α L auf WT und *Sly*^{d/d} Zellen nachgewiesen werden. Die höhere Expression von α L auf MZB im Vergleich zu FB war sowohl auf WT, als auch auf *Sly*^{d/d} Zellen sichtbar. Eine stärkere Expression von α 4 β 1 auf MZB im Vergleich zu FB, wie Lu und Cyster (41) beschreiben, konnte allerdings nicht gezeigt werden. Da β 1 aber nicht nur an α 4, sondern noch an einige andere α -Ketten bindet (26), kam die verstärkte Expression von α 4 β 1 auf den MZB in der gesamten Expression von β 1 eventuell nicht zum Vorschein. Eine Erklärung für die geringeren Mengen an MZB in *Sly*^{d/d} Mäusen liefern diese Ergebnisse jedenfalls nicht.

Neben den Integrinen sind auch Chemokine und ihre Rezeptoren an der Einwanderung von Lymphozyten in ihre Kompartimente beteiligt (65). Im Fall der B-Zellen sind die Rezeptoren CXCR5 und CCR7 und ihre Liganden, die Chemokine CXCL13 und CCL21, wichtig (15, 44). Deutlich wird dies im Mausmodell mit defektem CXCR5 und CCR7, bei dem es zu einer völligen Blockierung der B-Zell Einwanderung in die Milz kommt (44). Eine Veränderung der Expression der Chemokinrezeptoren könnte somit die geringere Anzahl an MZB in *Sly*^{d/d} Mäusen erklären. Doch auch hier konnten keine Unterschiede in der Expression der Chemokinrezeptoren CXCR5 und CCR7 auf MZB und FB zwischen WT und *Sly*^{d/d} Mäusen festgestellt werden. Die Ursache für die geringere Anzahl an MZB in *Sly*^{d/d} Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen ist also weder eine veränderte Expression der Integrine noch der Chemokinrezeptoren auf den B-Zellen und damit keine Beeinflussung der Einwanderung der B-Zellen in die Marginalzone. Ob die Einwanderung in die Milz und deren Kompartimente durch andere Faktoren verändert ist, konnte nicht ausgeschlossen werden. Durch die normale Anzahl an FB in *Sly*^{d/d} Mäusen ist ein allgemeiner Defekt aber eher unwahrscheinlich.

Die MZB und FB differenzieren nach Aktivierung des Antigenrezeptors zu funktionellen Effektorzellen aus. Eine wichtige Funktion der Lymphozyten ist die klonale Expansion, d.h. die Proliferation nach Aktivierung des Antigenrezeptors. Hierbei konnten nach Stimulation mit α IgM/ α CD40 keine Defizite bei den *Sly*^{d/d} follikulären B-Zellen im Vergleich zu WT

Zellen festgestellt werden. Die Proliferation der Marginalzonen B-Zellen war in *Sly^{d/d}* Mäusen im Vergleich zu WT Zellen allerdings stark vermindert. Bei diesen Zellen ist somit nicht nur die Entwicklung, sondern auch die Funktion durch SLY beeinflusst.

Eine mögliche Erklärung für die Defizite bei der Entwicklung und der Proliferation der MZB könnte eine veränderte BZR Signalkaskade sein. Alle B-Zellen brauchen zum Überleben entweder ein konstitutives oder ein tonisches BZR Signal. Eine Theorie besagt, dass die Stimulation des BZR in einer Liganden-unabhängigen Weise erfolgt. Einer anderen Theorie nach erfolgt sie durch Autoantigene, die ähnliche B-Zell-Rezeptoren auf unreifen und transitionellen B-Zellen erkennen und so die Signale zum Überleben liefern (47, 50). Wären diese Signale in *Sly^{d/d}* MZB gestört, könnte dies zu einem schlechteren Überleben der Zellen und somit zu einer verminderten Anzahl an MZB in der Milz führen. Warum allerdings nur die MZB und nicht die FB in der *Sly^{d/d}* Maus betroffen sind, lässt sich allein mit dieser Theorie nicht erklären. Vielleicht wirkt sich ein schwächeres Überlebenssignal bei den langlebigeren Marginalzonen B-Zellen eher aus, da sie dieses Signal öfter benötigen oder das Überlebenssignal muss bei MZB im Vergleich zu FB stärker sein.

Die Signalstärke, ausgelöst durch BZR-Stimulation, spielt bei der Entwicklung einer B-Zelle zur MZB oder FB ebenfalls eine Rolle. Es gibt allerdings gegensätzliche Meinungen, wie sich die Signalstärke auf die Entwicklung der B-Zellen auswirkt. Es gibt Daten, die darauf hinweisen, dass ein schwaches BZR Signal die Entwicklung von MZB fördert, und ein stärkeres Signal die Entstehung von FB auslöst (51, 52). Andererseits konnte gezeigt werden, dass ein starkes BZR-Signal zur Entwicklung von MZB und ein schwaches Signal zur Entwicklung von FB führt (7, 8, 42). Eine Deletion von CD19, *pyk2* oder der p110 δ Untereinheit der PI3-Kinase hat ein vermindertes BZR Signal zur Folge und damit eine Reduktion der Marginalzonen B-Zellen (11, 22, 57, 61). Ein vermindertes BZR-Signal in *Sly^{d/d}* Mäusen könnte demnach die Ursache für die verminderte Anzahl an MZB in *Sly^{d/d}* Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen sein.

Die verminderte Proliferationsaktivität der *Sly^{d/d}* Marginalzonen B-Zellen kann ebenfalls aus einer veränderten BZR Signalkaskade herrühren. SLY kann somit in einem Signalweg involviert sein, der für die Entwicklung, für das Überleben und die Proliferation von Marginalzonen B-Zellen wichtig ist. Die genaue Analyse der BZR Signalkaskade in MZB ist allerdings schwierig, da die Anzahl der gewonnenen Marginalzonen B-Zellen aus einer *Sly^{d/d}* Maus äußerst gering ist und eine Analyse der Signalkaskade in FB nicht unbedingt Aufschluss über die Situation in den MZB geben kann.

Neben der Proliferation wurde auch die Funktionalität der B-Zellen in einer T-Zell unabhängigen Immunantwort gegen Pneumokokken Polysaccharide überprüft. Hierbei wurde eine signifikant geringe IgM-Produktion gegen pPS 19F, 4 und 6B ermittelt. Bei einer T-Zell unabhängigen Immunantwort werden die Antikörper hauptsächlich von MZB und B1-B-Zellen produziert. Da der basale IgM-Spiegel im Serum und im Peritoneum von *Sly^{d/d}* Mäusen

im Vergleich zu WT Tieren erniedrigt und die Anzahl der MZB verringert war, war eine verminderte IgM-Produktion nach Stimulation mit einem T-Zell unabhängigen Antigen zu vermuten. Auch führt die niedrigere Proliferationsrate der MZB nach AGR Stimulation vermutlich zu einer geringeren Anzahl an Antikörper-sezernierenden Plasmazellen in *Sly^{d/d}* Mäusen.

Obwohl die genaue Funktion von SLY in der Antigenrezeptor-Signalkaskade noch unbekannt ist, sind die Auswirkungen auf die Entwicklung und die Funktion von B-Zellen deutlich sichtbar. Die Anzahl der Marginalzonen B-Zellen in *Sly^{d/d}* Mäusen ist erniedrigt und deren Proliferation vermindert. Auch ist die T-Zell unabhängige Immunantwort in *Sly^{d/d}* Tieren stark dezimiert und somit eine Beeinflussung des Immunsystems durch SLY eindeutig erkennbar. Die Ursache für den Phänotyp in *Sly^{d/d}* B-Zellen könnte ein vermindertes BZR-Signal nach Stimulation des AGR sein, das sowohl das Überleben und die Entwicklung von MZB beeinflusst, aber auch die Proliferation und Antikörper Produktion der MZB vermindert.

D.2 Der Einfluss von SLY auf die Entwicklung der T-Zellen

Die verringerten Zellzahlen in Thymus, Milz und den peripheren Lymphknoten von *Sly^{d/d}* Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen deuten auch auf eine Funktion von SLY in der Entwicklung von T-Zellen hin. Durch detaillierte FACS-Analysen konnte eine verminderte Anzahl an doppelt negativen 1 (DN1), doppelt positiven (DP) und $CD4^+CD8^-$ T-Zellen im Thymus von *Sly^{d/d}* Tieren verglichen mit WT Kontrolltieren festgestellt werden. Die Anzahl der anderen Entwicklungsstufen der DN Zellen und die $CD4^-CD8^+$ T-Zellen waren normal. Auch in der Milz und den peripheren Lymphknoten wurden signifikant weniger $CD4^+$ T-Zellen in *Sly^{d/d}* Mäusen detektiert.

Eine mögliche Ursache für das veränderte $CD4/CD8$ Verhältnis im Thymus von *Sly^{d/d}* Mäusen und damit auch in den peripheren Organen, könnte ein Einfluss von SLY auf die Entwicklung der Thymozyten sein. Während der intrathymischen Entwicklung ordnen die T-Zellen die Gene der α - und β -Kette des TZR um, damit die große Vielfalt an T-Zell Rezeptoren erreicht werden kann (28). Würde dieser Vorgang nicht korrekt ablaufen oder würden nur bestimmte Gene für die Expression der TZR verwendet werden, könnte sich dies bei der Verteilung der $V\beta$ -Regionen bemerkbar machen (23). Doch in den *Sly^{d/d}* Mäusen wurden keine Veränderungen bei der Verteilung der $V\beta$ -Regionen beobachtet. Die Umordnung der Gene des TZR scheint in den *Sly^{d/d}* Mäusen also nicht beeinträchtigt zu sein. Außerdem könnte eine Mutation in SLY die positive und/oder negative Selektion der Thymozyten beeinträchtigen und somit die Anzahl der T-Zellen verringern. Nach erfolgreicher Umordnung der TZR-Gene in den DN Zellen entstehen daraus die DP Zellen. Diese müssen die positive und negative Selektion überstehen, um sich weiter zu $CD4^+$ und

CD8⁺ T-Zellen entwickeln zu können. Sie durchlaufen die positive Selektion, die Selbst-MHC-Erkennung gewährleistet und die negative Selektion, durch die potenziell autoreaktive Zellen eliminiert werden. Dabei spielen der TZR und die TZR-Signalkaskade eine wichtige Rolle. Wäre einer dieser Prozesse in der *Sly^{d/d}* Maus gestört, könnte dies die geringeren Zellzahlen im Thymus der Mäuse erklären. Um dies zu analysieren, wurden transgene TCR-HY Tiere verwendet, die mit WT und *Sly^{d/d}* Mäusen gekreuzt wurden. Bei den männlichen transgenen Tieren, die das Antigen HY exprimieren, werden fast alle Thymozyten als autoreaktive Zellen eliminiert. Der Thymus der Männchen besteht deshalb fast nur aus DN Zellen und wenigen CD8⁺ T-Zellen. Die weiblichen Tiere besitzen dieses Antigen nicht. Dadurch überstehen einige Thymozyten sowohl die positive als auch die negative Selektion und entwickeln sich zu CD8⁺ T-Zellen. Es entstehen jedoch keine CD4⁺ T-Zellen, da das HY Antigen auf MHC-Klasse I Molekülen präsentiert wird und CD4⁺-Zellen Antigene nur auf MHC-Klasse II Molekülen erkennen.

Das CD4/CD8 Verhältnis in WT und *Sly^{d/d}* transgenen Mäusen war in den Weibchen vergleichbar, die Gesamtzellzahl des Thymus ebenfalls nicht signifikant verändert. Dies deutet auf keine Rolle von SLY in der positiven und negativen Selektion hin. Bei den Männchen waren in den transgenen *Sly^{d/d}* Mäusen prozentual mehr DP und CD8⁺ Zellen und weniger DN Thymozyten. Da allerdings die Gesamtzellzahl im Thymus der transgenen WT und *Sly^{d/d}* Mäuse gleich war und keine Unterschiede bei den Weibchen zu erkennen waren, lässt sich daraus schließen, dass SLY keine Funktion in der negativen Selektion von Thymozyten besitzt. Ebenso deuten die Ergebnisse an, dass SLY keine bedeutende Rolle bei der positiven Selektion der Thymozyten hat.

Zusammenfassend ist das veränderte CD4/CD8 Verhältnis im Thymus von *Sly^{d/d}* Mäusen weder durch eine Beeinträchtigung bei der Umordnung der Gene des T-Zell Rezeptors noch der positiven und negativen Selektion der Thymozyten zu erklären. Der Phänotyp in der *Sly^{d/d}* Maus beruht wahrscheinlich auf einem Defekt in der TZR-Signalkaskade, was daher noch genauer untersucht wurde.

Obwohl die Expression von SLY nur in lymphoiden Zellen nachgewiesen wurde, ist ein Einfluss der Mutation in SLY in nicht-lymphatischem Gewebe auf die Entwicklung von T- und B-Zellen nicht auszuschließen. Um dies zu überprüfen, wurden T- und B-Zellen von Knochenmarkschimären Mäusen auf die Zusammensetzung aus CD45.1⁺ und CD45.2⁺ Spender- bzw. Empfängerzellen untersucht. In der ersten Experimentalreihe wurden letal bestrahlten CD45.1⁺ WT Empfängern Knochenmarkszellen aus den kongenen WT bzw. *Sly^{d/d}* Spendern (beide CD45.2⁺) injiziert. Hierbei zeigten die *Sly^{d/d}* Spenderzellen in WT Mäusen ein ähnliches Verhalten wie in den *Sly^{d/d}* Mäusen. Der Thymus und die Milz waren insgesamt kleiner und in der Milz war die Rekonstitution mit *Sly^{d/d}* Zellen schlechter als mit WT Zellen, wahrscheinlich bedingt durch die geringere Menge an *Sly^{d/d}* Spender-T-Zellen, die den

Thymus verlassen. Im umgekehrten Fall, als WT Spenderzellen WT bzw. *Sly^{d/d}* Mäuse rekonstituieren sollten, zeigte sich kein Unterschied zwischen den Mäusen mit und ohne Mutation in SLY. Die Rekonstitution durch die WT Zellen war in den *Sly^{d/d}* Empfängermäusen genauso effektiv wie in den WT Mäusen. Diese Daten belegen eindeutig, dass die nicht-lymphoiden Zellen, wie das Stroma im Thymus, durch SLY nicht beeinflusst werden und SLY Lymphozyten-spezifisch agiert.

D.3 Funktionalität der T-Zellen in *Sly^{d/d}* Mäusen

In den Vorarbeiten wurde eine verminderte Proliferationsrate von *Sly^{d/d}* T-Zellen im Vergleich zu WT Zellen nach Stimulation des TZR beobachtet. Nur durch Zugabe von IL-2 konnte dieses Defizit aufgehoben werden. Eine veränderte Regulierung des IL-2 Rezeptors in *Sly^{d/d}* Mäusen konnte allerdings ausgeschlossen werden. Auch zeigte sich die stark verminderten Zytokinproduktion (IL-2, TNF, IL-10, IFN- γ , IL-4) nur spezifisch nach Aktivierung des AGR, nicht nach Stimulation mit PMA/Ionomycin (4).

Nach diesen *in vitro* Vorversuchen, wurde die klonale Expansion und gezielte Apoptose von T-Zellen nach Stimulation mit dem Superantigen SEB *in vivo* gemessen. Die Stimulation mit Superantigen verursacht eine ähnliche Proliferation und IL-2 Produktion in T-Zellen, wie die Aktivierung durch Antigene, doch führt dies zu keiner Hydrolyse von Phosphatidylinositol oder einem Anstieg des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels. Die Interaktion des TZR mit Antigenen und Superantigenen schaltet somit nicht die gleichen Signalwege nach Aktivierung des Antigenrezeptors an (48). SLY könnte also die Stimulation mit Antigenen und Superantigenen unterschiedlich beeinflussen. Nach Injektion von SEB war auch eine vergleichbare Menge an V β 8⁺ T-Zellen in WT und *Sly^{d/d}* Mäusen zu allen Zeitpunkten erkennbar. Die klonale Expansion genauso wie die gezielte Apoptose der T-Zellen nach SEB Stimulation ist somit nicht von SLY abhängig. SLY scheint demnach in einem Phosphatidylinositol- oder Ca²⁺-abhängigen Signalweg nach Stimulation des T-Zell Rezeptors involviert zu sein.

Die Induktion der Apoptose bei den T-Zellen nach SEB-Stimulation wird nicht durch SLY beeinflusst, doch könnte die Aktivierung des TZR mit α CD3 Antikörpern eine verstärkte Apoptoserate in *Sly^{d/d}* Zellen auslösen. Dies könnte die geringere Proliferationsrate von *Sly^{d/d}* Zellen nach AGR Stimulation erklären. Nach α CD3/ α CD28 und α CD3/IL-2 Stimulation konnte jedoch keine erhöhte Apoptoserate in *Sly^{d/d}* CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu WT Zellen festgestellt werden. Lediglich bei den CD8⁺ T-Zellen zeigte sich nach α CD3 Stimulation eine verminderte Überlebensrate der *Sly^{d/d}* Zellen im Vergleich zu WT Zellen. Auch nach Induktion von Stress durch Zugabe von Sorbitol, Erniedrigung des Serumgehaltes und Erhitzung zeigten *Sly^{d/d}* T-Zellen eine normale Überlebensrate. Eine verstärkte Anfälligkeit für Apoptose kann somit nicht die einzige Erklärung für die verminderte

Proliferationsrate in *Sly*^{d/d} T-Zellen sein, da bei den CD4⁺ T-Zellen kein Unterschied festzustellen war.

Die Integrin-vermittelte Adhäsion von T-Zellen an APCs oder Endothel spielt bei der Zirkulation, Einwanderung in Gewebe und Aktivierung über den AGR eine wichtige Rolle (1). Eine veränderte Adhäsionseffektivität beeinflusst also die Funktionalität der T-Zellen. Ob dies in den *Sly*^{d/d} Mäusen der Fall ist, wurde durch Adhäsionsassays von aktivierten T-Zellen an immobilisierte Liganden getestet. Die Expression der Integrine auf den aktivierten T-Zellen, genauso wie die Adhäsion der *Sly*^{d/d} T-Zellen nach α CD3 Stimulation an Fibronectin, VCAM und ICAM-2 war im Vergleich zu WT Zellen unverändert. Auf diese Funktion der T-Zellen nimmt SLY somit keinen Einfluss.

Diese Ergebnisse stimmen mit den Expressionsanalysen der Adhäsionsmoleküle auf B-Zellen überein. Dort konnte auch kein Hinweis auf ein verändertes Adhäsionsverhalten bedingt durch eine veränderte Expression der Integrine auf MZB und FB gefunden werden.

Aktivierte CD8⁺ T-Zellen sind in der Lage, durch zytotoxische Lyse in den Zielzellen Apoptose auszulösen. Um die Funktion von SLY in CD8⁺ T-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen nach Injektion von Ovalbumin/CpG 1668 *in vivo* aktiviert und *in vitro* expandiert. Die zytotoxische Lyse wurde anschließend durch Zugabe von SIINFEKL-gepulsten, Cr⁵¹ beladenen EL-4 Zellen anhand der Cr⁵¹-Freisetzung gemessen. Dabei zeigten die *Sly*^{d/d} CD8⁺ T-Zellen eine genauso effektive zytotoxische Aktivität wie die WT Zellen. In *Sly*^{d/d} Mäusen wurden im Vergleich zu WT Mäusen genauso viele eingewanderte Zellen in den Lymphknoten detektiert und damit vermutlich auch eine vergleichbare Menge an CD8⁺ T-Zellen. Die ähnlichen Mengen an Zellen in den Lymphknoten korrelieren mit der normalen Adhäsionsaktivität der T-Zellen über Integrine, welche bei der Einwanderung der Zellen in Gewebe eine wichtige Rolle spielen. Die geringere Proliferationsaktivität der *Sly*^{d/d} CD8⁺ T-Zellen nach AGR Stimulation (siehe A.6.2) wird in diesem Assay durch Zugabe von IL-2 während der *in vitro* Kultivierung verhindert.

D.4 Funktion von SLY in der Antigenrezeptor Signalkaskade

Die Ursache für den Phänotyp in *Sly*^{d/d} Mäusen liegt vermutlich in einer Veränderung der Signalkaskade nach Antigenrezeptor Stimulation. Die genaue Funktion von SLY in dieser Signalkaskade ist allerdings noch unklar.

Um einen ersten Hinweis auf einen veränderten Signalweg zu bekommen, wurde das Tyrosin-Phosphorylierungsmuster von T-Zellen nach Stimulation des T-Zell Rezeptors untersucht. Da viele Proteine durch Phosphorylierung aktiviert werden, könnte ein verändertes Phosphorylierungsmuster nur einen ersten Anhaltspunkt für den Einfluss eines Proteins auf die Signalkaskade geben. Doch in den *Sly*^{d/d} und WT T-Zellen wurde ein vergleichbares

Tyrosin-Phosphorylierungsmuster nach Aktivierung des TZR detektiert und kein weiterer Hinweis auf eine Beeinflussung der AGR Signalkaskade durch SLY ermittelt.

Ein Schritt, bei dem SLY in die Signalkaskade nach Antigenrezeptor Aktivierung eingreifen könnte, ist die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels. Ca^{2+} Einstrom wird nur nach Stimulation des TZR ausgelöst, nicht nach Aktivierung der Zellen mit Superantigen. Da die Stimulation der Zellen mit Superantigen zu einer unveränderten Proliferationsaktivität der *Sly^{d/d}* T-Zellen führte, und die Stimulation über den TZR eine verminderte Proliferation in *Sly^{d/d}* T-Zellen auslöste, liegt der Schluss nahe, dass SLY bei der Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels eine Rolle spielen könnte. Der Ca^{2+} Einstrom konnte in allen T-Zellen nach Stimulation mit αCD3 nachgewiesen werden, doch es wurden weder bei CD4^+ noch bei CD8^+ T-Zellen ein Unterschied zwischen den WT und *Sly^{d/d}* Zellen festgestellt. Die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels ist somit nicht von SLY abhängig.

Ein anderer Schritt, bei dem funktionelles SLY nötig sein könnte, ist die Aktivierung der MAP-Kinasen, die nach AGR Stimulation phosphoryliert werden. Jedoch war nach Analyse der Phosphorylierung von p38 und ERK in aktivierten T-Zellen keine Veränderung durch die Mutation in SLY zu erkennen. In weiteren Experimenten wurde die Aktivierung von JNK analysiert und ebenfalls kein Unterschied festgestellt (4).

Diese Ergebnisse zeigen keine Veränderung in den *Sly^{d/d}* T-Zellen bei den frühen Ereignissen der Antigenrezeptor Signalkaskade. Des Weiteren wurde die Translokation der Transkriptionsfaktoren AP-1, NF- κ B und NFAT untersucht und ebenso keine Unterschiede zwischen WT und *Sly^{d/d}* Zellen detektiert (4). Diese Daten geben somit keinen Hinweis auf die genaue Funktion von SLY in der AGR Signalkaskade. Dass SLY dennoch involviert ist, zeigt die Phosphorylierung von SLY nach AGR Stimulation. In welchem Signalweg SLY eine Rolle spielt, ist weiter unklar.

D.5 Die Rolle von SLY in der akuten Graft-versus-Host Disease (GVHD)

Um die Funktionen von SLY nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* zu untersuchen, wählten wir das Modell der akuten GVHD. Die akute GVHD ist eine spezielle Situation in der Transplantationsimmunologie, bei der Lymphozyten des Spenders aus dem Transplantat mit Alloantigenen des Empfängers reagieren. Die T-Zellen des Spenders erkennen Oberflächenantigene auf den Zellen des Empfängers als fremd, werden aktiviert und reagieren mit klonaler Expansion und Zytokinproduktion, was die Ausbildung entzündlicher Prozesse zur Folge hat (Abb. 28).

Ein Phänotyp der *Sly^{d/d}* Mäuse in der akuten GVHD wäre denkbar, da die Proliferation der CD8^+ T-Zellen *in vitro* beeinträchtigt war. Außerdem wird die Generierung der CD8^+ -Antwort

durch CD4⁺ T-Zellen unterstützt. Die CD4⁺ T-Zellen der *Sly^{d/d}* Maus proliferierten *in vitro* weniger und waren *in vivo* zahlenmäßig geringer vorhanden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden allogene Lymphozyten in subletal bestrahlte Empfängertiere injiziert, um die Funktionen der Lymphozyten *in vivo* zu analysieren. Hierbei ergaben sich weder bei einer Zellzahl von 2×10^7 noch bei 5×10^7 ein Unterschied zwischen den WT und *Sly^{d/d}* Spendern. Die Überlebenskinetik sowie der Verlauf der Gewichtskurve der Mäuse mit *Sly^{d/d}* Spenderzellen waren im Vergleich zu Mäusen mit WT Spenderzellen nicht signifikant verändert. Über die gemessenen ALT-Werte konnte ebenfalls kein Hinweis auf einen veränderten Leberschaden in den Mäusen mit *Sly^{d/d}* Zellen nachgewiesen werden.

Im Verlauf einer akuten GVHD spielen die CD8⁺ T-Zellen des Spenders eine wichtige Rolle. Im CTL Assay zeigten die *Sly^{d/d}* mutierten CD8⁺ T-Zellen keine veränderte zytotoxische Lysefunktion, was in der akuten GVHD durch die vergleichbare Entwicklung der Organschäden bei WT und *Sly^{d/d}* Spenderzellen bestätigt werden konnte. In diesem Modell wird ein Großteil der Zytokine durch die aktivierten Makrophagen des Empfängers produziert und nicht nur durch die aktivierten Spender T-Zellen. Ebenso bewiesen Sykes und Spitzer (66), dass die IL-4 Produktion der Spender T-Zellen für die Ausbildung einer GVHD nicht nötig ist. Dadurch lässt sich die fehlende Auswirkung der geringeren Zytokinproduktion der *Sly^{d/d}* T-Zellen auf den Verlauf der akuten GVHD erklären. Falls die Proliferation der *Sly^{d/d}* T-Zellen *in vivo* erniedrigt war, hat es hier keine bedeutenden Folgen. Auch spielen bei der akuten GVHD die NK und NKT-Zellen eine große Rolle. Die Anzahl dieser Zellen ist in *Sly^{d/d}* Mäusen normal (Daten nicht gezeigt), die Funktion wurde allerdings nicht überprüft.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die beobachteten Beeinträchtigungen der *Sly^{d/d}* T-Zellen *in vitro* in diesem *in vivo* Modell nicht bestätigt werden konnten. Weder die verringerte Proliferation, noch die verminderte Zytokinproduktion der T-Zellen nach Stimulation über den Antigenrezeptor konnten durch den normalen Verlauf der akuten GVHD gezeigt werden.

E ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

SLY wurde als ein potenzielles Adaptorprotein identifiziert, das spezifisch in Lymphozyten exprimiert wird. Es besitzt eine zweigeteilte Kern-Lokalisations-Sequenz, eine SH3 Domäne und eine SAM Domäne. Bei Proteinvergleichen wurden zwei weitere Proteine mit großer Homologie zu SLY entdeckt, SLY2 und SASH1. Diese drei Proteine weisen eine ähnliche Organisation der funktionellen Einheiten auf und eine größere Homologie der SH3 und SAM Domänen zueinander, als zu den Domänen anderer Proteine, was auf eine neue Familie von Adaptorproteinen hinweist. SLY wird spezifisch in Lymphozyten exprimiert, SLY2 dagegen wurde nicht nur in lymphatischem Gewebe nachgewiesen, sondern auch in Herz, Lunge, Plazenta und Gehirn (10). *SASH1* ist ein potenzielles Tumor-Suppressor Gen, das ubiquitär in allen Geweben exprimiert wird und in einigen Tumoren runterreguliert wird (76).

Nach Aktivierung des Antigrezeptors wurde die Phosphorylierung von SLY in Serin27 nachgewiesen (3), was auf eine Rolle von SLY im Immunsystem hinweist.

Erste Analysen der *Sly^{d/d}* Maus zeigten im Vergleich zu WT Tieren eine signifikant geringere Zellzahl im Thymus, Milz, den peripheren Lymphknoten und den Peyer'schen Plaques.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Defizit bei der T- und B-Zell Entwicklung in *Sly^{d/d}* Mäusen festgestellt. Im Thymus der *Sly^{d/d}* Mäuse waren im Vergleich zu WT Mäusen signifikant weniger doppelt negative 1 (DN1), doppelt positive und CD4⁺CD8⁻ T-Zellen, aber eine normale Anzahl an CD4⁻CD8⁺, DN2, DN3 und DN4 vorhanden. Dieses Defizit bei der intrathymischen T-Zell Entwicklung konnte aber nicht auf einen Defekt bei der Umordnung der Gene des TZR oder auf einen Defekt bei der positiven und negativen Selektion zurückgeführt werden.

Bei der B-Zell Entwicklung wurden keine Unterschiede zwischen WT und *Sly^{d/d}* Mäusen im Knochenmark detektiert, auch war die Anzahl der B1-B-Zellen im Peritoneum von *Sly^{d/d}* Mäusen normal. In der Milz wurde eine normale Anzahl an „newly formed“, Vorläuferstufen der FB und MZB und der reifen FB festgestellt, die Anzahl der *Sly^{d/d}* Marginalzonen B-Zellen war dagegen reduziert. Die geringere Anzahl an Marginalzonen B-Zellen in *Sly^{d/d}* Mäusen wurde nicht durch einen Defekt bei der Einwanderung der B-Zellen in die Milz und deren Kompartimente verursacht.

Eine mögliche Erklärung für die geringere Anzahl an MZB in *Sly^{d/d}* Mäusen könnte ein Defekt bei der Entwicklung der B-Zellen auf Grund der geringeren BZR Signalstärke sein. Das Signal nach BZR Stimulation könnte für die Ausreifung von MZB zu schwach sein und somit zu einer geringeren Anzahl an MZB in *Sly^{d/d}* Mäusen führen oder durch die geringere Signalstärke eine verminderte Überlebensrate auslösen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass SLY bei der T- und B-Zell Entwicklung eine wichtige Rolle spielt, die genaue Funktion von SLY aber noch unbekannt ist.

SLY ist nicht nur für die T- und B-Zell Entwicklung wichtig, sondern auch für deren Funktionalität. Die Proliferation der *Sly^{d/d}* MZB war im Vergleich zu WT Zellen signifikant erniedrigt. Ebenso war die Antikörperproduktion bei der T-Zell unabhängigen Immunantwort gegen Pneumokokken Polysaccharide in *Sly^{d/d}* Mäusen stark vermindert.

Die Proliferation von Antigenrezeptor stimulierten T-Zellen war in *Sly^{d/d}* Mäusen im Vergleich zu WT Tieren signifikant erniedrigt, nicht aber nach Aktivierung mit Superantigen SEB. Dadurch wurde eine Funktion von SLY in der AGR Signalkaskade über Ca^{2+} -Aktivierung oder Phosphorylierung von Phosphatidylinositol vermutet, da diese Signalwege nur über die Stimulation mit Antigen und nicht mit Superantigen angeschaltet werden. Doch eine Rolle von SLY bei der Aktivierung des Ca^{2+} Flusses konnte ausgeschlossen werden. Genauso kam eine Funktion von SLY bei der Phosphorylierung von MAP-Kinasen, die auch unabhängig von phosphoryliertem Phosphatidylinositol aktiviert werden können, nicht in Betracht. Die Translokationsexperimente mit den Transkriptionsfaktoren AP-1, NF- κ B und NFAT zeigten ebenso keine Defekte in der *Sly^{d/d}* Maus nach Aktivierung der T-Zellen über den AGR (4).

Diese Ergebnisse geben bisher keine weiteren Hinweise auf die Funktion von SLY in der proximalen Antigenrezeptor Signalkaskade. Es bedarf noch weiterer Analysen, um den Phänotyp der *Sly^{d/d}* Maus zu erklären.

Dazu könnte eine Zellzyklusanalyse von *Sly^{d/d}* und WT Zellen beitragen. Der Reiz nach Antigenrezeptor Stimulation muss einen bestimmten Schwellenwert erreichen, damit die Proliferation ausgelöst wird. Dieser Schwellenwert könnte in *Sly^{d/d}* Zellen durch das verminderte AGR Signal schwerer zu überwinden sein. Die Zellen, die diesen Schwellenwert überwunden haben, würden im Vergleich zu WT Zellen normal proliferieren. Eine andere Möglichkeit wäre, dass genauso viele *Sly^{d/d}* wie WT Zellen in Proliferation gehen würden, die *Sly^{d/d}* Zellen sich aber weniger oft teilen würden. Beides würde die geringere Proliferationsrate der *Sly^{d/d}* T-Zellen und Marginalzonen B-Zellen erklären.

Bisher kann nur spekuliert werden, ob die Funktion von SLY der Transport von bisher noch unbekanntem Proteinen vom Kern ins Zytoplasma oder umgekehrt ist, oder ob SLY für die Ausübung seiner Funktion transportiert werden muss. In diesem Zusammenhang stellt sich außerdem die Frage, welche Rolle die SH3 und die SAM Domänen spielen.

Ein weiterer Aspekt den es zu klären gilt, ist die Frage, ob der Verlust der Phosphorylierungsstelle Serin27 oder die defekte Kern-Lokalisations-Sequenz oder beides für die Lokalisation des mutierten SLY Proteins im Zytoplasma und den Phänotyp der *Sly^{d/d}* Maus verantwortlich sind.

Ein weiterer Punkt, der untersucht werden sollte, sind kompensatorische Effekte in der *Sly^{d/d}* Maus. Proteine einer Familie kompensieren häufig Defekte untereinander. Durch die große Homologie der funktionellen Einheiten von SLY mit SLY2 und SASH1 ist es möglich, dass

SLY2 oder SASH1 einige der Funktionen von SLY in der *Sly^{d/d}* Maus übernehmen können. Dazu sollte die Expression von SLY2 und SASH1 in T- und B-Zellen von WT und *Sly^{d/d}* Mäusen ohne und mit AGR Stimulation analysiert werden und die Bindung von SLY an SLY2 und SASH1 überprüft werden.

Ein interessanter Aspekt könnte auch die Analyse des PKC-Signalweges sein (68). Über die Protein Kinase C wird nach AGR Stimulation die PI3-Kinase aktiviert und anschließend Proteine der FoxO-Familie phosphoryliert. Die Proteine der FoxO-Familie gehören zu den „Forkhead box“-Transkriptionsfaktoren der Untergruppe O und beinhalten FoxO1, FoxO3 und FoxO4. Diese Transkriptionsfaktoren kommen ubiquitär vor, werden aber in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich stark exprimiert (6, 12, 21). Sie sind an vielen Prozessen der Zelle beteiligt, wie Zellproliferation, Zell-Zyklus Arrest, Apoptose, Überleben oder Differenzierung (Abb. 32). Die Phosphorylierung der FoxO-Proteine führt zur Relokalisation der Proteine vom Kern ins Zytoplasma und damit zu ihrer Inaktivierung. Die Inaktivierung inhibiert die Transkription ihrer Zielgene, wodurch z.B. Proliferation ausgelöst wird (12). Stahl et al (64) zeigte, dass Proteine der FoxO-Familie bei der Proliferation und dem Überleben von T-Zellen nach Aktivierung über den TZR und IL-2 eine wichtige Rolle spielen.

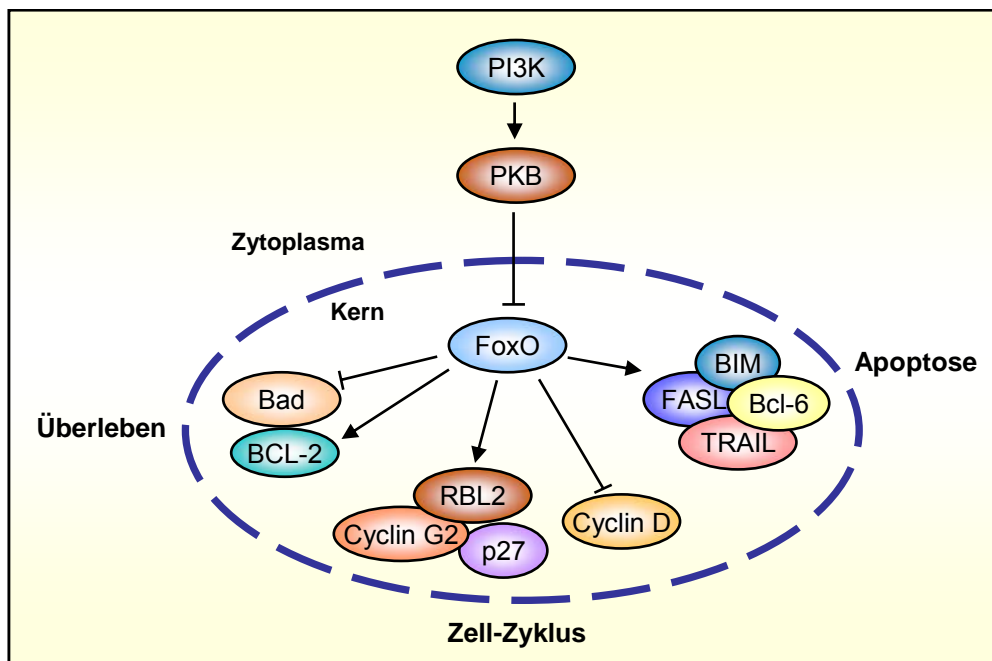


Abb. 32: FoxO Signalkaskade. Über die PI3K und PKB werden die Mitglieder der FoxO-Proteinfamilie phosphoryliert. Die FoxO-Proteine kontrollieren u.a. Apoptose, Überleben und Zell-Zyklus Arrest über Aktivierung (→) und Inhibition (←) der Transkription der dargestellten Proteine (modifiziert nach (12)).

Wäre SLY bei der Signalkaskade eines der FoxO-Proteine involviert, könnte das den Phänotyp der *Sly^{d/d}* Maus erklären. Erste Versuche zeigten, dass SLY nach Phosphorylierung und Aktivierung nicht mehr im Kern, sondern nur noch im Zytoplasma lokalisiert ist (Daten nicht gezeigt). Die Tatsache, dass das mutierte Protein nur im Zytoplasma zu finden ist und der Phänotyp der *Sly^{d/d}* Maus sprechen ebenfalls für eine Rolle von SLY in der Signalkaskade über die FoxO-Proteine. Deshalb sollte die Phosphorylierung der verschiedenen FoxO Proteine in *Sly^{d/d}* Zellen mit und ohne Aktivierung des AGR analysiert werden, um dann eventuell eines der FoxO-Proteine und dessen Signalkaskade genauer zu untersuchen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass SLY für die Entwicklung und Funktion von Lymphozyten und damit für die Ausbildung einer Immunantwort eine wichtige Rolle spielt. Für die Identifizierung der dafür zu Grunde liegenden Mechanismen und der genauen Funktion von SLY bedarf es jedoch weiterer Analysen.

F ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AGR	Antigen Rezeptor
aGVHD	acute Graft-versus-Host-Disease
Ak	Antikörper
ALT	Alanin-Amino-Transferase
AP-1	Aktivierungs Protein 1
APC	Antigen präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
β-ME	β-Mercaptoethanol
BSA	Rinderserumalbumin
Btk	Bruton`s Tyrosin Kinase
BZR	B-Zell Rezeptor
c.p.m.	counts per minute
CCR7	Chemokin (CC Motif) Rezeptor 7
CD	Cluster of differentiation
cDNA	DNA-Kopie der mRNA
CGG	chicken gamma globulin
Ci	Curie
CTL	Cytotoxische Lyse
CXCR5	Chemokin (CXC Motif) Rezeptor 5
DAG	Diacylglycerin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsufoxid
DN	doppelt negative T-Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
DP	doppelt positive T-Zellen
DTT	Dithiothieitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERG	Eppendorfreaktionsgefäß
ERK	Extracellular signal-regulated protein kinase
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FB	Follikuläre B-Zellen
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FN	Fibronectin
FoxO	Transkriptionsfaktoren mit “forkhead box”, Untergruppe O
g	Gramm
Gy	Gray
h	hour (Stunde)
H ₂ O _{dd}	zweifach destilliertes Wasser
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös

Abkürzungsverzeichnis

ICAM	Intercellular adhesion molecule
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Iono	Ionomycin
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
ITAMs	Immunrezeptor-Tyrosin-Aktivatormotiv
Itk	IL-2 inducible T-cell kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo Dalton
LAT	Linker for activation of T-cells
Lck	Lymphocyte cell-specific protein tyrosine kinase
LFA-1	α L β 2-Integrin, lymphocyte function associated antigen
M	Molar (mol/Liter)
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
Med	Medium
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
Min	Minute
ml	Milliliter
MLR	mixed lymphocyte reaction
mM	Millimolar
mRNA	Boten-RNA (messenger)
MZB	Marginalzonen B-Zellen
n.a.	nicht analysiert
NF	Newly formed B-Zellen
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NF κ B	Nuclear factor kappa B
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLS	Kern-Lokalisations-Sequenz
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
Ova	Ovalbumin
PBS	Phosphat-gepuffertes Salz
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phytoerythrin
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Protein Kinase C
PLC γ	Phospholipase C gamma
PMA	4- α -Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
pPS	Pneumokokken Polysaccharide
preFB	Vorläuferzelle von FB
preMZB	Vorläuferzelle von MZB
PTK	Protein Tyrosin Kinasen
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institut Medium

Abkürzungsverzeichnis

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription mit anschließender PCR
SAM	Sterile alpha motif
SASH1	Protein mit Sam und SH3 Domäne
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SEB	Staphylokokken Enterotoxin B
Ser27	Serin 27
SH3	Src homology 3
SLY	SH3 domain containing protein expressed in lymphocytes
SLY2	Protein homolog zu SLY1
SPF	Spezifisch pathogen frei
Syk	Spleen tyrosine kinase
Tab.	Tabelle
Tec	Cytoplasmic tyrosine kinase
T _H 1/T _H 2	Helfer-T-Zelle Typ 1/2
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNP	Trinitrophenyl
TZR	T-Zell Rezeptor
µg	Microgramm
µl	Microliter
Ü.N.	Über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
ÜS	Überstand
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VLA-4	α4β1-Integrin, very late activation molecule
w/v	Gewicht/Volumen
w/w	Gewicht/Gewicht
WT	Wildtyp
ZAP-70	Zeta-chain associated protein kinase 70kDa isoform

G ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abb. 1:	B-Zell Entwicklung in der Milz	S. 2
Abb. 2:	T-Zell Entwicklung im Thymus	S. 4
Abb. 3:	Die drei Klassen von T-Effektorzellen	S. 5
Abb. 4:	T-Zell Rezeptor Signalkaskade	S. 7
Abb. 5:	Sequenzvergleich der SLY-Proteine	S. 9
Abb. 6:	Generierung der SLY-Mutation	S. 10
Abb. 7:	T-Zell Proliferation und IL-2 Produktion	S. 12
Abb. 8:	Humorale Immunantworten	S. 13
Abb. 9:	B-Zell Entwicklung in der Milz	S. 36
Abb. 10:	Basaler IgM Spiegel	S. 37
Abb. 11:	<i>Sly</i> -mRNA Spiegel in B-Zellen	S. 38
Abb. 12:	Integrinexpression auf B-Zellen	S. 39
Abb. 13:	Expression von CXCR5 und CCR7 auf B-Zellen	S. 40
Abb. 14:	B-Zell Proliferation	S. 41
Abb. 15:	T-Zell unabhängige Immunantwort	S. 42
Abb. 16:	T-Zell Entwicklung	S. 44
Abb. 17:	T-Zellen mit TCR-HY	S. 45
Abb. 18:	KM-Rekonstitution CD45.2 → CD45.1	S. 47
Abb. 19:	KM-Rekonstitution CD45.1 → CD45.2	S. 48
Abb. 20:	Adhäsion von T-Zellen	S. 49
Abb. 21:	Anzahl der Vβ8 ⁺ T-Zellen nach SEB-Injektion	S. 50
Abb. 22:	Apoptose bei T-Zellen	S. 51
Abb. 23:	T-Zell Apoptose	S. 52
Abb. 24:	Zytotoxizität	S. 53
Abb. 25:	Ca ²⁺ -Fluss bei T-Zellen	S. 54
Abb. 26:	Gesamt-Tyrosin-Phosphorylierung	S. 55
Abb. 27:	MAP-Kinasen Aktivierung	S. 56
Abb. 28:	Die drei Phasen der akuten GVHD	S. 58
Abb. 29:	GVHD Überlebenskinetik	S. 59
Abb. 30:	GVHD Gewichtsveränderungen	S. 60
Abb. 31:	GVHD ALT-Werte	S. 61
Abb. 32:	FoxO Signalkaskade	S. 73
Tab. 1:	B-Zell Subpopulationen in lymphatischen Organen	S. 35
Tab. 1:	T-Zell Subpopulationen im Thymus und der Milz	S. 43

H LITERATURVERZEICHNIS

1. Albelda SM, Buck CA. 1990. Integrins and other cell adhesion molecules *FASEB J.* 4:2868-80
2. Alimzhanov MB, Kuprash DV, Kosco-Vilbois MH, Luz A, Turetskaya RL, Tarakhovsky A, Rajewsky K, Nedospasov SA, Pfeffer K. 1997. Abnormal development of secondary lymphoid tissues in lymphotoxin beta-deficient mice *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94:9302-7
3. Astoul E, Laurence AD, Totty N, Beer S, Alexander DR, Cantrell DA. 2003. Approaches to define antigen receptor-induced serine kinase signal transduction pathways *J. Biol. Chem.* 278:9267-75
4. Beer S, Scheikl T, Reis B, Hueser N, Pfeffer K, Holzmann B. 2005. Impaired immune responses and prolonged allograft survival in Sly1 mutant mice *Mol. Cell Biol.* 25:9646-60
5. Beer S, Simins AB, Schuster A, Holzmann B. 2001. Molecular cloning and characterization of a novel SH3 protein (SLY) preferentially expressed in lymphoid cells *Biochim. Biophys. Acta* 1520:89-93
6. Birkenkamp KU, Coffer PJ. 2003. FOXO transcription factors as regulators of immune homeostasis: molecules to die for? *J. Immunol.* 171:1623-9
7. Cariappa A, Tang M, Parng C, Nebelitskiy E, Carroll M, Georgopoulos K, Pillai S. 2001. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision is regulated by Aiolos, Btk, and CD21 *Immunity.* 14:603-15
8. Casola S, Otipoby KL, Alimzhanov M, Humme S, Uyttersprot N, Kutok JL, Carroll MC, Rajewsky K. 2004. B cell receptor signal strength determines B cell fate *Nat. Immunol.* 5:317-27
9. Chaplin DD. 2006. 1. Overview of the human immune response *J. Allergy Clin. Immunol.* 117:S430-S435
10. Claudio JO, Zhu YX, Benn SJ, Shukla AH, McGlade CJ, Falcioni N, Stewart AK. 2001. HACSI1 encodes a novel SH3-SAM adaptor protein differentially expressed in normal and malignant hematopoietic cells *Oncogene* 20:5373-7
11. Clayton E, Bardi G, Bell SE, Chantry D, Downes CP, Gray A, Humphries LA, Rawlings D, Reynolds H, Vigorito E, Turner M. 2002. A crucial role for the p110delta subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in B cell development and activation *J. Exp. Med.* 196:753-63
12. Coffer PJ, Burgering BM. 2004. Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system *Nat. Rev. Immunol.* 4:889-99

13. Couriel D, Caldera H, Champlin R, Komanduri K. 2004. Acute graft-versus-host disease: pathophysiology, clinical manifestations, and management *Cancer* 101:1936-46
14. Cozine CL, Wolniak KL, Waldschmidt TJ. 2005. The primary germinal center response in mice *Curr. Opin. Immunol.* 17:298-302
15. Cyster JG. 2005. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs *Annu. Rev. Immunol.* 23:127-59
16. Dey BR, Yang YG, Szot GL, Pearson DA, Sykes M. 1998. Interleukin-12 inhibits graft-versus-host disease through an Fas-mediated mechanism associated with alterations in donor T-cell activation and expansion *Blood* 91:3315-22
17. Doerfler P, Forbush KA, Perlmutter RM. 2000. Caspase enzyme activity is not essential for apoptosis during thymocyte development *J. Immunol.* 164:4071-9
18. Ferrara JL, Yanik G. 2005. Acute graft versus host disease: pathophysiology, risk factors, and prevention strategies *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* 3:415-9, 428
19. Gerard GF, D'Alessio JM, Kotewicz ML, Noon MC. 1986. Influence on stability in *Escherichia coli* of the carboxy-terminal structure of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase *DNA* 5:271-9
20. Godfrey DI, Zlotnik A. 1993. Control points in early T-cell development *Immunol. Today* 14:547-53
21. Greer EL, Brunet A. 2005. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression *Oncogene* 24:7410-25
22. Guinamard R, Okigaki M, Schlessinger J, Ravetch JV. 2000. Absence of marginal zone B cells in *Pyk-2*-deficient mice defines their role in the humoral response *Nat. Immunol.* 1:31-6
23. Henderson SC, Bamezai A. 2003. Loss of *Ly-6A.2* expression on immature developing T cells in the thymus is necessary for their normal growth and generation of the *Vbeta* T-cell repertoire *Tissue Antigens* 62:117-32
24. Heyzer-Williams MG. 2003. B cells as effectors *Curr. Opin. Immunol.* 15:354-61
25. Houts GE, Miyagi M, Ellis C, Beard D, Beard JW. 1979. Reverse transcriptase from avian myeloblastosis virus *J. Virol.* 29:517-22
26. Hynes RO. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion *Cell* 69:11-25
27. Jacobs H, Von BH, Melief CJ, Berns A. 1990. Mutations in the major histocompatibility complex class I antigen-presenting groove affect both negative and positive selection of T cells *Eur. J. Immunol.* 20:2333-7

28. Janeway CA, Travers P. 1997. Immunology Heidelberg, Berlin, Stuttgart: Spektrum Akademischer Verlag GmbH
29. Jordan MS, Singer AL, Koretzky GA. 2003. Adaptors as central mediators of signal transduction in immune cells *Nat. Immunol.* 4:110-6
30. Kane LP, Lin J, Weiss A. 2000. Signal transduction by the TCR for antigen *Curr. Opin. Immunol.* 12:242-9
31. Kataoka Y, Iwasaki T, Kuroiwa T, Seto Y, Iwata N, Hashimoto N, Ogata A, Hamano T, Kakishita E. 2001. The role of donor T cells for target organ injuries in acute and chronic graft-versus-host disease *Immunology* 103:310-8
32. Khan AQ, Sen G, Guo S, Witte ON, Snapper CM. 2006. Induction of in vivo antipolysaccharide immunoglobulin responses to intact *Streptococcus pneumoniae* is more heavily dependent on Btk-mediated B-cell receptor signaling than antiprotein responses *Infect. Immun.* 74:1419-24
33. Koh JY, Wie MB, Gwag BJ, Sensi SL, Canzoniero LM, Demaro J, Csernansky C, Choi DW. 1995. Staurosporine-induced neuronal apoptosis *Exp. Neurol.* 135:153-9
34. Koretzky GA, Myung PS. 2001. Positive and negative regulation of T-cell activation by adaptor proteins *Nat. Rev. Immunol.* 1:95-107
35. Kotewicz ML, D'Alessio JM, Driftmier KM, Blodgett KP, Gerard GF. 1985. Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in *Escherichia coli* *Gene* 35:249-58
36. Kurosaki T. 2002. Regulation of B-cell signal transduction by adaptor proteins *Nat. Rev. Immunol.* 2:354-63
37. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* 227:680-5
38. Li SS. 2005. Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction *Biochem. J.* 390:641-53
39. Lo CG, Lu TT, Cyster JG. 2003. Integrin-dependence of lymphocyte entry into the splenic white pulp *J. Exp. Med.* 197:353-61
40. Lopes-Carvalho T, Kearney JF. 2004. Development and selection of marginal zone B cells *Immunol. Rev.* 197:192-205
41. Lu TT, Cyster JG. 2002. Integrin-mediated long-term B cell retention in the splenic marginal zone *Science* 297:409-12
42. Martin F, Kearney JF. 2002. Marginal-zone B cells *Nat. Rev. Immunol.* 2:323-35

43. Miethke T, Wahl C, Gaus H, Heeg K, Wagner H. 1994. Exogenous superantigens acutely trigger distinct levels of peripheral T cell tolerance/immunosuppression: dose-response relationship *Eur. J. Immunol.* 24:1893-902
44. Muller G, Hopken UE, Lipp M. 2003. The impact of CCR7 and CXCR5 on lymphoid organ development and systemic immunity *Immunol. Rev.* 195:117-35
45. Murphy KM, Reiner SL. 2002. The lineage decisions of helper T cells *Nat. Rev. Immunol.* 2:933-44
46. Mustelin T, Tasken K. 2003. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases *Biochem. J.* 371:15-27
47. Neuberger MS. 1997. Antigen receptor signaling gives lymphocytes a long life *Cell* 90:971-3
48. Oyaizu N, Chirmule N, Yagura H, Pahwa R, Good RA, Pahwa S. 1992. Superantigen staphylococcal enterotoxin B-induced T-helper cell activation is independent of CD4 molecules and phosphatidylinositol hydrolysis *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89:8035-9
49. Peschon JJ, Morrissey PJ, Grabstein KH, Ramsdell FJ, Maraskovsky E, Gliniak BC, Park LS, Ziegler SF, Williams DE, Ware CB, Meyer JD, Davison BL. 1994. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice *J. Exp. Med.* 180:1955-60
50. Pillai S. 1999. The chosen few? Positive selection and the generation of naive B lymphocytes *Immunity.* 10:493-502
51. Pillai S, Cariappa A, Moran ST. 2004. Positive selection and lineage commitment during peripheral B-lymphocyte development *Immunol. Rev.* 197:206-18
52. Pillai S, Cariappa A, Moran ST. 2005. Marginal zone B cells *Annu. Rev. Immunol.* 23:161-96
53. Qiao F, Bowie JU. 2005. The many faces of SAM *Sci. STKE.* 2005:re7
54. Radi ZA, Kehrli ME, Jr., Ackermann MR. 2001. Cell adhesion molecules, leukocyte trafficking, and strategies to reduce leukocyte infiltration *J. Vet. Intern. Med.* 15:516-29
55. Reddy P. 2003. Pathophysiology of acute graft-versus-host disease *Hematol. Oncol.* 21:149-61
56. Reddy P, Teshima T, Kukuruga M, Ordemann R, Liu C, Lowler K, Ferrara JL. 2001. Interleukin-18 regulates acute graft-versus-host disease by enhancing Fas-mediated donor T cell apoptosis *J. Exp. Med.* 194:1433-40
57. Rickert RC, Rajewsky K, Roes J. 1995. Impairment of T-cell-dependent B-cell responses and B-1 cell development in CD19-deficient mice *Nature* 376:352-5

58. Rouvier E, Luciani MF, Golstein P. 1993. Fas involvement in Ca(2+)-independent T cell-mediated cytotoxicity *J. Exp. Med.* 177:195-200
59. Sagaert X, De Wolf-Peeters C. 2003. Classification of B-cells according to their differentiation status, their micro-anatomical localisation and their developmental lineage *Immunol. Lett.* 90:179-86
60. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase *Science* 239:487-91
61. Saito T, Chiba S, Ichikawa M, Kunisato A, Asai T, Shimizu K, Yamaguchi T, Yamamoto G, Seo S, Kumano K, Nakagami-Yamaguchi E, Hamada Y, Aizawa S, Hirai H. 2003. Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development *Immunity.* 18:675-85
62. Schmaltz C, Alpdogan O, Horndasch KJ, Muriglian SJ, Kappel BJ, Teshima T, Ferrara JL, Burakoff SJ, van den Brink MR. 2001. Differential use of Fas ligand and perforin cytotoxic pathways by donor T cells in graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia effect *Blood* 97:2886-95
63. Semmrich M, Smith A, Feterowski C, Beer S, Engelhardt B, Busch DH, Bartsch B, Laschinger M, Hogg N, Pfeffer K, Holzmann B. 2005. Importance of integrin LFA-1 deactivation for the generation of immune responses *J. Exp. Med.* 201:1987-98
64. Stahl M, Dijkers PF, Kops GJ, Lens SM, Coffey PJ, Burgering BM, Medema RH. 2002. The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2 *J. Immunol.* 168:5024-31
65. Stein JV, Nombela-Arrieta C. 2005. Chemokine control of lymphocyte trafficking: a general overview *Immunology* 116:1-12
66. Sykes M, Spitzer TR. 2005. Protecting the host naturally *Nat. Med.* 11:1164-5
67. Tamada K, Shimozaki K, Chapoval AI, Zhu G, Sica G, Flies D, Boone T, Hsu H, Fu YX, Nagata S, Ni J, Chen L. 2000. Modulation of T-cell-mediated immunity in tumor and graft-versus-host disease models through the LIGHT co-stimulatory pathway *Nat. Med.* 6:283-9
68. Tan SL, Parker PJ. 2003. Emerging and diverse roles of protein kinase C in immune cell signalling *Biochem. J.* 376:545-52
69. Tomlinson MG, Lin J, Weiss A. 2000. Lymphocytes with a complex: adapter proteins in antigen receptor signaling *Immunol. Today* 21:584-91
70. Uchida T, Nakao A, Nakano N, Kuramasu A, Saito H, Okumura K, Ra C, Ogawa H. 2001. Identification of Nash1, a novel protein containing a nuclear localization signal, a sterile alpha motif, and an SH3 domain preferentially expressed in mast cells *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288:137-41

71. van den Broek ME, Kagi D, Ossendorp F, Toes R, Vamvakas S, Lutz WK, Melief CJ, Zinkernagel RM, Hengartner H. 1996. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice *J. Exp. Med.* 184:1781-90
72. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V *J. Immunol. Methods* 184:39-51
73. Walsh PT, Strom TB, Turka LA. 2004. Routes to transplant tolerance versus rejection; the role of cytokines *Immunity*. 20:121-31
74. White J, Herman A, Pullen AM, Kubo R, Kappler JW, Marrack P. 1989. The V beta-specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice *Cell* 56:27-35
75. Wu L. 2006. T lineage progenitors: the earliest steps en route to T lymphocytes *Curr. Opin. Immunol.* 18:121-6
76. Zeller C, Hinzmann B, Seitz S, Prokoph H, Burkhard-Goettges E, Fischer J, Jandrig B, Schwarz LE, Rosenthal A, Scherneck S. 2003. SASH1: a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q24.3 is downregulated in breast cancer *Oncogene* 22:2972-83

I DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernhard Holzmann für die Bereitstellung des Themas, die hilfreiche und freundliche Unterstützung, die engagierte Betreuung und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Herrn Prof. Dr. M. Schemann danke ich für die Betreuung der Arbeit von Seiten der Fakultät.

Den „Düsseldorfern“ Sandra und Bernhard danke ich für die gute Zusammenarbeit und dem Austausch der Daten und wünsche ihnen weiterhin viel Erfolg mit SLY.

Monika Ries ist die gute Seele der Arbeitsgruppe und stand immer mit Rat und Tat zur Seite.

Bei Heike, Sandra und Marit möchte ich mich für das Korrekturlesen bedanken.

Heike, Klaus und Marit danke ich für die Diskussionsbereitschaft und die wertvollen Tipps.

Moni, zusammen haben wir so einige Stunden im Tierstall verbracht und uns gegenseitig bei diversen Experimenten unterstützt.

Bernadett danke ich für die hilfreiche Unterstützung bei dem einen oder anderen Versuch.

Petra, Annette, Berni, Moni, Marit und Anja danke ich für so manch heitere Stunden auch nach Feierabend.

Zum Schluss danke ich allen Kollegen und inzwischen ehemaligen Kollegen für ihre Unterstützung und Hilfe im Laboralltag und die gute Arbeitsatmosphäre.