

Die Bedeutung der Intramembranprotease SPPL2a für die Entwicklung muriner B-Lymphozyten

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

vorgelegt von
Janna Schneppenheim
Kiel, Februar 2013

Referent: Prof. Dr. Paul Saftig
Korreferent: Prof. Dr. Matthias Leippe
Tag der mündlichen Prüfung: 10.04.2013
Zum Druck genehmigt: Kiel, den 10.04.2013
gez. Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl (Dekan)

***„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,
man muss sie für fertig erklären,
wenn man nach Zeit und Umständen
das Mögliche getan hat.“***

(Johann Wolfgang von Goethe)

I Inhaltsverzeichnis**II Abkürzungsverzeichnis VII**

1 Einleitung.....	1
1.1 Intramembranproteolyse	1
1.1.1 iCLIP Metalloproteasen	3
1.1.2 iCLIP Serinproteasen	3
1.1.3 iCLIP-Aspartylproteasen	3
1.1.3.1 Preseniline	4
1.1.3.2 <i>Signal peptide peptidase</i> (SPP)	6
1.1.3.3 <i>Signal peptide peptidase likes</i> (SPPLs)	7
1.1.3.3.1 Substrate von SPPLs	9
1.2 Die humorale Immunantwort	14
1.2.1 Allgemeine Grundlagen der Immunität	14
1.2.2 Die Strukturen von B-Zell-Rezeptor und Antikörpern	15
1.2.3 Entwicklung von B-Lymphozyten	16
1.2.3.1 Die Entstehung der Antikörpervielfalt (V(D)J-Verknüpfung)	16
1.2.3.2 Die Entwicklung muriner B-Zellen im Knochenmark	17
1.2.3.3 Die Reifung muriner B-Zellen in der Milz	20
1.2.4 B-Zell-Subtypen	22
1.2.5 Aktivierung von B-Zellen	24
1.3 MHC Klasse II Moleküle und ihr Chaperon CD74 (invariante Kette)	27
1.3.1 Antigenpräsentation durch MHCII	27
1.3.2 Die invariante Kette	28
1.4 Zielsetzung	31
2 Material und Methoden	32
2.1 Material	32
2.1.1 Chemikalien.....	32
2.1.2 Bakterienstämme.....	32
2.1.3 Mauslinien	32
2.1.4 Zelllinien	35
2.1.5 Plasmide	36

2.2 Methoden	37
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	37
2.2.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Gewebeproben	37
2.2.1.2 Isolierung von mRNA aus Zellen	38
2.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	38
2.2.1.4 Agarosegelelektrophorese	38
2.2.1.5 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	39
2.2.1.6 Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i> , PCR)	39
2.2.1.6.1 Genotypisierungs-PCR	40
2.2.1.6.2 Klonierungs-PCR	41
2.2.1.6.3 Kolonie-Kontroll-PCR	41
2.2.1.6.4 RT-PCR (Reverse Transkriptions-PCR)	42
2.2.1.7 Sequenzierungen	43
2.2.1.8 Restriktionsverdau	43
2.2.1.9 Ligation	44
2.2.1.10 Herstellung von elektrokompetenten <i>E. coli XLI-blue</i>	44
2.2.1.11 Transformation elektrokompetenter Bakterien (Elektroporation)	45
2.2.1.12 Amplifikation und Isolierung von Plasmiden	46
2.2.2 Zellbiologische Methoden	46
2.2.2.1 Zellkultur	46
2.2.2.1.1 Zellkulturbedingungen	46
2.2.2.1.2 Einfrieren von Zellen zur Lagerung	47
2.2.2.1.3 Auftauen von Zellen	47
2.2.2.1.4 Zellzahlbestimmung	48
2.2.2.2 Isolierung und Kultivierung von murinen Zellen	48
2.2.2.2.1 Gewinnung embryonaler Mausfibroblasten	48
2.2.2.2.2 Gewinnung von Einzellzellsuspensionen aus murinem Gewebe	49
2.2.2.2.3 Gewinnung von <i>Bone marrow derived dendritic cells</i> (BMDCs)	49
2.2.2.2.4 Isolierung von B-Zellen	50
2.2.2.3 Transfektion von Zellen	51
2.2.2.4 Durchflusszytometrie (<i>Fluorescence activated cell sorting</i> , FACS)	51

2.2.2.5	Untersuchung des Ca^{2+} Flusses nach B-Zell-Rezeptorstimulation	52
2.2.3	Immunisierung	53
2.2.4	Knochenmarktransplantation	54
2.2.5	Proteinbiochemische Methoden	54
2.2.5.1	Proteinisolierung aus Zellen	54
2.2.5.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	55
2.2.5.2.1	BCA-Assay	55
2.2.5.2.2	Proteinbestimmung nach Bradford	55
2.2.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	56
2.2.5.3.1	Glycin-SDS-PAGE (Laemmli-SDS-PAGE)	56
2.2.5.3.2	Tricin-SDS-PAGE	57
2.2.5.4	<i>Western blot</i>	58
2.2.5.4.1	<i>Western blot</i> von Glycin-SDS-Gelen	58
2.2.5.4.2	<i>Western blot</i> von Tricin-SDS-Gelen	59
2.2.5.5	Ponceau-Färbung	59
2.2.5.6	Proteindetektion auf <i>Western blots</i>	60
2.2.5.7	<i>Strippen</i> von <i>Western blots</i>	61
2.2.5.8	<i>Enzyme-linked immunosorbant assay</i> (ELISA)	62
2.2.5.8.1	Bestimmung der basalen Immunglobulinkonzentrationen im Plasma	62
2.2.5.8.2	Bestimmung der TNP-spezifischen Antikörper	63
2.2.5.8.3	Bestimmung der NF- κ B-Aktivität in Kernextrakten	63
2.2.6	Mikroskopische Methoden	64
2.2.6.1	Immunfluoreszenz	64
2.2.6.2	Untersuchung von Peyer'schen Plaques	66
2.2.6.3	β -Galaktosidase-Färbung von Mausembryonen	66
2.2.6.4	Histologie	67
2.2.6.4.1	Perfusion von Mäusen	67
2.2.6.4.2	Paraffinschnitte	68
2.2.6.4.3	Kryoschnitte	68
2.2.6.4.4	Hämatoxylin-/Eosin-Färbung (HE-Färbung)	69
2.2.6.4.5	Immunhistologie	70
2.2.6.4.6	Transmissions-Elektronenmikroskopie	70

3 Ergebnisse	72
3.1 Genotypisierung SPPL2a/b-defizienter Mäuse	72
3.2 Überprüfung der Defizienz von SPPL2a/b	73
3.3 Herstellung und Validierung von <i>SPPL2a</i> - und <i>SPPL2b</i> -Expressionskonstrukten	75
3.4 Allgemeine Charakterisierung der SPPL2a- und der SPPL2b-defizienten Mäuse	76
3.5 Immunologische Charakterisierung der SPPL2a- beziehungsweise SPPL2b-defizienten Mäuse	78
3.5.1 Durchflusszytometrische Analyse der Immunzellzusammensetzung	78
3.5.2 Morphologische und histologische Untersuchung der lymphatischen Organe	82
3.5.3 Humorale Immunreaktion in SPPL2a-defizienten Mäusen	84
3.5.4 Nachweis eines entwicklungspezifischen B-Zell-Defektes in SPPL2a-defizienten Mäusen	86
3.5.5 Defizienz verschiedener B-Zell-Subpopulationen	88
3.5.6 Ausschluss eines Stromazell-Defektes als Ursache für die B-Zell-Defizienz	90
3.5.7 Untersuchung wichtiger Signalwege in SPPL2a-defizienten B-Zellen	92
3.6 Die Intramembranproteolyse der invarianten Kette (CD74) durch SPPL2a und deren Bedeutung für die murine B-Zell-Entwicklung	96
3.6.1 SPPL2a und SPPL2b prozessieren CD74 bei Überexpression	96
3.6.2 CD74 ist ein Substrat von SPPL2a <i>in vivo</i>	98
3.6.3 Die Bedeutung von SPPL2b für die Prozessierung von endogenem CD74	100
3.6.4 Auswirkungen der fehlenden CD74-Intramembranproteolyse in den SPPL2a-defizienten B-Zellen	101
3.6.4.1 Akkumulation endosomaler Vesikel in <i>SPPL2a</i> ^{-/-} B-Zellen	101
3.6.4.2 Die veränderte Ultrastruktur SPPL2a-defizienter B-Zellen ist abhängig von der Akkumulation des N-terminalen Fragmentes von CD74	103
3.6.4.3 Untersuchung wichtiger Signalwege in <i>SPPL2a</i> ^{-/-} <i>CD74</i> ^{-/-} Mäusen	104
3.6.4.4 B-Zell-Entwicklung in <i>SPPL2a</i> ^{-/-} <i>CD74</i> ^{-/-} Mäusen	106

3.6.4.5	Funktionalität SPPL2a/CD74 doppelt-defizienter B-Zellen	109
4	Diskussion	111
4.1	SPPL2a und SPPL2b haben distinkte Funktionen <i>in vivo</i>	111
4.2	Der B-Zell-Defekt in <i>SPPL2a</i> ^{-/-} Mäusen	112
4.2.1	Beeinträchtigung der Reifung und Funktionalität von B-Zellen in <i>SPPL2a</i> ^{-/-} Mäusen	112
4.2.2	Der Vergleich von <i>SPPL2a</i> ^{-/-} Mäusen mit anderen B-Zell-defizienten Mauslinien	113
4.2.3	Beeinträchtigung wichtiger Signalwege in SPPL2a-defizienten B-Zellen ..	115
4.2.3.1	Signale über die Interaktion zwischen BAFF und dem BAFF-Rezeptor	115
4.2.3.2	Signale über den B-Zell-Rezeptor	117
4.3	Die Bedeutung bekannter Substrate von SPPL2a für die B-Zell-Entwicklung ...	119
4.4	Die Bedeutung von CD74 für die Reifung von B-Zellen	120
4.4.1	Die Akkumulation des N-terminalen Fragmentes von CD74 nicht aber das Fehlen der CD74-intrazellulären Domäne in <i>SPPL2a</i> ^{-/-} Mäusen führt zum B-Zell-Maturierungsdefekt	120
4.4.2	Die Akkumulation des N-terminalen Fragmentes von CD74 beeinflusst das endosomale Kompartiment	123
4.5	Warum wirkt sich SPPL2a-Defizienz spezifisch auf B-Zellen aus?	127
4.6	Vergleich des beobachteten B-Zell-Defektes mit dem anderer SPPL2a-defizienter Mauslinien	128
4.7	Ausblick	130
5	Zusammenfassung	135
6	Summary	137
7	Literaturverzeichnis	139
8	Anhang	162
8.1	Abbildungsverzeichnis	162
8.2	Tabellenverzeichnis	165

I Inhaltsverzeichnis	VI
9 Lebenslauf	167
10 Publikationen	168
11 Danksagung	169
12 Eidesstattliche Erklärung	170

II Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere (Stromeinheit)
aa	<i>Amino acid</i> (Aminosäure)
Abb.	Abbildung
ADAM	<i>A disintegrin and metalloprotease domain containing protein</i>
Amp	Ampicillin
APC	<i>Antigen presenting cell</i> (Antigenpräsentierende Zelle)
APC	Allophycocyanin
APP	<i>Amyloid precursor protein</i>
APS	Ammoniumpersulfat
BAFF	<i>B cell activating factor</i>
BAFF-R	BAFF-Rezeptor
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat
Bcl	<i>B cell lymphoma</i>
BCMA	<i>B cell maturation antigen</i>
BCR	<i>B cell receptor</i> (B-Zell-Rezeptor)
β-Gal	β-Galaktosidase
BMDCs	<i>Bone marrow derived dendritic cells</i>
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
C-	Carboxy-
°C	Grad Celsius
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CLIP	<i>Class II-associated li chain peptide</i>
cm	Zentimeter
Da	Dalton (Masseneinheit von Proteinen)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DABCO	Diazobicyclooctan
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid
DC	<i>dendritic cell</i> (dendritische Zelle)
ddH ₂ O	<i>doppelt deionisiertes Wasser</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGTA	<i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	<i>ER associated degradation</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ES	embryonale Stammzelle
EtOH	Ethanol
FasL	Fas Ligand
Fab-Fragment	<i>Fragment antigen binding</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
Fc-Fragment	<i>Fragment crystallizable</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>Forward Scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
FVenv	Foamyvirus <i>envelope</i> Protein
Fw	<i>forward</i> (vorwärts gerichtet)
g	Gramm
g	Erdschwerebeschleunigung (Maßeinheit der Zentrifugalkraft)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
H	human
HE	Hämatoxylin/Eosin
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HeLa	Henrietta Lacks
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-1-Ethansulfonsäure
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
ICD	<i>Intracellular domain</i> (intrazelluläre Domäne)
iCLIP	<i>Intramembrane cleaving protease</i> (Intramembranprotease)

Ig	Immunglobulin
IκB	inhibitorische NF-κB-Proteine
IKK	IκB-Kinase
<i>ko</i>	<i>knock-out</i>
IL	Interleukin
iRhoms	inaktive Rhomboide
kb	Kilobasenpaar
KLH	<i>Keyhole Limpet Hemocyanin</i>
KM	Knochenmark
l	Liter
LAMP	<i>Lysosome-associated membrane protein</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LK	Lymphknoten
LP18	18 kDa Leitpeptid des Foamyvirus <i>envelope</i> Proteins
LPS	Lipopolysaccharid
m	Meter
m	murin
M	molar, Mol/Liter
MIIC	<i>MHCII compartment</i> (MHC Klasse II Kompartiment)
MAP-Kinase	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MEF	murine embryonale Fibroblasten
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MIF	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>
min	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MVB	<i>Multi vesicular body</i>
MW	Mittelwert
MZ	Marginalzone
N-	amino-
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
neo	Neomycin
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen

NTF	N-terminales Fragment
OD	Optische Dichte
ORF	<i>Open reading frame</i> (offener Leserahmen)
p.a.	<i>pro analysis</i> (für analytische Zwecke)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PALS	periarterielle Lymphe
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS(T)	<i>Phosphate buffered saline</i> (+Tween 20)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	<i>pondus Hydrogenii</i> (<i>pondus</i> , Gewicht; <i>hydrogenium</i> , Wasserstoff)
PI	Propidiumiodid
POD	Peroxidase
PS	Presenilin
PZ	Peritonealzellen
Rags	<i>Recombination activating genes</i>
RIP	regulierte Intramembranproteolyse
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
Upm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase PCR
Rv	<i>reverse</i> (rückwärts gerichtet)
s	Sekunde
S1P, S2P	<i>Site 1</i> Protease, <i>Site 2</i> Protease
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SPP	<i>Signal peptide peptidase</i>
SPPL	<i>Signal peptide peptidase like</i>
SREBP	<i>Sterol regulatory element binding protein</i>
ss	<i>single stranded</i> (einzelsträngig)
SSC	<i>Sideward Scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
Stabw	Standardabweichung

Std	Stunde
SV	<i>Simian Virus</i>
T1/2	Transitional 1/2
Tab.	Tabelle
TACE	<i>Tumor necrosis factor alpha converting enzyme</i>
TACI	<i>Transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor</i>
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS(T)	<i>Tris buffered saline</i> (+Tween 20)
TCR	<i>T cell receptor</i> (T-Zell-Rezeptor)
TD	<i>Thymus dependent</i> (Thymus-abhängig)
TdT	terminale Desoxynukleotidyltransferase
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TI	<i>Thymus independent</i> (Thymus-unabhängig)
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAF	TNF-Rezeptor-assoziiertes Faktor
TNP	Trinitrophenol
U	<i>Unit</i> (Einheit der enzymatischen Aktivität)
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
V(D)J, C	<i>Variable (Diversity) Joining, Constant</i>
wt	Wildtyp
(v/v)	<i>volume per volume</i>
(w/v)	<i>weight per volume</i>
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid
z.B.	zum Beispiel

Einheiten

k	Kilo (10^3)
m	Milli (10^{-3})
μ	Mikro (10^{-6})
n	Nano (10^{-9})

1 Einleitung

1.1 Intramembranproteolyse

Proteasen sind eine Gruppe von Enzymen, deren Funktion es ist, die Peptidbindungen von Proteinen und Peptiden irreversibel zu hydrolysieren. Ausgehend von dem Aufbau ihres aktiven Zentrums erfolgt eine Unterteilung in fünf verschiedene Klassen, die Aspartat-, Cystein-, Serin-, Threonin- und Metalloproteasen (Ehrmann & Clausen 2004). Proteasen kommen in allen lebenden Organismen vor und ihre Funktionen sind überaus vielfältig. So dienen sie dem Abbau fehlgefalteter oder nicht mehr benötigter Proteine, katalysieren die Proteinmaturierung beziehungsweise -aktivierung und kontrollieren durch die Prozessierung regulatorischer Proteine wichtige Signalwege (Müller-Esterl 2009; Wolfe 2009). Die Interaktion mit einem Substrat erfolgt dabei in vielen Fällen mit hoher Spezifität für Bindung und Prozessierung (Ehrmann & Clausen 2004).

Bis vor einigen Jahren, galten Proteasen als wasserlösliche Enzyme die entweder vollständig in wässrigem Milieu vorlagen oder über einen Membran-Anker (z.B. GPI-Anker) oder eine Transmembrandomäne mit der Membran assoziiert waren. In beiden Fällen lag das katalytische Zentrum zur hydrolytischen Spaltung der Peptidbindung in einer wässrigen Umgebung vor, wodurch der für die Reaktion notwendige Wasserzutritt gewährleistet war (Wolfe 2009). Mit der Entdeckung einer putativen, innerhalb der Transmembrandomäne lokalisierten Schnittstelle des *Sterol regulatory element binding proteins 2* (SREBP-2) begann die Erforschung einer neuen Gruppe von Proteasen, welche ihre Substrate in der hydrophoben Transmembrandomäne schneiden. Dieser als regulierte Intramembranproteolyse (*Regulated intramembrane proteolysis*, RIP) bezeichnete Prozess ermöglicht nicht nur den Abbau von Proteinen innerhalb der Membran, sondern auch eine vollkommen andere Art der Signaltransduktion in Zellen, bei denen das Signalmolekül direkt aus einem Transmembranprotein freigesetzt wird (Duncan *et al.* 1998; Sakai *et al.* 1996). Dabei erfolgt RIP in den meisten bisher beschriebenen Fällen in zwei Schritten. Im Anschluss an die proteolytische Abspaltung der Substratektodomäne nahe der Membran durch eine andere Protease, auch als *Shedding* bezeichnet, erfolgt der zweite Schnitt innerhalb der Transmembrandomäne. Häufig ist der Schnitt durch die erste Protease notwendig, damit das Substrat in das katalytische Zentrum der Intramembranprotease (*Intramembrane cleaving protease*, iCLIP) gelangen kann. Somit bietet die Expression und Aktivität dieser ersten

Protease eine Kontrollmöglichkeit über die anschließende Intramembranproteolyse (Brown *et al.* 2000).

Die Hydrolyse von Proteinen innerhalb der hydrophoben Transmembranregion stellt verschiedene Anforderungen an die Protease. So muss beispielsweise der Zutritt des Wassers in das katalytische Zentrum innerhalb einer lipophilen Umgebung gewährleistet sein. Aufschluss über den Mechanismus, wie dies in den iCLIPs ermöglicht wird, gab die Kristallisation der Rhomboid-Intramembranprotease GlpG aus *Escherichia coli* (*E. coli*) (Ben-Shem *et al.* 2007; Wang *et al.* 2006; Wu *et al.* 2006). Demnach liegt das aktive Zentrum des Enzyms, welches die Aminosäuren Histidin und Serin beinhaltet etwa 10 Å unter der Membranoberfläche in einer wassergefüllten Aushöhlung, die durch sechs umliegende Transmembrandomänen geformt wird. Es wird angenommen, dass das Substrat zwischen den Transmembrandomänen 2 und 5 eintritt und dass Transmembrandomäne 5 als Schleuse fungiert, welche die Zugänglichkeit des katalytischen Zentrums moduliert (Baker *et al.* 2007; Lal & Caplan 2011; Lemberg & Freeman 2007). Aufgrund der Ähnlichkeiten innerhalb der Topologien der verschiedenen iCLIPs ist davon auszugehen, dass dieses Prinzip auch auf die anderen Vertreter der Gruppe übertragen werden kann. Die Substrate selbst liegen innerhalb der Transmembrandomäne typischerweise in α -helikaler Konformation vor, wodurch die Hydrolyse der Peptidbindungen sterisch inhibiert wird. Aus diesem Grund ist es notwendig, die Helix aufzubrechen, bevor die Proteolyse stattfinden kann. Erreicht wird dies bei den meisten iCLIPs durch so genannte *helix breaking residues*, Aminosäuresequenzen innerhalb der Transmembrandomänen der Substrate, welche die Entwindung der α -Helix ermöglichen (Wolfe & Kopan 2004).

Neben diesen für die lipophile Umgebung wichtigen Besonderheiten, zeigen Intramembranproteasen jedoch viele Gemeinsamkeiten zu den bekannten wasserlöslichen Proteasen. So entsprechen die beschriebenen katalytischen Motive der iCLIPs denen herkömmlicher Proteasen. Bisher wurden Vertreter der Metallo-, Serin- und Aspartylproteasen beschrieben. Lediglich Cystein- und Threonin-Intramembranproteasen wurden noch nicht identifiziert (Tab. 1.1), (Wolfe & Kopan 2004).

Tab. 1.1: Beispiele und Eigenschaften verschiedener iCLIPs, modifiziert nach (Beel & Sanders 2008)

Proteasefamilie	Vertreter	Katalytisches Motiv	Shedding	Helix breaking residues	Konsensussequenz für Schnittstelle
Metalloproteasen	S2P	HExxH	Ja	Ja	Nein
Serinproteasen	Rhomboide	GxSG, H	Nein	Ja	Nein
Aspartylproteasen	Preseniline	YD, GxGD	Ja	Eventuell	Nein
	SPP/SPPLs	YD, GxGD	Ja	ja	Nein

1.1.1 iCLIP Metalloproteasen

Wie zuvor erwähnt wurde RIP erstmals im Zusammenhang mit der Prozessierung des *Sterol regulatory element binding proteins* (SREBP) beschrieben, einem Prozess, der für die zelluläre Cholesterolhomöostase von entscheidender Bedeutung ist (Duncan *et al.* 1998; Sakai *et al.* 1996). SREBP wird als ein Vorläuferprotein synthetisiert, welches die Membran zweimal durchspannt. Bei sinkendem Sterolgehalt gelangt SREBP in den Golgi-Apparat in dem zunächst die Proteolyse von SREBP innerhalb der luminalen Domäne durch die Site 1 Protease S1P stattfindet. Dadurch entstehen zwei einzelne Transmembranfragmente, von denen das N-terminale Fragment der weiteren Intramembranproteolyse durch die Site 2 iCLIP Metalloprotease S2P unterliegt (Wolfe & Kopan 2004; Ye *et al.* 2000).

Die Proteolyse durch S2P führt zur Freisetzung eines löslichen N-terminalen Fragmentes in das Zytosol, welches als Transkriptionsfaktor die Aktivierung von Genen bewirkt, welche für Enzyme der Lipidsynthese kodieren (Brown & Goldstein 1997; Lal & Caplan 2011; Wolfe 2009).

1.1.2 iCLIP Serinproteasen

Der *Epidermal growth factor* Rezeptor (EGFR) Ligand Spitz aus *Drosophila* wurde als erstes Substrat einer iCLIP Serinprotease identifiziert (Urban *et al.* 2001). Im Golgi Apparat katalysiert die Serinprotease Rhomboid-1 die Hydrolyse von Spitz innerhalb der Transmembranregion. Dies führt zur Sekretion einer aktiven Form von Spitz, wodurch eine interzelluläre Kommunikation ermöglicht wird (Lee *et al.* 2001; Wolfe & Kopan 2004). Anders als bei den meisten iCLIPs ist für die proteolytische Aktivität von Rhomboiden kein vorhergehender Schnitt durch eine andere Protease nötig. Die Aktivität wird demnach vor allem durch die Kolokalisation von Substrat und Protease sowie die Expression der Rhomboide reguliert (Lee *et al.* 2001; Urban *et al.* 2001).

1.1.3 iCLIP Aspartylproteasen

Preseniline (Presenilin1 (PS1) oder Presenilin 2 (PS2)), die katalytisch aktive Untereinheit des γ -Sekretasekomplexes sowie die *Signal peptide peptidase* (SPP) und *Signal peptide peptidase likes* (SPPLs) gehören zur Familie der iCLIP Aspartylproteasen. Das katalytische Zentrum dieser Proteasen wird durch die stark konservierten Motive YD und GxGD gebildet, welche

sich innerhalb zweier benachbarter Transmembrandomänen befinden und die für die proteolytische Aktivität entscheidenden Aspartate enthalten. Zudem weisen Proteasen dieser Familie ein konserviertes PAL-Motiv nahe ihrem C-Terminus auf, dessen Funktion bisher noch ungeklärt ist. Erste Untersuchungen lassen allerdings vermuten, dass diese Sequenz für den Aufbau des katalytischen Zentrums eine wichtige Bedeutung hat (Fluhrer *et al.* 2009). Beim Vergleich der Topologien von Presenilinen mit denen von SPP und SPPLs fällt die umgekehrte Orientierung der katalytischen Motive innerhalb der Membran auf (Abb. 1.1). Es wird davon ausgegangen, dass dieser Unterschied zwischen den Proteasen Einfluss auf deren Substratspezifität hat. Tatsächlich handelt es sich bei fast allen der bisher identifizierten Presenilin-Substrate um Typ I Transmembranproteine, bei denen der C-Terminus im Zytoplasma und der N-Terminus extrazellulär beziehungsweise luminal lokalisiert ist. Die Substrate von SPP und SPPLs zeigen im Gegensatz hierzu eine Typ II Orientierung, bei welcher der N-Terminus im Zytoplasma liegt (Friedmann *et al.* 2004; Haapasalo & Kovacs 2011).

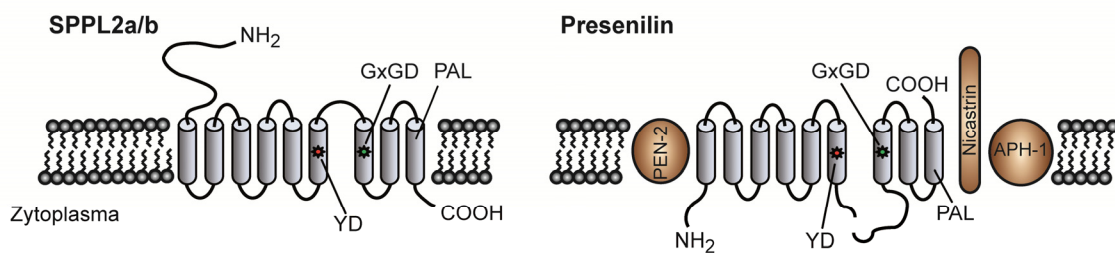


Abb. 1.1: Topologien von SPPL2a/b und Presenilinen. Die beiden Intramembranproteasen zeigen eine entgegengesetzte Orientierung in der Membran, die auch ihre katalytischen Zentren umfasst. Im Falle beider Proteasen wird dieses durch die katalytischen Motive YD und GxGD gebildet. Sowohl Preseniline als auch SPPLs enthalten zudem ein konserviertes PAL-Motiv in der am weitesten C-terminal gelegenden Transmembrandomäne. Preseniline sind aufgrund eines endoproteolytischen Schnittes in ein N-terminales Fragment von sechs und ein C-terminales Fragment von drei Transmembrandomänen unterteilt. Jedes Fragment enthält eines der beiden für die proteolytische Aktivität kritischen Aspartate. Presenilin bildet zusammen mit PEN-2, Nicastrin und APH-1 den katalytisch aktiven γ -Sekretasekomplex; modifiziert nach (Friedmann *et al.* 2004) und (Fluhrer *et al.* 2009).

1.1.3.1 Preseniline

Im Gegensatz zu allen anderen bisher identifizierten Intramembranproteasen katalysieren Preseniline die Hydrolyse ihrer Substrate nicht eigenständig sondern lagern sich zu einem Komplex aus vier Transmembranproteinen zusammen, der als γ -Sekretasekomplex bezeichnet wird. Expressionsstudien in Hefe, die keine endogene γ -Sekretaseaktivität aufweist, zeigten dass die Koexpression von Presenilin, Nicastrin, *Anterior pharynx-defective 1* (Aph-1) und *Presenilin enhancer 2* (Pen-2) sowohl nötig als auch ausreichend ist, um die Funktionalität

des γ -Sekretasekomplexes zu gewährleisten (Edbauer *et al.* 2003). Als katalytische Untereinheit agiert dabei entweder Presenilin 1 oder Presenilin 2. Beide Homologe bestehen aus neun Transmembrandomänen und enthalten die für die proteolytische Aktivität essentiellen Motive GxGD und YD (Abb. 1.1), (Fluhrer *et al.* 2009). Durch die Interaktion mit Pen-2 kommt es zur endoproteolytischen Spaltung des Presenilin-Holoproteins in ein N-terminales und ein C-terminales Fragment, von denen jedes jeweils eines der für die katalytische Aktivität benötigten Aspartate enthält (Abb. 1.1). Nach erfolgreicher Komplexreifung wird dieser an die Plasmamembran oder in die Endosomen transportiert, wo er seine proteolytische Aktivität entfaltet (Kaether *et al.* 2006; Wolfe 2006).

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei fast allen der über 90 bisher identifizierten Substrate des γ -Sekretasekomplexes um Typ I Transmembranproteine (Haapasalo & Kovacs 2011). Zu ihnen gehören beispielsweise der Rezeptor Notch, das *Amyloid precursor protein* (APP), dem die Preseniline ihre Entdeckung verdanken, CD44, Erb-B4, E- und N-Cadherine, der *Low Density* Lipoprotein Rezeptor, Nectin-1 und die Notch Liganden Delta und Jagged. Die sehr hohe Anzahl verschiedener Substrate ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die γ -Sekretase im Unterschied zu allen anderen untersuchten Intramembranproteasen keine *Helix breaking residues* benötigt (Wolfe 2009).

Durch die genetische Untersuchung familiärer Alzheimererkrankungen konnte gezeigt werden, dass diese frühe Form der Erkrankung in einigen Fällen mit Mutationen in einem von zwei Genen hervorging, die als Presenilin 1 und 2 bezeichnet wurden (Bekris *et al.* 2010; Levy-Lahad *et al.* 1995; Rogaev *et al.* 1995; Sherrington *et al.* 1995). Ursächlich für diesen Zusammenhang ist die Beteiligung von Presenilinen an der Prozessierung von APP und der daraus resultierenden Freisetzung des A β -Peptids, einem wesentlichen Bestandteil der Ablagerungen im zentralen Nervensystem von Alzheimerpatienten (Bekris *et al.* 2010; Saftig *et al.* 1999).

Das nach bisherigen Analysen bedeutendste Substrat der γ -Sekretase ist Notch, ein Transmembranrezeptor an der Zelloberfläche, der für die Differenzierung von Zellen eine wichtige Funktion hat und somit bei Entwicklungsprozessen verschiedenster Art von entscheidender Bedeutung ist (Selkoe & Kopan 2003). Die Bindung eines der Notch-Liganden (Delta-like/Jagged) an den Rezeptor führt zur Proteolyse von Notch durch die *A disintegrin and metalloprotease domain containing protein-* (ADAM-) Protease *Tumor necrosis factor alpha converting enzyme* (TACE, ADAM17) oder ADAM10. Das verbleibende Transmembranfragment wird im Anschluss durch den γ -Sekretasekomplex geschnitten und die entstandene N-terminale intrazelluläre Domäne (*Notch intracellular domain*, NICD) ge-

langt in den Zellkern, wo sie durch die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren die Expression von Notch-Zielgenen bewirkt (Bozkulak & Weinmaster 2009; Brown *et al.* 2000; Jorissen *et al.* 2010; Weber *et al.* 2011; Wolfe & Kopan 2004).

1.1.3.2 *Signal peptide peptidase (SPP)*

Im Vergleich mit dem γ -Sekretasekomplex ist der Aufbau des Presenilin-Homologs *Signal peptide peptidase* (SPP) stark vereinfacht. So zeigen Expressionsstudien in Hefe, dass SPP keine weiteren Kofaktoren zu benötigen scheint. Auch ein endoproteolytischer Schnitt findet nicht statt (Weihofen *et al.* 2002; Wolfe & Kopan 2004). SPP scheint jedoch als Homodimer aktiv zu sein (Nyborg *et al.* 2004).

Die Substrate weisen *Helix breaking residues* auf (Lemberg & Martoglio 2002). Die Funktion der Protease ist es, in der Membran verbliebene Signalpeptide zu schneiden, nachdem diese durch die Signal Peptidase freigesetzt wurden (Lyko *et al.* 1995). Dieser Prozess spielt zudem eine entscheidende Rolle im Immunsystem. Die bei der Synthese des Haupthistokompatibilitätskomplexes I (*Major Histocompatibility Complex class I*, MHCI) anfallenden Signalpeptide werden ebenfalls von SPP geschnitten und die entstandenen Fragmente werden auf der Zelloberfläche präsentiert. Dies stellt ein entscheidendes Signal für Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) dar, dass die MHCI-Synthese regulär verläuft (Lemberg *et al.* 2001). Interessant ist die Protease aber auch als potenzielles Ziel antiviraler Therapien bei Hepatitis C Erkrankungen, da das Virus die Aktivität des Enzyms für die Maturierung seines Core-Proteins nutzt (McLauchlan *et al.* 2002).

Neben diesen proteolytischen Funktionen wurde in den letzten Jahren zudem eine wichtige Rolle von SPP für den *ER associated degradation-* (ERAD-) Prozess beschrieben (Crawshaw *et al.* 2004). Dieser ermöglicht die Ausschleusung fehlgefalteter Proteine aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) und die konsequente Degradierung durch das Ubiquitin-Proteasom-System im Zytoplasma. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die katalytisch aktive Form von SPP als auch eine katalytisch inaktive Mutante mit fehlgefalteten Proteinen im ER interagiert und in Komplexen verschiedener Größen vorkommt. Daher wird angenommen, dass SPP eine wichtige Bedeutung für die Erkennung und den Transport fehlgefalteter Proteine aus dem ER hat, welche unabhängig von dessen proteolytischer Funktion ist und durch die Interaktion mit weiteren Proteinen reguliert wird (Lu *et al.* 2012; Schrul *et al.* 2010). Diese Eigenschaft macht SPP zudem zu einem interessanten Ziel für die Malariatherapie. Der Erreger dieser Krankheit, der Parasit *Plasmodium falciparum*, besitzt im Vergleich zu

höheren eukaryotischen Zellen ein stark reduziertes ERAD-Netzwerk und zeigt aus diesem Grund eine hohe Sensitivität gegenüber der Inhibierung einzelner Komponenten. SPP-Inhibitoren wirken daher toxisch auf verschiedene Entwicklungsstadien von *Plasmodium falciparum* sowie einiger anderer protozoischer Parasiten (Harbut *et al.* 2012). Eine bedeutende Rolle spielt diese nicht-proteolytische Funktion von SPP auch bei der humanen Cytomegalie-Virusinfektion. In infizierten Zellen wird die Präsentation der viralen Peptide durch MHCI-Moleküle dadurch verhindert, dass die schwere Kette von MHCI aus der ER-Membran freigesetzt und im Zytoplasma abgebaut wird. Die Interaktion von SPP mit einem viralen Protein, sowie weiteren humanen Proteinen ist für diese Freisetzung wichtig (Lee *et al.* 2010; Loureiro *et al.* 2006; Stagg *et al.* 2009).

1.1.3.3 *Signal peptide peptidase likes (SPPLs)*

Vergleichende Datenbankanalysen führten zur Entdeckung einer ganzen Familie Presenilin-Homologer (PSH) beziehungsweise SPP-Homologer (*Signal peptide peptidase likes*, SPPLs) mit Vertretern in Pilzen, Pflanzen, Arthropoden, Nematoden, Vertebraten und Archaea (Friedmann *et al.* 2004; Ponting *et al.* 2002; Weihofen *et al.* 2002), (Abb.1.2).

Im humanen Genom wurden vier SPP-Homologe identifiziert, die als SPPL2a, SPPL2b, SPPL2c und SPPL3 bezeichnet werden (Golde *et al.* 2009). Dabei zeigt SPPL3 die stärkste Homologie zu SPP. Die beiden Proteine sind zu 25 % identisch und zu 45 % homolog. SPPL2a, SPPL2b und SPPL2c bilden eine weitere Subfamilie. Das SPPL2c-Gen zeigt im Gegensatz zu den anderen Vertretern der Familie die Besonderheit, dass es keine Introns enthält. Zudem ist die Sequenz stark polymorph. SPPL2c-mRNA konnte zwar in verschiedenen Geweben detektiert werden, allerdings steht der Nachweis auf Proteinebene endogen noch aus. Daher wird diskutiert, ob es sich bei SPPL2c möglicherweise um ein Pseudogen handeln könnte. SPPL2a und SPPL2b sind Proteine mit einem Molekulargewicht von zirka 75 kDa, die zu etwa 50 % identisch und zu 70 % homolog sind (Friedmann *et al.* 2004; Golde *et al.* 2009).

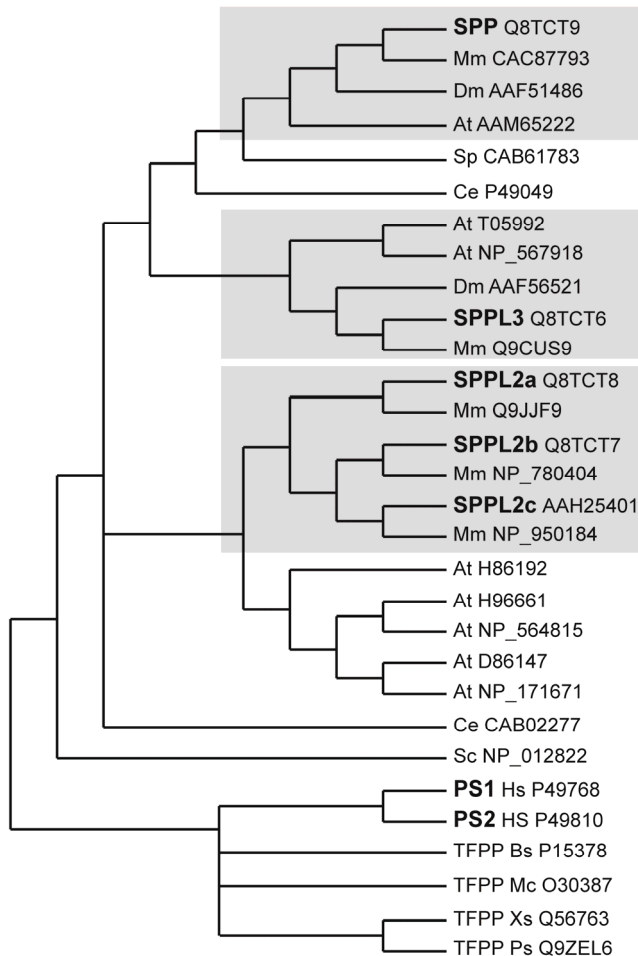


Abb. 1.2: Stammbaum der GxGD Aspartatproteasen basierend auf Datenbankanalysen. Abbildung entnommen aus (Friedmann *et al.* 2004). Humane Proteine sind hervorgehoben. *Hs*, *Homo sapiens*; *Mm*, *Mus musculus*; *Dm*, *Drosophila melanogaster*; *At*, *Arabidopsis thaliana*; *Sp*, *Schizosaccharomyces pombe*; *Ce*, *Cenorhabditis elegans*; *Sc*, *Saccharomyces cerevisiae*; *Bs*, *Bacillus subtilis*; *Ps*, *Pseudomonas strutzer*; *Xc*, *Xanthomonas campestris*; *Mc*, *Myxococcus xanthus*.

Sie zeigen nicht nur gewebespezifische Unterschiede in der Expression sondern auch unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen. Endogenes SPPL2a konnte in murinen embryonalen Fibroblasten detektiert werden, wo es mit den lysosomalen beziehungsweise spät endosomalen Markern *Lysosome-associated membrane protein 2* (LAMP2) und Bis(monoacylglycero)phosphat (BMP) kolokalisierte. Es konnte gezeigt werden, dass ein Tyrosin-Motiv am zytosolischen C-terminalen Ende der Protease entscheidend für diese Lokalisation ist (Behnke *et al.* 2011), (Abb. 1.3). Die Identifizierung von SPPL2a in lysosomalen Membranen aus humaner Plazenta durch proteomische Analyse bestätigte die lysosomale Lokalisation (Schröder *et al.* 2007). Im Gegensatz hierzu wurde überexprimiertes SPPL2b überwiegend an der Plasmamembran detektiert (Behnke *et al.* 2011; Friedmann *et al.* 2006).

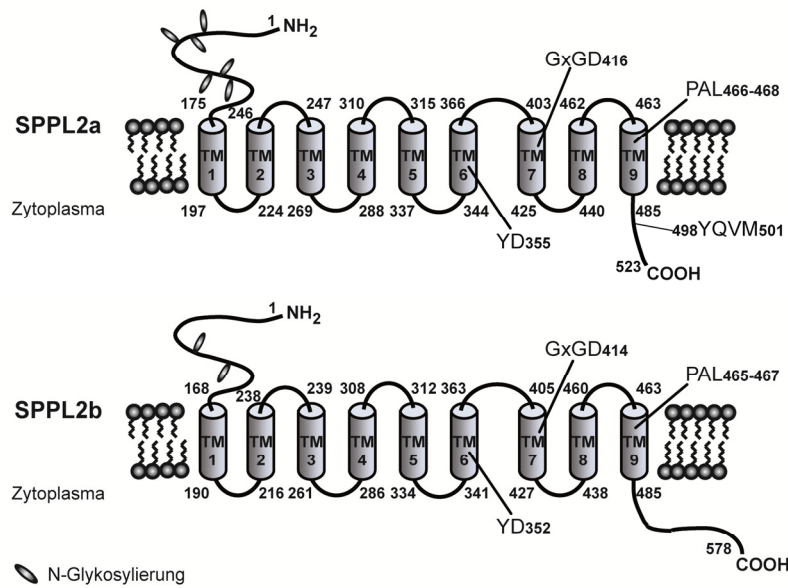


Abb. 1.3: Topologie des murinen SPPL2a und SPPL2b nach Angaben durch UniProtKB. Die Zahlen geben die jeweils an die Transmembrandomänen angrenzenden Aminosäuren an. Dargestellt sind außerdem die Positionen der katalytischen Motive, der PAL-Sequenz, des lysosomalen Sortierungsmotivs und der N-Glykosylierungsstellen.

SPPL2c und SPPL3 wurden bei Überexpression im Endoplasmatischen Retikulum beziehungsweise im Golgi Apparat nachgewiesen (Friedmann *et al.* 2006; Krawitz *et al.* 2005).

1.1.3.3.1 Substrate von SPPLs

Über die funktionelle Relevanz der SPPLs ist derzeit noch wenig bekannt. Primär basierend auf Überexpressionsstudien wurden bisher drei Substrate beschrieben, die von SPPL2a/SPPL2b geschnitten werden. Dabei handelt es sich um den Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) (Fluhrer *et al.* 2006; Friedmann *et al.* 2006), den Fas Liganden (FasL) (Kirkin *et al.* 2007) und das Bri2b Protein (Martin *et al.* 2008).

Kürzlich konnte außerdem gezeigt werden, dass das 18 kDa *Leader peptide* (LP18) des Foamyvirus *envelope* Proteins (FVenv) durch SPPL3 und SPPL2a/b geschnitten werden kann. Im Gegensatz zu allen anderen bisher identifizierten GxGD Intramembranproteasen ist SPPL3 jedoch in der Lage FVenv auch ohne vorherige Prozessierung durch eine andere Protease zu schneiden. SPPL3 erfüllt hiermit die Funktion einer *Sheddase* und generiert so das Substrat für die weitere Proteolyse durch SPPL2a/b (Voss *et al.* 2012). Eine vergleichbare Eigenschaft ist innerhalb der Intramembranproteasen bisher nur von den Rhomboiden bekannt (Urban & Freeman 2003).

Der Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) ist neben Lymphotoxin- α (TNF β) einer der ersten identifizierten Vertreter der TNF-Superfamilie. Bei dieser Gruppe von Proteinen handelt es sich um Zytokine mit Typ II Topologie, die durch die Bindung an entsprechende TNF-Rezeptoren eine grundlegende Bedeutung für die Entwicklung und die Funktion des Immunsystems haben. In Abhängigkeit von der Zielzelle und der Präsenz weiterer, kostimulierender Zytokine reguliert TNF α beispielsweise Zelldifferenzierung, Zellproliferation, die Entwicklung lymphatischer Organe, die Aktivierung der Expression weiterer Zytokine und Adhäsionsmoleküle, sowie das Auslösen von Fieber. Um diese vielfältigen Effekte auszuüben, kann TNF α verschiedene Signalwege wie den *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*- (NF- κ B-) oder den *Mitogen-activated protein kinase*- (MAP-Kinase-) Signalweg aktivieren oder Apoptose induzieren (Baud & Karin 2001; Chen & Goeddel 2002; Locksley *et al.* 2001). TNF α liegt als Homotrimer an der Plasmamembran vor und kann entweder in membrangebundener Form oder nach Freisetzung der Ektodomäne (TNF α sol) durch die Metalloprotease TACE als lösliches Trimer an seine Rezeptoren binden (Black *et al.* 1997; Kriegler *et al.* 1988; Tang *et al.* 1996). Es konnte gezeigt werden, dass dieser *Shedding*-Prozess durch LPS induziert wird (Horiuchi *et al.* 2007; Mohler *et al.* 1994). Eine Fehlsteuerung der TNF α -Produktion, der Signalübertragung oder erhöhtes *Shedding* sind für schwere Erkrankungen wie beispielsweise Sepsis, Krebs, Osteoporose oder verschiedene Autoimmundefekte ursächlich (Chen & Goeddel 2002; Locksley *et al.* 2001).

Durch die Typ II Topologie von TNF α sowie dessen *Shedding* durch TACE erfüllt dieses Zytokin wichtige Voraussetzungen eines Substrates von SPPLs. Tatsächlich konnte durch Koexpressionsstudien von TNF α und Mitgliedern der SPP/SPPL Familie in HeLa Zellen gezeigt werden, dass sowohl SPPL2a als auch SPPL2b in der Lage sind, TNF α zu schneiden (Fluhrer *et al.* 2006; Friedmann *et al.* 2006), (Abb.1.4). Die Koexpression der entsprechenden Protease mit dem Zytokin führte zur Freisetzung einer intrazellulären Domäne, welche im *Western blot* detektiert werden konnte. Im Gegensatz hierzu zeigte die Koexpression mit einer jeweils inaktiven Form der beiden Proteasen keine ICD-Generierung, jedoch die Akkumulation eines N-terminalen Fragmentes. Diese Akkumulation des NTFs konnte zudem endogen nach *Shedding*-Induktion und Behandlung mit SPPL-Inhibitoren bestätigt werden (Fluhrer *et al.* 2006; Friedmann *et al.* 2006). Massenspektrometrische Analysen sowie Radiosequenzierung zeigten, dass TNF α an multiplen Positionen innerhalb der Membran geschnitten wird, wie es bereits für einige Substrate anderer Intramembranproteasen gezeigt wurde. Es wird angenommen, dass dies die Freisetzung der Fragmente aus der Membran erleichtert (Fluhrer *et al.* 2006; Fluhrer *et al.* 2009; Sato *et al.* 2006).

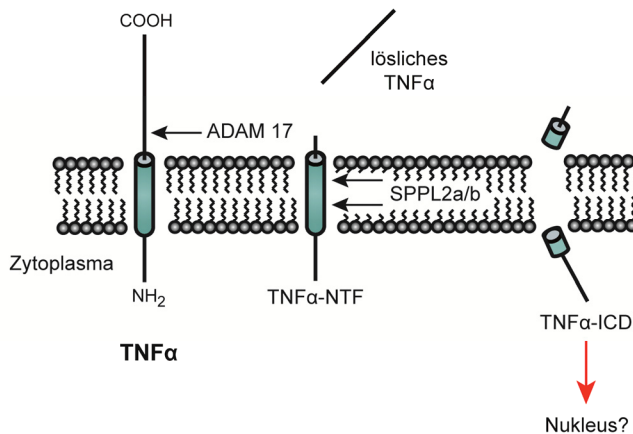


Abb. 1.4: Proteolyse von TNF α . Infolge des *Sheddings* durch ADAM17 erfolgt die Freisetzung der TNF α -Ektodomäne (lösliches TNF α). Ein N-terminales Fragment verbleibt in der Membran und kann durch SPPL2a oder SPPL2b geschnitten werden. Eine Translokation und Signalfunktion der hierdurch generierten intrazellulären Domäne wird diskutiert, modifiziert nach (Fluhrer *et al.* 2009).

Wie zuvor erwähnt, existiert für TNF α sowohl eine membrangebundene als auch eine lösliche Form. Beide Formen sind aktiv, unterscheiden sich jedoch in einigen Funktionen. Dies ist vergleichbar für viele Mitglieder der TNF-Superfamilie beschrieben. Es wird diskutiert, dass die membrangebundene Form des Liganden nicht nur Signale an einen Rezeptor übermitteln, sondern durch dessen Bindung diese auch selbst empfangen kann. Dieser Vorgang wird als reverse Signalübermittlung bezeichnet und ermöglicht eine bidirektionale Kommunikation zwischen Rezeptor- und Ligand-exprimierender Zelle (Eissner *et al.* 2004).

Die durch die Intramembranproteolyse generierte TNF α -ICD weist eine Kernlokalisationssequenz auf, weshalb eine Funktion dieses Fragmentes als Signalmolekül in Betracht gezogen wird (Domonkos *et al.* 2001). Eine Untersuchung erfolgte in humanen dendritischen Zellen, die eine starke SPPL2a Expression zeigen und TNF α nach LPS-Stimulation exprimieren. Eines der Zytokine, die nach Stimulation dendritischer Zellen sezerniert werden, ist Interleukin 12 (IL12), welches für die Differenzierung von T-Helfer-1-Zellen essentiell ist. Es ist bekannt, dass die Produktion von IL12 in Abhängigkeit von TNF α erfolgt. Daher wurde untersucht, ob die Produktion von IL12 von der Prozessierung von TNF α durch SPPL2a oder SPPL2b beeinflusst wird. Erste Ergebnisse zeigten, dass die Inhibierung von SPPL2a/b zu einer verminderten IL12-Produktion in dendritischen Zellen führte. Dies war nicht der Fall, wenn die Zellen zuvor mit der TNF α -ICD transfiziert wurden (Friedmann *et al.* 2006).

Der ebenfalls zur Tumor Nekrose Faktor Familie gehörende Fas Ligand (FasL, CD95L) hat aufgrund seiner Apoptose induzierenden Wirkung, durch die Bindung an seinen Rezeptor auf einer Zielzelle, eine wichtige Funktion für die Homöostase des Immunsystems. Hier reguliert er Prozesse wie die Hemmung der Immunantwort von T-Zellen zur Vermeidung von Autoimmunerkrankungen, ist verantwortlich für die Wirkungsweise zytotoxischer T-Zellen und

die Existenz immunprivilegierter Organe (Waring & Mullbacher 1999). Während der Fas Rezeptor von vielen Zellen konstitutiv exprimiert wird, unterliegt die Expression seines Liganden einer strengen sowohl transkriptionalen als auch posttranslationalen Kontrolle (Kavurma & Khachigian 2003; Nagata & Golstein 1995). Über seine extrazelluläre Domäne interagiert der als Trimer vorliegende FasL mit seinem Rezeptor und induziert dadurch in der Zielzelle die Formierung eines sogenannten *Death inducing signaling complex* (DISC), was schließlich zur Apoptose führt (Chang *et al.* 2003; Peter & Krammer 2003).

Es wurde gezeigt, dass die extrazelluläre Domäne des FasL durch ADAM10 geschnitten und als löslicher FasL (sFasL) in den Extrazellulärraum freigesetzt werden kann (Schulte *et al.* 2007). Die physiologische Relevanz dieser Proteolyse ist noch nicht vollständig geklärt. So wurde zwar nachgewiesen, dass sFasL ebenfalls an seinen Rezeptor binden kann, jedoch nicht die gleiche Apoptose-induzierende Wirkung wie der membrangebundene FasL (mFasL) zeigt (Holler *et al.* 2003; O' Reilly *et al.* 2009; Schneider *et al.* 1998). *Shedding* des mFasL könnte somit einen Mechanismus darstellen, um dessen zytotoxische Kapazität zu regulieren. Zudem werden weitere Apoptose-unabhängige Funktionen des FasL diskutiert bei denen der sFasL eine entscheidende Bedeutung haben könnte (Hohlbaum *et al.* 2000; O' Reilly *et al.* 2009; Peter *et al.* 2007).

Das nach dem *Shedding* in der Membran verbleibende N-terminale Fragment des FasL kann durch SPPL2a weiter prozessiert werden, wodurch es zur Generierung einer intrazellulären Domäne kommt. Es wurde nachgewiesen, dass dieses Fragment in den Zellkern gelangt und dort möglicherweise einen Einfluss auf die Genexpression ausübt (Kirkin *et al.* 2007). Um diese Funktion der FasL-ICD näher zu analysieren, wurden transgene Mäuse generiert, in denen der Wildtyp-FasL gegen einen FasL ohne ICD ersetzt wurde. Der Vergleich dieser Mäuse mit den Wildtyp-Tieren zeigte, dass Signale durch die FasL-ICD zu einer verminderten Proliferation aktivierter B- und T-Zellen aufgrund verminderter Phosphorylierung der Phospholipase C, der Protein-Kinase C und ERK 1/2 führten. Zudem interagierte die FasL-ICD mit dem Transkriptionsfaktor *Lymphoid-enhancer binding factor-1* (Lef-1) und zeigte einen inhibierenden Effekt auf die Transkription dessen Zielgene (Luckerath *et al.* 2011).

Das Typ II Transmembranprotein Bri2 (Itm2b) zeigt eine starke Expression im zentralen Nervensystem. Während dessen physiologische Funktion bisher ungeklärt ist, sind Mutationen des entsprechenden Gens mit der familiären Dänischen beziehungsweise Britischen Demenzerkrankung assoziiert. Dabei handelt es sich um autosomal dominante neurodegenerative Erkrankungen, welche ähnlich wie die Alzheimererkrankung zur Bildung amyloider Plaques

und fibrillärer Ablagerungen führen (Kim *et al.* 1999; Plant *et al.* 1990; Vidal *et al.* 1999; Vidal *et al.* 2000).

Nach einem ersten proteolytischen Schnitt durch Furin wird ein weiterer Teil der Ektodomäne, die sogenannte BRICHOS Domäne durch ADAM10 in den extrazellulären Raum freigesetzt. Das in der Membran verbleibende N-terminale Fragment wird anschließend entweder durch SPPL2a oder SPPL2b geschnitten, wodurch die Bri2 intrazelluläre Domäne ins Zytoplasma und ein C-terminales Fragment in den Extrazellularraum entlassen werden (Martin *et al.* 2008). Ein einzelner Glycinrest in der Transmembrandomäne von Bri2 wirkt hierbei destabilisierend auf die α -helikale Struktur und ist daher für die Proteolyse notwendig (Fluhrer *et al.* 2012). Ob es sich bei diesem Vorgang lediglich um einen Abbauprozess handelt, um die Membran von den verbleibenden Fragmenten zu befreien oder ob es eine weitere Signalfunktion der freigesetzten Bri2 ICD gibt, ist noch ungeklärt (Martin *et al.* 2008).

In Übereinstimmung mit der vermuteten Substratspezifität für SPPLs sind alle bisher identifizierten Substrate Typ II Transmembranproteine. Dem Intramembranschnitt der Substrate von SPPL2a und SPPL2b geht zudem die Proteolyse durch eine andere Protease nahe der Zelloberfläche voraus. Aufgrund einiger Substratübereinstimmungen (Bri2b, TNF α) beider Proteasen stellt sich die Frage, ob SPPL2a und SPPL2b eine funktionelle Redundanz zeigen oder unterschiedliche Aufgaben erfüllen. *Microarray*-Analysen der humanen SPPL2a- und SPPL2b-Expression zeigten deutliche Unterschiede in verschiedenen Geweben. Während SPPL2a in allen untersuchten adulten Geweben zu finden war, scheint SPPL2b spezifischer exprimiert zu sein und konnte vor allem in der Nebennierenrinde und den Brustdrüsen detektiert werden (Friedmann *et al.* 2004). Dieser Unterschied in der Expression könnte ein Hinweis auf individuelle Funktionen der beiden Enzyme sein. Eine genauere funktionelle Untersuchung von SPPL2a und SPPL2b *in vivo* steht jedoch noch aus.

1.2 Die humorale Immunantwort

1.2.1 Allgemeine Grundlagen der Immunität

Lebewesen haben vielfältige Schutzmechanismen entwickelt, um sich gegen Angriffe durch verschiedene Pathogene zu schützen. Bereits die einfachsten Organismen verfügen über ein natürliches (angeborenes) Immunsystem von unterschiedlicher Komplexität. Bei Vertebraten besteht das angeborene Immunsystem einerseits aus einer Vielzahl von Plasmaproteinen, dem sogenannten Komplementsystem und andererseits aus zellulären Bestandteilen wie Monozyten beziehungsweise Makrophagen, Granulozyten, dendritischen Zellen und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Das natürliche Immunsystem ist für eine schnelle Infektabwehr zuständig. Es erkennt ein breites Spektrum an Krankheitserregern über generelle Muster, die sogenannten *Pathogen-associated molecular patterns (PAMP)*, zeigt jedoch keine Spezifität für bestimmte Erreger und kein immunologisches Gedächtnis (Aderem & Ulevitch 2000; Akira *et al.* 2006; Janeway *et al.* 2008; Liaskou *et al.* 2012).

Zusätzlich hierzu verfügen Vertebraten jedoch über einen weiteren Abwehrmechanismus, der in Kraft tritt, wenn es durch die angeborene Immunität nicht gelingt, den Erreger zu vernichten. Diese sogenannte adaptive Immunantwort erfolgt nach 4-5 Tagen, ist hochspezifisch gegen ein bestimmtes Pathogen gerichtet und führt zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, wodurch ein Schutz vor einer Zweitinfektion mit dem gleichen Erreger gewährleistet ist. Die Effektorzellen des adaptiven (erworbenen) Immunsystems sind die B- und T-Lymphozyten, die körperfremde (antigene) Moleküle hochspezifisch über ihren B-Zell-Rezeptor (*B cell receptor*, BCR) beziehungsweise T-Zell-Rezeptor (*T cell receptor*, TCR) erkennen und binden. Während die Funktionen von T-Zellen die Aktivierung von B-Lymphozyten sowie die zytotoxische Wirkung auf infizierte Zellen und Tumorzellen beinhalten, vermitteln B-Lymphozyten durch die Sekretion hochaffiner Antikörper die humorale Immunität. Diese Antikörper können einen Erreger neutralisieren oder opsonisieren, das Komplementsystem oder NK-Zellen aktivieren oder zur Agglutination des Pathogens führen. Die sezernierten Antikörper zeigen dabei die gleiche Spezifität wie der membrangebundene BCR. Die große Anzahl von B-Zellen im Organismus, die sich jeweils durch die Spezifität ihres BCRs unterscheiden, ermöglicht die Abwehr einer Vielzahl verschiedener Pathogene (Janeway *et al.* 2008).

1.2.2 Die Strukturen von B-Zell-Rezeptor und Antikörpern

Antikörper, auch als Immunglobuline (Ig, γ -Globuline) bezeichnet, stellen die sezernierte Form des B-Zell-Rezeptors dar und bestehen aus jeweils zwei schweren (50 kDa) und zwei leichten (25 kDa) Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Jede Kette weist Wiederholungen ähnlicher Sequenzen von etwa 110 Aminosäuren auf, die sich zu kompakt gefalteten Bereichen in der Proteinstruktur anordnen, den sogenannten Immunglobulindomänen. Während die leichten Ketten aus zwei dieser Domänen bestehen, werden die schweren Ketten aus vier bis fünf dieser Immunglobulindomänen gebildet. Röntgenstrukturanalysen zeigten eine Y-förmige Quartärstruktur von Antikörpermolekülen. Dabei besteht jeder Arm dieser Struktur aus einer leichten und den zwei N-terminalen Domänen einer schweren Kette. Beide Arme eines Antikörpers sind identisch und dienen der Antigenbindung. Sie werden daher auch als *Fragments antigen binding* (Fab-Fragmente) bezeichnet. Der übrige Teil des Antikörpers wird als *Fragment crystallizable* (Fc-Fragment) benannt, und ermöglicht die Interaktion mit Effektorzellen und -molekülen. Fab-Fragmente und Fc-Fragment sind durch eine Gelenkregion miteinander verbunden, die der Struktur Beweglichkeit für die Antigenbindung verleiht (Abb.1.5), (Davies & Chacko 1993; Janeway *et al.* 2008; Ramsland & Farrugia 2002).

Die Erkennung vieler verschiedener Antigene wird durch die hohe Sequenzvariabilität der jeweils letzten aminoterminalen Domäne der vier Ketten ermöglicht. Dabei bilden die variablen Domänen von je einer schweren und einer leichten Kette eine Antigenbindungsstelle, sodass ein Immunglobulin zwei identische Bindungsstellen aufweist. Neben diesen variablen Domänen bestehen leichte Ketten aus einer und schwere Ketten aus drei beziehungsweise vier weiteren konstanten Domänen (Abb.1.5). Es gibt fünf verschiedene konstante Regionen der schweren Kette ($C\mu$, $C\delta$, $C\gamma$, $C\alpha$, $C\epsilon$) aus denen die fünf verschiedenen Hauptisotypen von Antikörpern, IgM, IgD, IgG, IgA und IgE hervorgehen, die sich in Vorkommen und Effektorfunktion unterscheiden (Davies & Chacko 1993). Der BCR ist mit seiner konstanten Region in der Membran verankert und verfügt daher über keine vergleichbaren Effektorfunktionen wie die löslichen Antikörper (Early *et al.* 1980).

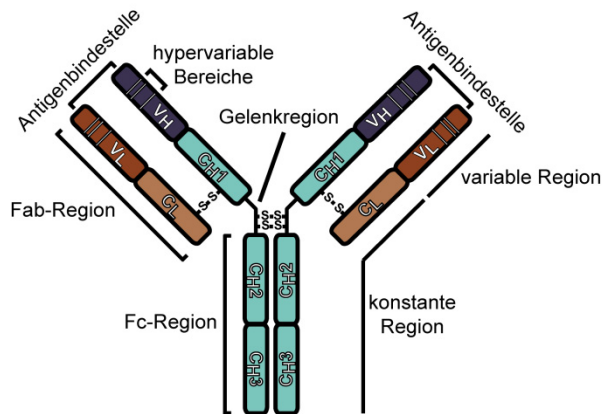


Abb. 1.5: Schematische Darstellung von IgG. Der Antikörper besteht aus jeweils zwei identischen schweren (H) und leichten (L) Ketten, die über Disulfidbrücken (-S-S-) miteinander verbunden sind. Die schweren Ketten bestehen aus je drei konstanten (C) und einer variablen (V), die leichte Kette aus je einer konstanten und einer variablen Immunglobulindomäne. Die variablen Domänen beider Ketten weisen hypervariable Bereiche auf. Die zwei identischen Antigenbindungsstellen setzen sich zusammen aus den variablen Domänen der leichten und der schweren Ketten. Die beiden *Fragment antigen binding-* (Fab-) Regionen und der *Fragment crystallizable-* (Fc-) Teil sind über eine Gelenkregion miteinander verbunden.

1.2.3 Entwicklung von B-Lymphozyten

1.2.3.1 Die Entstehung der Antikörpervielfalt (V(D)J-Verknüpfung)

Der unerschöpflichen Pathogen-Diversität muss der Organismus eine Vielzahl von Antikörperspezifitäten entgegensetzen. Es ist jedoch unmöglich, dass jeder Antikörper durch jeweils ein vollständiges Gen kodiert wird. Die Ketten der Immunglobuline werden daher aus verschiedenen Gensegmenten zusammengesetzt, die geclustert in genetischen Loci vorliegen. Es gibt einen Locus für die schwere Kette und zwei für die leichte Kette (κ - und λ -Kette), die auf verschiedenen Chromosomen liegen. Für die Bildung der leichten Kette werden ein *Variable-* (V-), ein *Joining-* (J-) und ein *Constant-* (C-) Segment verknüpft, während für die schwere Kette ein V-, ein *Diversity-* (D-), ein J- und ein C-Segment benötigt werden. V- und J-, beziehungsweise V-, D- und J-Segmente bilden die variable Region des Antikörpers wohingegen das C-Segment den konstanten Bereich kodiert (Honjo 1983).

Von den verschiedenen Segmenten existieren jeweils mehreren Varianten, die beliebig miteinander kombiniert werden können. Diese Synthese findet einmal pro Zelle während der B-Zell-Entwicklung durch den V(D)J-Rekombinasekomplex statt und wird als somatische Rekombination bezeichnet. Die Verknüpfung der Segmente ist dabei ungenau. Das heißt ihre exakte Position variiert um einige Nukleotide und an der Verbindungsstelle werden Nukleotide eingefügt oder entfernt. Weiterhin können leichte und schwere Ketten in allen Kombinationen gebildet werden. Da die Antigenbindungsstelle durch beide Ketten generiert wird, ergibt sich hieraus eine weitere Diversifizierung (Fanning *et al.* 1996; Honjo 1983).

Nach der Aktivierung reifer B-Zellen werden zudem weitere Punktmutationen in die variablen Regionen eingeführt. Dieser Prozess wird als somatische Hypermutation bezeichnet und führt im Idealfall zur Verstärkung der Affinität zum Antigen (Teng & Papavasiliou 2007).

Während ihrer Entwicklung exprimieren B-Zellen zunächst schwere Ketten der Isotypen μ und δ , welche je nach Entwicklung der Zelle aus einer unterschiedlichen Prozessierung des gleichen mRNA-Transkriptes hervorgehen, und produzieren somit die Immunglobuline IgM und IgD (Geisberger *et al.* 2006). Erst durch die Aktivierung einer B-Zelle kommt es in Abhängigkeit von weiteren Zytokinen und T-Helferzellen zur Aktivierung von Schalterfaktoren. Diese binden an Schalterregionen, die sich vor jedem Isotyp-spezifischen Gensegment befinden und ermöglichen durch die Rekombination verschiedener Schalterregionen und die Entfernung dazwischen liegender Gensegmente einen Klassenwechsel. Sind nach dieser Rekombination weitere C-Segmente vorhanden, ist auch ein weiterer Isotypwechsel möglich. Die so entstandenen verschiedenen Isotypen haben alle die gleiche Antigenspezifität, da sie gleiche VDJ-Segmente besitzen, unterscheiden sich jedoch in ihrer Effektorfunktion (Chaudhuri & Alt 2004).

Der membrangebundene BCR und die sezernierten Antikörper unterscheiden sich allein in ihrem Carboxyterminus. Hier enthält der BCR zusätzlich eine hydrophobe Transmembrandomäne, die eine Verankerung in der Membran ermöglicht. Die beiden unterschiedlichen Formen werden durch alternative RNA-Prozessierung gebildet. Zunächst wird dabei nur die membrangebundene Form gebildet. Erst nach Aktivierung der B-Zelle durch Antigenstimulation kommt es zur Sezernierung von löslichen Antikörpern (Early *et al.* 1980; Peterson *et al.* 1991; Rogers *et al.* 1980).

1.2.3.2 Die Entwicklung muriner B-Zellen im Knochenmark

Ursprünglich leitet sich die Bezeichnung „B-Zelle“ von ihrem Bildungsort bei Vögeln, der *Bursa Fabricii* ab. Häufig wird das „B“ jedoch auch als Abkürzung für *Bone marrow* (Knochenmark), dem Ort ihrer Entstehung in Menschen, Mäusen und einigen anderen Säugetieren, angesehen. In diesem primären lymphatischen Organ differenzieren pluripotente hämatopoietische Stammzellen, aus denen alle Blutzellen hervorgehen, über verschiedene Stadien bis zu unreifen B-Zellen, die das Knochenmark über den Blutstrom verlassen, um in der Milz zu reifen (Loder *et al.* 1999; Weill *et al.* 2004). Dieser Prozess läuft bei Menschen und Mäusen ähnlich ab und ist im Folgenden für die Maus beschrieben.

Das wichtigste Ziel während der B-Zell-Differenzierung ist es, einen BCR zu generieren, der trotz der Willkür der V(D)J-Verknüpfung funktional, jedoch nicht autoreaktiv ist. Aus diesem Grund werden Expression und Funktion des Rezeptors bei jedem Entwicklungsschritt streng kontrolliert (Hardy & Hayakawa 2001).

Hämatopoietische Stammzellen differenzieren zunächst zu multipotenten Vorläuferzellen, die nach wie vor alle Blutzellen bilden, sich jedoch nicht mehr selbst erneuern können. Über die Stadien der frühen lymphatischen Vorläuferzelle und der gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle entwickelt sich, in Abhängigkeit von der Interaktion mit den Stromazellen und dem Zytokin Interleukin-7, die Pro-B-Zelle als erste Zelle der B-Linie (Hardy *et al.* 2007). Diese Entwicklung geht mit dem Verlust von CD117 (ckit) einher, einem Zytokinrezeptor, der für Überleben, Proliferation und Differenzierung vor allem von hämatopoietischen Stammzellen essentiell ist. Zudem bewirkt in diesem Stadium die Expression B-Zell-Linien-spezifischer Transkriptionsfaktoren wie E2A, PU.1, *Early B cell factor* (EBF), die Transkription der terminalen Desoxynukleotidyltransferase (TdT) sowie der *Recombination activating genes* (Rags, Rag-1 und Rag-2), die einen essentiellen Bestandteil des V(D)J-Rekombinasekomplexes darstellen. Infolgedessen kommt es zur Umlagerung der Gensegmente für die schwere Kette auf einem Chromosom. Im Falle einer erfolgreichen Expression der schweren Kette bildet diese zusammen mit den Proteinen VpreB und $\lambda 5$, welche aufgrund ihrer ähnlichen Struktur die leichte Kette ersetzen, den Prä-B-Zell-Rezeptor. Des Weiteren wird CD19, ein Teil des CD19-CD21-CD81 B-Zell-Korezeptorkomplexes, auf der Oberfläche exprimiert, sowie B220, eine Isoform der Protein-Tyrosinphosphatase CD45 (Abb.1.6), (Hardy *et al.* 2007; Hardy & Hayakawa 2001).

Zellen mit funktionalem Prä-B-Zell-Rezeptor können ihre Entwicklung fortsetzen. Die Verknüpfung der schweren Kette wird in diesem Stadium, der sogenannten großen Prä-B-Zelle, gestoppt, so dass keine weitere Umlagerung auf dem zweiten Chromosom stattfinden kann (Allelausschluss), und es beginnt eine kurze Phase der Proliferation. Hierdurch entstehen mehrere kleine Prä-B-Zellen, in denen jeweils individuell die Umlagerung der Gensegmente für die leichte Kette stattfindet. Dabei erfolgt meist zunächst die Umlagerung der Gensegmente für die κ -Kette, ebenfalls nach dem Allelausschlussprinzip. War diese nicht produktiv, kommt es zur VJ-Verknüpfung des $Ig\lambda$ Locus. Zellen in denen auch die Umlagerung der leichten Kette erfolgreich verlief, exprimieren den BCR IgM auf ihrer Oberfläche und werden als unreife oder transitionale B-Zellen bezeichnet (Abb. 1.6), (Janeway *et al.* 2008; Luning Prak *et al.* 2011; Melamed *et al.* 1998; Weaver *et al.* 1985). Zu diesem Zeitpunkt erfolgt die erste Prüfung auf Autotoleranz der B-Zelle (zentrale Toleranz). Der BCR bildet in Assoziation mit

einem Heterodimer aus $Ig\alpha$ und $Ig\beta$, welches für die Signaltransduktion entscheidend ist, den B-Zell-Rezeptorkomplex. Wird ein körpereigenes Antigen durch den Rezeptor erkannt, ist dieser also autoreaktiv, muss die weitere Reifung verhindert werden. In Abhängigkeit von dem gebundenen Antigen kommt es folglich zur Apoptose, Anergie (Reaktionsverlust, häufig bei löslichen Autoantigenen) oder der Generierung eines neuen Rezeptors (*Rezeptor-Editing*). Erfolgt die Bindung eines Autoantigens von geringer Affinität oder Häufigkeit, kann die B-Zelle zudem mit immunologischer Ignoranz reagieren. Diese Zelle kann demnach in der Peripherie ihre Reifung uneingeschränkt fortsetzen, hat jedoch ein erhöhtes autoreaktives Potential (Hardy & Hayakawa 2001; Janeway *et al.* 2008; Tiegs *et al.* 1993).

Während ihrer Differenzierung stehen die heranreifenden B-Zellen im ständigen Kontakt zu den umgebenden Stromazellen, von denen sie entscheidende Signale für ihre Entwicklung empfangen. Mit zunehmender Differenzierung erfolgt eine Wanderung innerhalb des Knochenmarks vom Endosteum (innere Knochenoberfläche) zum Zentralsinus der Knochenmarkhöhle. Dabei verlieren sie zunehmend den Kontakt zu den benachbarten Stromazellen, was ihnen schließlich erlaubt, über die Sinusoide in den Zentralsinus und über den Blutstrom in die Milz zu gelangen, wo die weitere Reifung erfolgt (Janeway *et al.* 2008).

Durch die differenzielle Expression der verschiedenen Oberflächenmarker (*Cluster of differentiation-* (CD-) Marker) ist eine sehr gute Auftrennung und Untersuchung der verschiedenen Entwicklungsstadien möglich (Abb. 1.6), (Hardy *et al.* 2007).

		HPZ	MLP/ ELP	CLP	ProB	PreB groß	PreB klein	unreife B-Zelle	Reife B-Zelle
Zelloberfläche	CD45R								
	CD24								
	CD117								
	CD19								
intrazellulär	$\lambda 5$ u. $VpreB$								
	Rag1 u. Rag2								
	TdT								
	schwere Kette (μ)								
	leichte Kette								

Abb. 1.6: Expression von Zelloberflächenmarkern und intrazellulären Proteinen während der murinen B-Zell-Entwicklung. Die Stärke der blauen Linien spiegelt die Expressionsstärke wider. HPZ = hämatopoietische Stammzelle, MLP = multipotente Vorläuferzelle (*Multilineage progenitor*), ELP = frühe lymphatische Vorläuferzelle (*Early lymphoid progenitor*), CLP = gemeinsame lymphatische Vorläuferzelle (*Common lymphoid progenitor*); modifiziert aus (Hardy *et al.* 2007).

1.2.3.3 Die Reifung muriner B-Zellen in der Milz

Die Reifung der im Knochenmark differenzierten transitionalen B-Zellen erfolgt in der Milz. Diese kann in die funktional verschiedenen Gewebe der roten und der weißen Pulpa unterteilt werden. Während in der roten Pulpa vor allem der Abbau geschädigter oder alternder Erythrozyten erfolgt, stellt die weiße Pulpa den lymphoiden Teil des Organs dar. Um die Zentralarterie herum befindet sich die sogenannte periarterielle Lymphe (PALS), die überwiegend aus T-Lymphozyten besteht. Die Lymphfollikel, die den größten Teil der weißen Pulpa darstellen, grenzen direkt an die PALS-Region und enthalten vor allem B-Zellen, sowie follikuläre dendritische Zellen, welche die Follikelstruktur organisieren und für die Aktivierung von B-Zellen eine wichtige Rolle spielen. Die Marginalzone umrahmt die Follikel und enthält primär B-Zellen, jedoch in geringerer Zahl auch T-Zellen (Lüllmann-Rauch 2009).

Von den etwa 2×10^7 unreifen B-Zellen, die täglich im Knochenmark entstehen, erreichen etwa 10 % die Milz und nur 1-3 % reifen zu muren B-Zellen (Loder *et al.* 1999). Die Reifung der B-Zellen erfolgt dabei über drei Stadien. Unreife B-Zellen gelangen mit dem Blutstrom in die Milz und werden durch Chemokine zunächst in die äußeren Regionen der PALS geleitet. In diesem Stadium werden sie auch als Transitional 1 (T1) B-Zellen bezeichnet und können nur wenige Tage in der Peripherie überleben. Während ihrer Reifung über das Stadium der Transitional 2 (T2) B-Zellen wandern sie in die Follikel und werden schließlich zu langlebigen (15-20 Wochen), muren B-Zellen, die in Blut und Lymphe zirkulieren und in die weiteren sekundären lymphatischen Organe einwandern können (Su & Rawlings 2002).

Für die weitere Reifung der T1 B-Zellen sind vor allem zwei Signale von entscheidender Bedeutung. Während eines direkt vom BCR ausgeht, wird das andere durch das Zytokin *B cell activating factor* (BAFF) vor allem über die Bindung an einen seiner drei Rezeptoren, den BAFF Rezeptor (BAFF-R), übermittelt (Khan 2009).

Bereits während ihrer Entwicklung im Knochenmark wurden die B-Zellen auf ihre zentrale Toleranz geprüft, um Autoreaktivität zu vermeiden (1.2.3.2). Viele potenzielle Autoantigene gelangen jedoch nicht in das Knochenmark und sind nur in der Peripherie vorhanden. Daher erfolgt während der B-Zell-Reifung in der Milz eine zusätzliche Prüfung auf die periphere Toleranz. B-Zellen können zwischen körpereigenen und Fremdanigenen anhand der Tatsache unterscheiden, dass körperfremde Antigene zunächst zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems führen. Es kommt dadurch zur Ausschüttung entzündungsspezifischer Zytokine, die der B-Zelle signalisieren, dass eine Infektion vorliegt. Fehlen diese Signale, ist das erkannte Epitop ein potenzielles Autoantigen. Wie schon während der Entwicklung im

Knochenmark hat die Zelle, in Abhängigkeit vom Liganden, verschiedene Möglichkeiten, zu reagieren. Stark quervernetzende Antigene führen zur Apoptose, lösliche Antigene bewirken häufig Anergie. Auch immunologische Ignoranz bei Kontakt mit sehr seltenen oder schwer zugänglichen Antigenen ist möglich. Eine Erneuerung des Rezeptors kann in diesem Entwicklungsstadium jedoch nicht mehr stattfinden, da die V(D)J-Verknüpfung bereits vollständig abgeschlossen ist (Janeway *et al.* 2008).

Darüber hinaus wird aber auch ein tonisches Signal des B-Zell-Rezeptors benötigt, um die Reifung der Zellen zu ermöglichen. Analysen von Mäusen mit Gendefekten, welche die BCR-Signalübertragung inhibieren, haben gezeigt, dass ein vollständiges Fehlen von BCR-Signalen zum Maturierungsabbruch und Sterben der B-Zellen führt (Stadanlick *et al.* 2008).

Eine vergleichbar entscheidende Wirkung geht von dem zur TNF-Familie gehörenden Zytokin BAFF aus, welches durch die Bindung an den BAFF-R zur Aktivierung des alternativen NF- κ B-Signalwegs führt (MacKay & Schneider 2009).

Die Familie der NF- κ B Transkriptionsfaktoren besteht aus den fünf Proteinen RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p105/p50) und NF- κ B2 (p100/p52). Die verschiedenen Vertreter kommen als Homo- oder Heterodimere in unterschiedlichen Kombinationen vor und werden zunächst durch die Interaktion mit inhibitorischen NF- κ B-Proteinen (I κ B) im Zytoplasma festgehalten. Durch die Aktivierung des I κ B-Kinase-Komplexes (IKK), bestehend aus den Kinasen IKK α und IKK β und der nichtkatalytischen Untereinheit IKK γ /NEMO) erfolgt die Phosphorylierung der I κ B-Proteine und die daraus resultierende Ubiquitinylierung, welche die Proteine für den Abbau durch das Proteasom markiert. Die freigesetzten NF- κ B Transkriptionsfaktoren können dadurch in den Zellkern gelangen. Dieser Mechanismus wird auch als klassischer Weg der NF- κ B-Aktivierung bezeichnet. Die IKK α -Untereinheit des I κ B-Kinase-Komplexes scheint hierfür entbehrlich zu sein (Pomerantz & Baltimore 2002).

Die Aktivierung von NF- κ B1 und NF- κ B2 erfolgt hingegen über die Prozessierung der Vorläuferproteine p105 beziehungsweise p100. Durch die Entfernung des I κ B-ähnlichen C-Terminus werden diese Vorläufer in ihre jeweils aktive Form p50 beziehungsweise p52 überführt. Während die Prozessierung von p105 konstitutiv stattzufinden scheint, bezeichnet man die beispielsweise durch BAFF/BAFF-R-Signale induzierte Aktivierung von NF- κ B2 als den alternativen NF- κ B-Signalweg (Pomerantz & Baltimore 2002).

Die Bindung von BAFF an seinen Rezeptor führt über die Degradierung des TNF-Rezeptor-assoziierten Faktors 3 (TRAF3) zur Freisetzung der NF- κ B-induzierenden Kinase (NIK). NIK aktiviert IKK α , wodurch NF- κ B2-p100 phosphoryliert und zu p52 prozessiert wird. Das p52/RelB Heterodimer kann daraufhin in den Zellkern wandern und induziert hier beispiels-

weise die Transkription von Genen der *B-cell lymphoma 2-* (Bcl-2-) Familie, welche antiapoptotisch wirken. Die ausführliche Darstellung der BAFF/BAFF-R-induzierten NF- κ B-Aktivierung ist in Abbildung 1.7 gezeigt (MacKay & Schneider 2009). Es wurde beschrieben, dass Mäuse mit BAFF- oder BAFF-R-Defizienz eine Inhibierung der B-Zell-Reifung beim Übergang vom T1 in das T2 Stadium aufweisen (Schiemann *et al.* 2001).

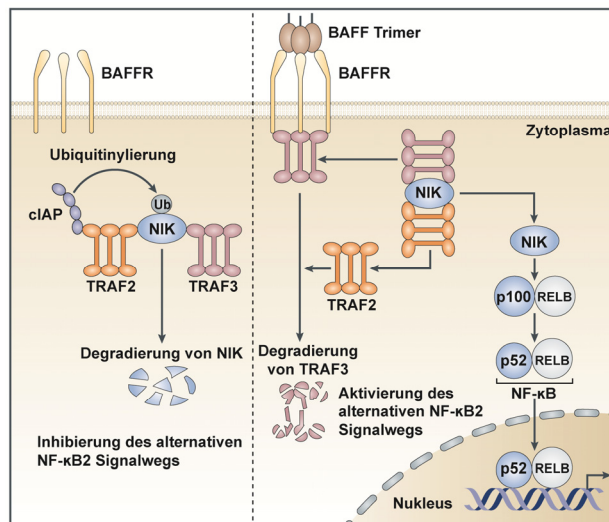


Abb. 1.7: Signale des BAFF-Rezeptors führen zur Aktivierung des alternativen NF- κ B-Signalwegs. Wenn kein BAFF an den BAFF-Rezeptor gebunden hat, liegen die TNF-Rezeptor-assoziierten Faktoren 2 und 3 (TRAF2 und 3) in einem Komplex mit der NF- κ B-induzierenden Kinase (NIK) vor. TRAF2 rekrutiert dabei den zellulären Apoptoseinhibitor (*Cellular inhibitor of apoptosis*, cIAP), der NIK der Ubiquitinvermittelten Degradierung zuführt. Durch die Bindung eines BAFF-Trimers an die BAFF-Rezeptoren interagieren diese mit TRAF3. Vermittelt durch TRAF2 erfolgt dann die Degradierung von TRAF3. Dadurch kommt es zur Freisetzung von NIK und der konsequenten Aktivierung des alternativen NF- κ B-Signalwegs. Ub, Ubiquitin, entnommen aus (MacKay & Schneider 2009).

Wie auch im Knochenmark geht die Maturierung in der Milz mit der Veränderung der Expression verschiedener Oberflächenmarker einher. So kommt es während der Reifung neben der Expression des BCRs IgM zur Generierung des zusätzlichen Isotyps IgD. Darüber hinaus können T1, T2 und mature B-Zellen anhand ihrer Expression von CD21 des B-Zell-Korezeptorkomplexes und dem Zelladhäsionsmolekül CD24 unterschieden werden (Su & Rawlings 2002).

1.2.4 B-Zell-Subtypen

Reife B-Lymphozyten, die noch nicht durch den Kontakt mit ihrem Antigen aktiviert wurden (naive B-Zellen) können in drei Subtypen unterteilt werden, folliculäre, Marginalzone und B1 B-Zellen (Allman & Pillai 2008). Folliculäre B-Zellen zirkulieren über Blut und Lymphe zwischen den lymphatischen Organen. Wie der Name erkennen lässt, besiedeln sie vor allem die Follikel in Milz, Lymphknoten und Peyer'schen Plaques. Hier erkennen sie primär Proteinantigene, die sie aktivierten T-Zellen präsentieren, wodurch ihre T-Zell-abhängige Aktivierung erfolgt (Allman & Pillai 2008).

In der Marginalzone (MZ) der Milz, welche die weiße Pulpa von der roten Pulpa trennt, findet sich eine weitere B-Zell-Population. Die sogenannten Marginalzonen B-Zellen sind unter anderem in Menschen und Mäusen mit vielen Übereinstimmungen in Eigenschaften und Funktionen beschrieben und sind im Folgenden für die Maus dargestellt (Pillai *et al.* 2005). Murine MZ-B-Zellen entwickeln sich vermutlich aus der gleichen transitionalen Entwicklungsstufe wie folliculäre B-Zellen aufgrund unterschiedlicher Intensität von BCR-Signalen und Beteiligung des Notch-Signalwegs (Cariappa *et al.* 2001; Pillai *et al.* 2005; Tanigaki *et al.* 2002). Sie unterscheiden sich von folliculären B-Zellen unter anderem durch ihre hohe Expression von IgM und CD21 und ihre geringe Menge an IgD und CD23 (Pillai *et al.* 2005). Zellen der Marginalzone stehen im direkten Kontakt mit dem Blutstrom und erfüllen somit eine ideale Voraussetzung, um auf Pathogene im Blut zu reagieren. Lange Zeit wurde ihre primäre Funktion darin gesehen, Polysaccharid-Antigene zu erkennen und zu binden, wodurch es zu einer T-Zell-unabhängigen Aktivierung kommt (Guinamard *et al.* 2000; Martin *et al.* 2001). Es wird jedoch vermutet, dass sie ebenso an einer T-Zell-abhängigen Immunantwort nach Erkennung von Protein- oder Lipidantigenen beteiligt sein können. Durch ihre Ähnlichkeiten zu aktivierten dendritischen Zellen, was sich beispielsweise an einer erhöhten Expression des MHC Klasse II Komplexes zeigt, haben MZ-B-Zellen sehr viel bessere Voraussetzungen, um gebundene Antigene den T-Helferzellen zu präsentieren als folliculäre B-Zellen (Allman & Pillai 2008; Attanavanich & Kearney 2004).

B1 B-Zellen wurden erstmals im Zusammenhang mit einer B-Zell-spezifischen chronisch lymphatischen Leukämie (B-CLL) aufgrund ihrer Expression des T-Zell-Oberflächenmarkers CD5 entdeckt (Kipps 1989). B-Zellen mit einem vergleichbaren Phänotyp konnten in geringer Menge in der gesunden murinen Milz und in großer Anzahl in Peritoneal- und Pleurahöhle detektiert werden (Hayakawa *et al.* 1983; Hayakawa *et al.* 1986; Montecino-Rodriguez & Dorshkind 2006). Murine B1 B-Zellen wurden ursprünglich durch ihre Expression von CD5 und CD43, eine hohe Expression von IgM und einer geringen Menge IgD, CD23 und B220 charakterisiert. Heute sind jedoch auch CD5-negative B1 B-Zellen bekannt, wodurch es zu einer weiteren Unterteilung in B1a (CD5-positiv) und B1b (CD5-negativ) B-Zellen kam (Duan & Morel 2006; Rothstein 2002). B1 B-Zellen stellen die B-Zell-Population dar, die während der Embryonalentwicklung in der fetalen Leber produziert wird. Nach der Geburt wird ihre Produktion durch die Entwicklung der folliculären und MZ-B-Zellen in Knochenmark und Milz abgelöst. Daher werden B1 B-Zellen auch als „fetale B-Zellen“ bezeichnet. Postnatal haben diese Zellen die Fähigkeit der Selbsterneuerung und tragen somit maßgeblich zum Fortbestehen dieser Population bei (Rothstein 2002). Es wird allerdings vermutet, dass

sie auch weiterhin aus spezifischen B1 Vorläuferzellen neu gebildet werden können (Ghosn *et al.* 2011). B1 B-Zellen sind in erster Linie für ihre schnelle, T-Zell-unabhängige Reaktion auf Polysaccharidantigene bekannt. B1a B-Zellen beispielsweise produzieren sogenannte natürliche Antikörper der Klasse IgM, welche polyreaktiv mit geringer Affinität sind, ohne vorherigen Kontakt zu einem Antigen sezerniert werden und einen schnellen Schutz vor Pathogenen bieten. Ihre Polyreaktivität stellt allerdings auch ein Risiko für Autoimmunerkrankungen dar. B1b B-Zellen hingegen vermitteln die T-Zell-unabhängige Produktion von Antikörpern nach Antigenerkennung. Sich wiederholende Polysaccharide, wie sie beispielsweise auf der Oberfläche von Bakterien vorkommen induzieren durch eine starke Quervernetzung der B-Zell-Rezeptoren die Aktivierung der Zelle (Montecino-Rodriguez & Dorshkind 2006). B1 B-Zellen stellen somit einen Übergang zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem dar.

1.2.5 Aktivierung von B-Zellen

In Abhängigkeit von der Antigenpezifität des BCRs werden zwei grundlegend verschiedene Arten der B-Zell-Aktivierung unterschieden. Die eine erfolgt in Abhängigkeit von kostimulierenden Signalen durch T-Helferzellen und wird als Thymus-abhängige (*Thymus dependent*, TD) Aktivierung bezeichnet. Die andere Form erfolgt Thymus-unabhängig (*Thymus independent*, TI) und ist entsprechend ohne T-Zell-Beteiligung möglich (Lesinski & Westerink 2001).

Für eine Aktivierung von B-Zellen in Abhängigkeit von T-Helferzellen sind zwei verschiedene Signale notwendig. Das erste Signal stammt direkt vom B-Zell-Rezeptor, nachdem dieser an ein Proteinantigen gebunden hat. Infolgedessen kommt es zur Phosphorylierung der Immunrezeptor Tyrosin-Aktivierungsmotive (ITAMs) der $I\alpha$ und $I\beta$ Kette des B-Zell-Rezeptorkomplexes und anschließenden Assemblierung eines Signalkomplexes. Dies induziert die Aktivierung der Phospholipase $C\gamma 2$ ($PLC\gamma 2$), welche Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat ($PtdIns(4,5)P_2$) zu Inositol-1,4,5-Trisphosphat ($InsP_3$) und Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert. Der detaillierte Ablauf der Aktivierung von $PLC\gamma 2$ ist in Abbildung 1.8 beschrieben (Scharenberg *et al.* 2007).

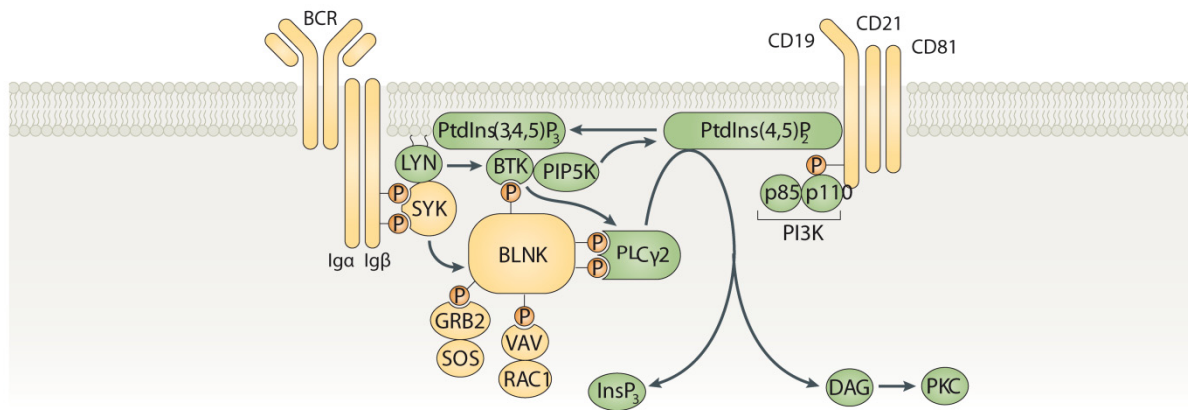


Abb 1.8: PLC γ 2-Aktivierung durch Signale des B-Zell-Rezeptors (*B cell receptor*, BCR). Durch die Bindung eines Antigens an den BCR kommt es zur Phosphorylierung der Immunrezeptor Tyrosin-Aktivierungsmotive (ITAMs) der Iga und Ig β Kette. Daraufhin erfolgen die Bindung und Aktivierung der Kinasen LYN aus der SRC-Familie und *Spleen tyrosine kinase* (SYK). Dies resultiert in der Rekrutierung weiterer Kinasen, Phosphatasen, G-Proteinen, Adaptormoleküle und Lipidhydrolasen. Durch die Phosphorylierung des zu diesem Komplex gehörenden Adaptormoleküls *B cell linker* (BLNK) kommt es zur Interaktion mit Phospholipase C γ 2 (PLC γ 2) und Bruton's Tyrosinkinase (BTK). Signale die beispielsweise vom CD19-CD21-CD81-B-Zell-Korezeptorkomplex ausgehen, aktivieren die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), welche Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PtdIns(3,4,5)P₃) phosphoryliert. PtdIns(3,4,5)P₃ rekrutiert BTK und induziert dessen Transphosphorylierung durch Lyn. Aktivierte BTK phosphoryliert anschließend PLC γ 2, welche PtdIns(4,5)P₂ zu Inositol-1,4,5-Trisphosphat (InsP₃) und Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert. Zudem interagiert BTK mit der Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-Kinase (PIP5K), wodurch es zur Bereitstellung von PtdIns(4,5)P₂ kommt. Hierdurch wird die ausreichende Verfügbarkeit von PtdIns(4,5)P₂ als Substrat von PI3K und PLC γ 2 erreicht. PKC, Proteinkinase C; entnommen aus (Scharenberg *et al.* 2007).

Der *Second messenger* InsP₃ bindet an Rezeptoren des ER, wodurch es zur Freisetzung von Kalzium aus dem ER kommt. Dies wiederum induziert einen nachfolgenden Einstrom von Kalzium über die Plasmamembran in die Zelle. Zytoplasmatisches Kalzium reguliert infolgedessen die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie *Nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) und NF- κ B und damit wichtige Prozesse wie Zytokinausschüttung, Zellüberleben und Proliferation. DAG aktiviert zudem die Proteinkinase C (PKC, Abb. 1.8), wodurch ebenfalls die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B induziert wird (Scharenberg *et al.* 2007).

Für die Bereitstellung des zweiten Signals einer TD-Aktivierung wird das Antigen nach Bindung an den BCR internalisiert und in Peptide zerlegt. Diese werden an MHCII-Moleküle gebunden und gelangen in diesem Komplex zurück an die Oberfläche, wo sie den T-Helferzellen präsentiert werden (Parker 1993). Wird das gebundene Peptid von einer aktivierten T-Zelle erkannt, kommt es zu Wechselwirkungen zwischen B- und T-Zelle, die zur weiteren Aktivierung der B-Zelle führen. Beide Zellen proliferieren infolgedessen stark und bilden einen sogenannten Primärfokus, in dem B-Zellen zu Antikörper sezernierenden Plasmablasten und schließlich Plasmazellen differenzieren (Janeway *et al.* 2008). Entscheidend hie-

ran beteiligt sind die Interaktion des CD40-Liganden auf T-Helferzellen mit seinem zur TNF-Rezeptor-Familie gehörende CD40-Rezeptor auf B-Zellen sowie weitere Zytokine, welche von der T-Zelle aber auch anderen Immunzellen sezerniert werden. Während dieser Differenzierung kann unter dem Einfluss der Zytokine ein Isotypwechsel und somit eine Veränderung der Effektorfunktion erfolgen (Parker 1993). Einige der aktivierten B-Zellen wandern jedoch auch in die primären Lymphfollikel ein und bilden dort Keimzentren. Hier kann die Einfügung von Punktmutationen in die variablen Regionen der Immunglobulingene, ein Prozess der als somatische Hypermutation bezeichnet wird, zu einer Verbesserung oder einer Verschlechterung der Antigenaffinität führen. Während die Verschlechterung der Affinität die Apoptose der B-Zelle induziert, führt eine Verbesserung zu einer positiven Selektion, der sogenannten Affinitätsreifung. Die positiv selektionierten B-Zellen differenzieren infolgedessen entweder zu Plasmazellen oder zu Gedächtniszellen, welche einen langfristigen Schutz vor einer erneuten Infektion mit dem gleichen Erreger gewährleisten (MacLennan 1994).

Einige Antigene wie beispielsweise bakterielle Polysaccharide, Lipopolysaccharide und polymere Proteine sind in der Lage, B-Zellen ohne die Kostimulation von T-Helferzellen zu aktivieren. Diese TI-Antigene können in Abhängigkeit von dem Mechanismus ihrer Aktivierung in zwei Gruppen unterteilt werden. TI-1-Antigene wirken in hohen Konzentrationen sowohl auf reife als auch auf unreife B-Lymphozyten. Sie stimulieren die B-Zellen unabhängig von deren Antigenpezifität und induzieren somit eine polyklonale Aktivierung. Das bekannteste Beispiel für ein TI-1-Antigen ist LPS, welches im Komplex mit dem LPS bindenden Protein (LBP) und CD14 an den *Toll-like*-Rezeptor 4 (TLR 4) auf B-Zellen bindet. Ein Isotypwechsel, Affinitätsreifung und auch die Bildung von B-Gedächtniszellen bleiben bei dieser Form der Aktivierung aus (Lesinski & Westerink 2001).

Stark repetitive Strukturen wie polymere Proteine oder Zellwandpolysaccharide von Bakterien bilden die Gruppe der TI-2-Antigene. Durch die Bindung der B-Zell-Rezeptoren an die in hoher Anzahl vorliegenden gleichen Antigene kommt es zur starken Quervernetzung der Rezeptoren auf reifen B-Zellen, wodurch es zu einer starken Proliferation der Zellen kommt. Für die Induktion der Antikörpersekretion ist jedoch ein weiteres Signal nötig. Dieses wird zum Beispiel durch die direkte Bindung von *Toll-like*-Rezeptoren auf den B-Zellen an PAMPs des jeweiligen Pathogens vermittelt. Durch die Wirkung weiterer Immunzellen und Zytokine ist zudem ein Isotypwechsel begrenzt möglich (Vos *et al.* 2000). Für die Bindung von TI-2-Antigenen sind vor allem B1 B-Zellen und die B-Zellen der Marginalzone bekannt (Martin *et al.* 2001).

1.3 MHC Klasse II Moleküle und ihr Chaperon CD74 (invariante Kette)

1.3.1 Antigenpräsentation durch MHCII

Die MHC-Moleküle der Klasse I und II binden Peptide und präsentieren diese CD8- beziehungsweise CD4-positiven T-Zellen. Die Peptide zur Beladung der MHC Klasse I Moleküle sind dabei zytosolischen Ursprungs und werden durch das Proteasom generiert. Die Erkennung des MHCI-Peptid-Komplexes an der Zelloberfläche erfolgt durch CD8 positive Zellen. Im Gegensatz hierzu binden MHC Klasse II Moleküle Proteinfragmente extrazellulären Ursprungs die in spezialisierten Endosomen, den sogenannten MHC Klasse II Kompartimenten (*MHCII compartment*, MIIC) entstehen und anschließend CD4 positiven T-Zellen präsentiert werden. Während MHCI von den meisten Zellen des Körpers exprimiert wird, ist die Expression von MHCII mit wenigen Ausnahmen spezifisch für Antigenpräsentierende Zellen (APCs) zu denen dendritische Zellen, Makrophagen und, wie bereits erwähnt, B-Zellen gehören (Neeffjes *et al.* 2011).

Im Menschen existieren drei (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP), in der Maus zwei (I-A, I-E) sehr polymorphe Gene für MHCII, die jeweils ein anderes Peptidspektrum binden. Diese liegen zusammen auf einem Locus mit den Genen für MHCI und vielen weiteren Faktoren, die für die Funktion des Komplexes sowie des Immunsystems im Allgemeinen wichtige Bedeutungen haben. Die Regulation der Expression von MHCII unterliegt dabei primär dem MHC Klasse II Transaktivator (CIITA), (Janeway *et al.* 2008; Neeffjes *et al.* 2011).

MHCII-Moleküle sind Heterodimere aus den zwei integralen Membranglykoproteinen α (35 kDa) und β (28 kDa). Die extrazytoplasmatischen Regionen beider Untereinheiten können in jeweils zwei Domänen unterteilt werden. Die zur Membran proximal gelegenen Domänen ($\alpha 2$ und $\beta 2$) ähneln strukturell der konstanten Region von Immunglobulinen, während die distalen Domänen ($\alpha 1$ und $\beta 1$) gemeinsam die Peptidbinderegion bilden (Cresswell 1994; Landsverk *et al.* 2009). Die MHCII-Synthese und -Assemblierung beginnt im Endoplasmatischen Retikulum unter Mithilfe des Typ II Transmembranproteins invariante Kette (CD74, Ii), welches als Chaperon fungiert. CD74 lagert sich im ER zu einem Trimer zusammen. Die Trimerisierungsdomänen liegen hierbei sowohl in der Transmembranregion als auch in der luminalen Domäne. Da jedes CD74-Molekül je eine α - und eine β -Kette von MHCII bindet, entsteht ein nonamerischer Komplex. Die Bindung an MHCII erfolgt dabei primär durch das sogenannte *Class II-associated li chain peptide-* (CLIP-) Fragment an die Peptidbinderegion. Hierdurch wird zudem die Bindung anderer Peptide im ER an MHCII unterbunden. Der

CD74-MHCII Komplex wird zum MHC Klasse II Kompartiment transportiert (Landsverk *et al.* 2009). Hierfür enthält der zytoplasmatische Teil von CD74 zwei Leuzin-Sortierungsmotive. Während eines von dem Trans-Golgi-Adaptor AP-1 erkannt wird, interagiert das andere mit dem Plasmamembran-Adaptor AP-2. Der Transport kann somit entweder direkt über den Golgi-Apparat oder aber durch Endozytose über die Plasmamembran erfolgen (Hofmann *et al.* 1999; Neeffjes *et al.* 2011). In den MIIC erfolgt die stufenweise proteolytische Degradierung von CD74 unter Beteiligung verschiedener Proteasen (Matza *et al.* 2003). Dabei verbleibt das CLIP-Fragment in der Peptidbindefurche bis es unter Mithilfe von H2-M (HLA-DM im Menschen) zum Austausch gegen ein zu präsentierendes Peptid und zum dem anschließenden Transport dieses Komplexes an die Zelloberfläche kommt, wo dieser durch CD4 positive T-Zellen erkannt werden kann (Chen & Jensen 2008), (Abb. 1.9).

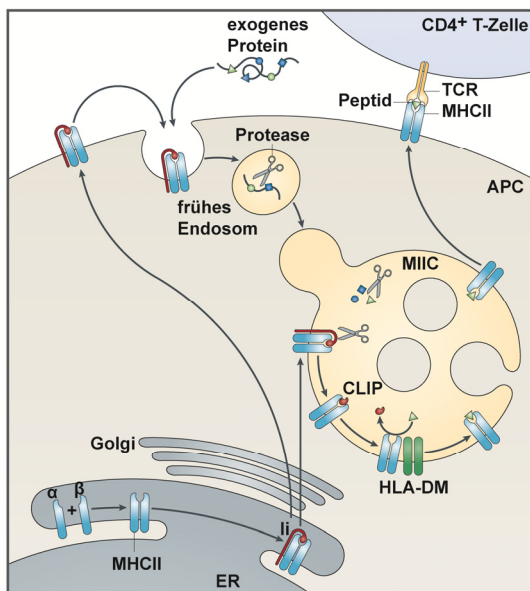


Abb. 1.9: Antigenpräsentation durch MHCII. Die α - und die β -Kette von MHCII bilden im ER einen Komplex mit der invarianten Kette (Ii). Der Komplex wird über den Golgi-Apparat entweder direkt oder über die Plasmamembran in das MHC Klasse II Kompartiment (MIIC) transportiert, wo es zur stufenweisen Degradierung von Ii kommt. Das Klasse II assoziierte Ii Peptid (Class II-associated Ii chain peptide, CLIP) Fragment der invarianten Kette verbleibt dabei zunächst in der Peptidbindungsstelle von MHCII. Endozytiertes Protein wird ebenfalls im MIIC prozessiert und ersetzt schließlich das CLIP-Fragment unter Mitwirkung des Chaperons HLA-DM (H2-M in der Maus). Der Komplex aus MHCII und gebundenem Antigen wird daraufhin an die Zelloberfläche transportiert und den CD4-positiven T-Zellen präsentiert. Antigen-präsentierende Zelle (Antigen presenting cell, APC), T-Zell-Rezeptor (T cell receptor, TCR), entnommen aus (Neeffjes *et al.* 2011).

1.3.2 Die invariante Kette

Im Menschen wurden vier (p33, p35, p43 und p45), in der Maus zwei (p31, p41) verschiedene Isotypen der invarianten Kette identifiziert. Die Unterschiede zwischen p33 und p35 beziehungsweise p43 und p45 liegen in der Verwendung alternativer Startkodons. Durch die veränderte Translation enthalten p35 und p45 beide eine Abfolge von 16 zusätzlichen Aminosäuren am zytoplasmatischen N-Terminus von CD74, die ein starkes ER-Retentionssignal darstellen (Cresswell 1994; Landsverk *et al.* 2009). P43 und p45 des Menschen, sowie p41 der Maus unterscheiden sich von den kleineren Isoformen durch die Transkription eines weiteren Exons im Bereich der luminalen Domäne. Dieses kodiert für eine Proteaseinhibitor-domäne

der Cystatin-Familie. Es wird vermutet, dass diese die Proteolyse internalisierter Proteine hemmt, so dass die Peptide die notwendige Größe beibehalten, um von MHCII gebunden zu werden (Chapman 1998; Neefjes *et al.* 2011). Neben dieser inhibitorischen Funktion werden CD74 noch weitere Eigenschaften zugesprochen, welche die Beladung von MHCII mit den zu präsentierenden Antigenen erleichtern. So wird vermutet, dass freie negative Ladungen am N-Terminus des Proteins für eine Interaktion mit CD74-N-Termini auf anderen Endosomen verantwortlich sind, wodurch eine Fusion dieser Kompartimente begünstigt wird. Dies führt zu einer Vergrößerung der frühen Endosomen und zu einer verzögerten Ansäuerung und Reifung. Angenommen wird, dass dies ebenfalls die internalisierten Proteine vor einer zu schnellen Degradierung schützt sowie den Abbau von MHCII verzögert und somit eine Bindung der Peptide an MHCII begünstigt (Boes *et al.* 2005; Gregers *et al.* 2003; Landsverk *et al.* 2011; Nordeng *et al.* 2002). Eine weitere Möglichkeit die Antigenpräsentation zu beeinflussen bietet die Interaktion von CD74 mit Myosin II in dendritischen Zellen. Während der Migration dieser Zellen wird Myosin II benötigt, um die Kontraktion von Aktin zu ermöglichen. Durch dessen Retention wirkt sich CD74 negativ auf die Mobilität der Zelle auf, wodurch dieser mehr Zeit zur Verfügung steht, auf ein Pathogen zu treffen und dieses aufzunehmen (Faure-Andre *et al.* 2008).

Das murine p31 besteht aus 217 Aminosäuren. Davon liegen die 30 N-terminalen Aminosäuren im Zytoplasma. Die Transmembrandomäne besteht aus 24 Aminosäuren während die restlichen Aminosäuren luminal gelegen sind. Nach dem sequenziellen Abbau des Proteins und der finalen Freisetzung des CLIP-Fragmentes durch Cathepsin S im MIIC verbleibt ein N-terminaler Teil von 82 Aminosäuren in der Membran. Es wird diskutiert, dass dieses Fragment der regulierten Intramembranproteolyse unterliegt (Abb. 1.10), (Matza *et al.* 2003). Die hierdurch ins Zytoplasma freigesetzte intrazelluläre Domäne soll demnach zu einer Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs in B-Zellen führen, wodurch deren Überleben und Reifung ermöglicht werden (Becker-Herman *et al.* 2005; Matza *et al.* 2002a; Matza *et al.* 2003).

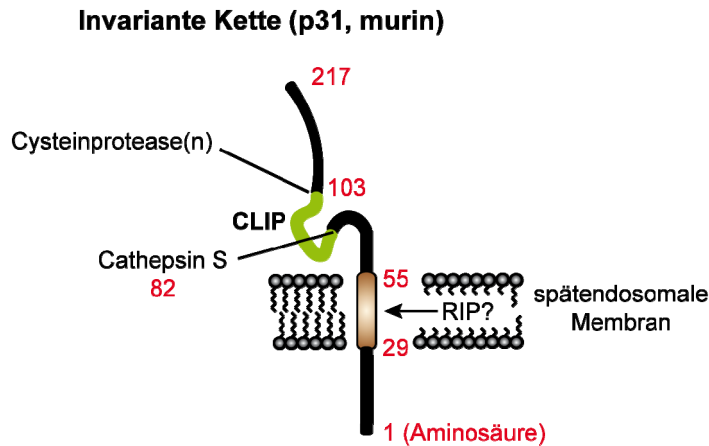


Abb. 1.10: Prozessierung von murinem CD74 (p31). Nach Freisetzung der CLIP-Region durch (eine) Cysteinprotease(n) und Cathepsin S verbleibt ein N-terminales Fragment von 82 Aminosäuren in der Membran. Es wird vermutet, dass dieses anschließend der regulierten Intramembranproteolyse unterliegt.

CD74 hat zudem eine wichtige Funktion als Rezeptor für das Zytokin *Macrophage migration inhibitory factor* (MIF) und das humane Pathogen *Helicobacter pylori*.

MIF ist ein Mediator sowohl der angeborenen als auch der erworbenen Immunität und spielt eine Rolle bei chronischen Entzündungsprozessen und Karzinogenese. In Abhängigkeit von CD44 führt die Bindung an CD74 zur Aktivierung von ERK1 und ERK 2. In B-Zellen induzierte CD74 zudem die Aktivierung von AKT, *Spleen tyrosine kinase* (Syk) und NF- κ B und führte zur Proliferation der Zellen (Beswick & Reyes 2009).

Das Gram-negative Bakterium *H. Pylori* befällt die Schleimhaut des Magens und des Duodenums und führt zu chronischer Gastritis und Geschwüren. Außerdem kann es ursächlich für Karzinome und Lymphome des Magen-Darmtraktes sein (Solnick & Tompkins 1992; Talley *et al.* 1991). *H. pylori* nutzt CD74 für die Adhäsion an den Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes. Diese Bindung führt zu einer Erhöhung der Oberflächenexpression von CD74 sowie der Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs und die daraus resultierende Produktion proinflammatorischer Zytokine wie beispielsweise IL8. Die Bindung des Bakteriums an die Zielzelle kann durch den Einsatz von Antikörpern gegen CD74 signifikant inhibiert werden (Beswick & Reyes 2009).

1.4 Zielsetzung

SPPL2a und SPPL2b gehören zu den iCLIP-Aspartylproteasen und schneiden ihre Substrate innerhalb der hydrophoben Transmembrandomäne. Bisher sind nur wenige Substrate dieser Proteasen identifiziert worden. Die *in vivo* Relevanz der Prozessierung und die Bedeutung der dabei entstehenden Fragmente ist dabei weitestgehend ungeklärt.

Knock-out-Mausmodelle bieten eine geeignete Möglichkeit, die Funktion von Proteinen *in vivo* zu charakterisieren. Aufgrund dessen wurden im Vorfeld dieser Arbeit SPPL2a- beziehungsweise SPPL2b-defiziente Mäuse (*SPPL2a*^{-/-} und *SPPL2b*^{-/-}) generiert. Ein Ziel dieser Arbeit war es, diese mit geeigneten Wildtyp-Kontrolltieren zu vergleichen, deren Phänotyp zu analysieren und gegebenenfalls neue Substrate der Proteasen zu identifizieren. Aufgrund der Tatsache, dass TNF α und der FasL, zwei der Substrate von SPPL2a/b, essentielle immunologische Funktionen ausüben, sollte die Untersuchung des Immunsystems einen Schwerpunkt dieser Arbeit darstellen.

SPPL2a und SPPL2b weisen nicht nur Unterschiede bezüglich ihrer Expression in verschiedenen Geweben auf, sondern zeigen auch intrazellulär abweichende Lokalisationen. Durch Überexpressionsstudien konnte jedoch festgestellt werden, dass die meisten Substrate sowohl von SPPL2a als auch von SPPL2b geschnitten werden. Daher sollte untersucht werden, ob beide Proteasen trotz unterschiedlicher Lokalisation auch *in vivo* redundante Funktionen ausüben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Soweit im Text nicht anders vermerkt, wurden Chemikalien der Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), oder Sigma-Aldrich (Hamburg) verwendet. Sie erfüllten den Reinheitsgrad *p.a.*.

Lösungen wurden unter Verwendung von ddH₂O (Millipore, Schwalbach) angesetzt. Zum Sterilisieren von Lösungen und Materialien wurden diese autoklaviert (Tecnomara Integra Biosciences GmbH, Fernwald).

2.1.2 Bakterienstämme

Klonierungen wurden im Rahmen dieser Arbeit in der Regel unter Verwendung des Bakterienstammes *E. coli XLI-blue* (Stratagene, LaJolla, Kalifornien) durchgeführt. Dieser weist den folgenden Genotyp auf: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]* (Bullock *et al.* 1987).

Für die Amplifikation von Plasmiden, die den *SPPL2a*-ORF (*Open reading frame*, offener Leserahmen) enthielten, wurden elektrokompetente *CopyCutter*TM *EPI400*TM *Escherichia coli* (Epicentre, Madison, WI) genutzt. Diese Zellen wurden entwickelt, um die Kopienzahl verschiedener, häufig für Klonierungen verwendeter Vektoren nach erfolgter Transformation gering zu halten. Auf diese Weise ist es möglich, auch DNA-Sequenzen, die in hoher Kopienzahl instabil werden, zu klonieren. Im Anschluss an die Transformation der Zellen und Erreichen der gewünschten Bakteriendichte, führt die Zugabe der *CopyCutter*TM Induktionslösung zur Erhöhung der Kopienzahl und somit zu der gewünschten hohen Konzentration des Zielvektors.

2.1.3 Mauslinien

Die Haltung der Mäuse erfolgte in individuell belüfteten Käfigen (*individually ventilated cages, IVCs*) bei einer Raumtemperatur von 19-21 °C und einer Luftfeuchtigkeit von

45-60 %. Es wurde ein Rhythmus von 12 Stunden Helligkeit (6-18 Uhr) und 12 Stunden Dunkelheit eingehalten. Die Tiere erhielten Trockenfutter der Firma Ssniff Spezialitäten GmbH (Soest). Der Umgang mit den Tieren erfolgte gemäß den Richtlinien der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und die Durchführung von Tierversuchen wurde vom Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein genehmigt (Aktenzeichen: V 312-72241.121-3 (22-2/10)).

Alle Experimente wurden entweder mit Geschwistertieren durchgeführt oder es wurden Kontrolltiere der gleichen Zucht mit entsprechendem Geschlecht und Alter verwendet.

Die Generierung der *SPPL2a*-knock-out-Maus (*SPPL2a*^{-/-}) wurde von Dr. Bernd Schröder (Biochemisches Institut, CAU Kiel) durch die Insertion einer *Neomycinkassette* in Exon 2 des *SPPL2a*-Gens durchgeführt und ist hier kurz dargestellt (Abb. 2.1).

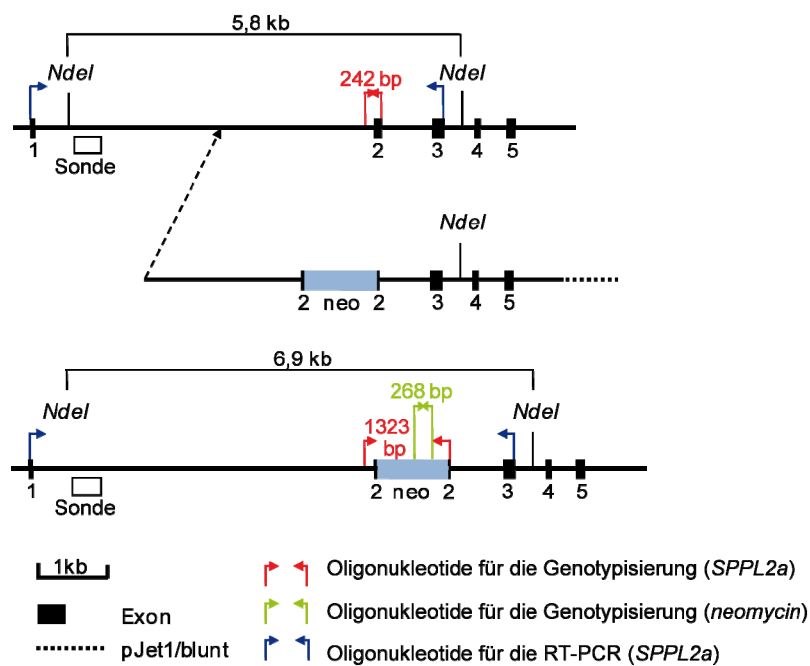


Abb. 2.1: Generierung der *SPPL2a*-defizienten Maus. Dargestellt ist die Exon-Intron Abfolge des murinen *SPPL2a*-Gens, der Aufbau des *Targeting*-Konstruktes und die Struktur des *Targeting*-Lokus. Die Bindungsstellen von Oligonukleotiden, die für PCRs verwendet wurden sowie die Sonde für die *Southern Blot* Analyse zum Nachweis der *Neomycin*-Insertion sind angezeigt.

Genomische DNA von 129SVJ Mäusen wurde für die Amplifikation eines 5,1 kb langen Fragmentes verwendet, welches das Exon 2 des murinen *SPPL2a* (2,3 kb 5'- und 2,8 kb 3'-Homologiearm) umrahmt. Die Sequenz wurde in pJET1/blunt (Fermentas, St. Leon-Rot) subkloniert. Die Neomycin-Expressionskassette des Vektors pMC1neo (Stratagene, Santa Clara, CA) wurde durch Überhangverlängerungs-PCR in Exon 2 inseriert, wodurch es begleitend zur Deletion von 57 bp des Exons kam. Das PCR-Fusionsprodukt wurde in pJET1/blunt subklo-

niert. Nach der Linearisierung dieses *Targeting*-Vektors durch *XhoI* erfolgte dessen Transformation in die embryonale Stammzelllinie (ES) R1 (Nagy *et al.* 1993). G418-resistente Kolonien wurden durch eine PCR auf ihre erfolgreiche homologe Rekombination überprüft und durch *Southern Blot* Analysen nach Restriktionsverdau der genomischen DNA mit *NdeI* bestätigt. Hierfür wurde eine Sonde durch eine PCR aus genomischer DNA generiert, welche 454 bp der 5' *upstream*-Region umfasste. Die positiv getesteten ES-Zellen wurden in Blastozysten von C57BL/6 Mäusen injiziert. Chimere, männliche Nachkommen wurden mit C57BL/6N *Crl* Weibchen verpaart.

Mäuse die heterozygot für die Insertion eines *Genetraps* in Intron 2 des *SPPL2b*-Gens (Abb. 2.2) waren, stammten vom CARD Institute, Kumamoto University, Japan (Araki *et al.* 1999) und wurden zur Erzeugung homozygoter *knock-out*-Tiere (*SPPL2b*^{-/-}) miteinander verpaart.

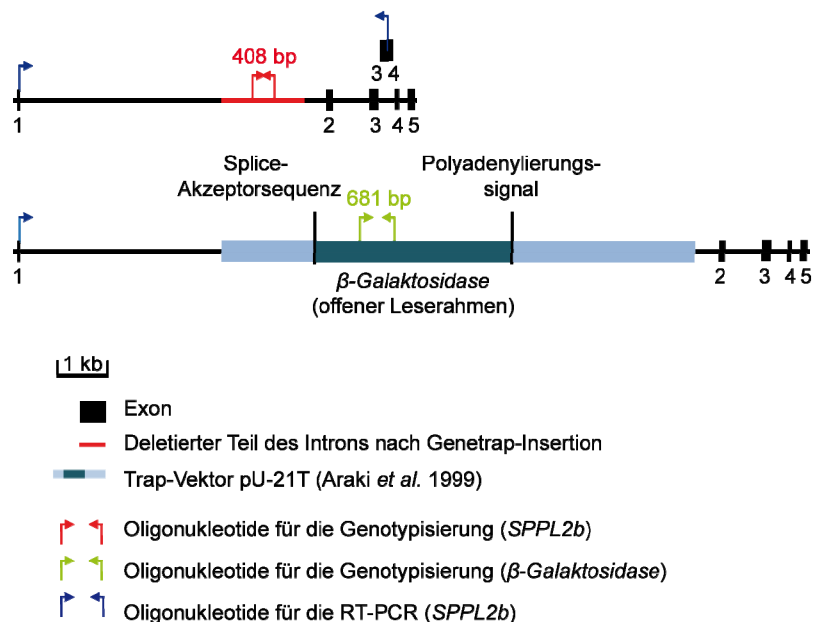


Abb. 2.2: Generierung der *SPPL2b*-defizienten Maus. Gezeigt ist die Exon-Intron Abfolge des murinen *SPPL2b*-Gens sowie der Aufbau und die Position der *Genetrap*-Insertion. Dargestellt sind außerdem die Bindungsstellen von Oligonukleotiden, die für PCRs verwendet wurden.

Die Verwendung von *Genetrap*-Vektoren zur Insertion von Mutationen in das Genom führt zur Expression von Fusionskonstrukten aus Sequenzen des endogenen Gens und eines Reportergens. Der verwendete Vektor enthielt als Reportergen die bakterielle (*E. coli*) Sequenz der β -Galaktosidase ohne einen Promoter, welche 5' *upstream* von einer Splice-Akzeptorsequenz und 3' *downstream* durch ein Polyadenylierungssignal flankiert wurde. Durch die Insertion dieser Sequenz etwa 0,4 kb *upstream* von Exon 2 des *SPPL2b*-Gens resultierte die Expression des Gens in der Generierung eines trunkierten *SPPL2b*-Proteins mit fusionierter β -

Galaktosidase. Etwa 1,6 kb der Intronsequenz wurden dabei deletiert (Daten nicht gezeigt). Die Insertion des *Genetraps* führte somit nicht nur zum fast vollständigen Fehlen des SPPL2b-Proteins sondern gab auch Aufschluss über die endogene Aktivität des SPPL2b-Promoters.

CD74 defiziente Mäuse ($CD74^{-/-}$, B6.129S6- $Cd74^{tm1Liz}/J$, C57BL/6 Hintergrund) wurden zuvor beschrieben (Bikoff *et al.* 1993) und von Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) bezogen. Durch die Verpaarung mit $SPPL2a^{-/-}$ Mäusen, welche über zehn Generationen mit C57BL/6N *Crl* Mäusen rückgekreuzt waren, wurden SPPL2a-CD74 doppelt-defiziente Tiere mit einheitlich genetischem Hintergrund gezüchtet.

$Rag2^{-/-} cyc^{-/-}$ Mäuse (Goldman *et al.* 1998) mit einer Defizienz der B-Zellen, T-Zellen und funktionaler NK-Zellen stammten von Taconic (Germantown, NY).

Cathepsin S^{-/-} Mäuse wurden uns freundlicherweise von Dr. Thomas Reinheckel (Institut für Molekulare Medizin und Zellforschung, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, (Houseweart *et al.* 2003; Nakagawa *et al.* 1999) zur Verfügung gestellt.

2.1.4 Zelllinien

Die folgenden Zelllinien wurden für die Erstellung dieser Arbeit verwendet (Tab. 2.1).

Tab. 2.1: Bezeichnung, Beschreibung und Herkunft der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
HeLa	Menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms	DMSZ (Braunschweig)
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen, transfiziert mit DNA-Teilen des menschlichen Adenovirus 5 (22% des Genoms, Gene: E1a, E1b, E4)	DKFZ (Heidelberg)
MEF $SPPL2a^{+/+}$ (55/4, 55/5, 22/7)	Murine embryonale Fibroblasten, immortalisiert mit SV40-Plasmid	Dr. Bernd Schröder (Biochemisches Institut, CAU Kiel)
MEF $SPPL2a^{-/-}$ (55/1, 55/2, 55/9)	Murine embryonale Fibroblasten, immortalisiert mit SV40-Plasmid	Dr. Bernd Schröder (Biochemisches Institut, CAU Kiel)
MEF $SPPL2b^{+/+}$ (45/3, 45/9, 45/11)	Murine embryonale Fibroblasten, immortalisiert mit SV40-Plasmid	Eigene Herstellung (2.2.2.2.1)
MEF $SPPL2b^{-/-}$ (45/6, 45/7, 45/8)	Murine embryonale Fibroblasten, immortalisiert mit SV40-Plasmid	Eigene Herstellung (2.2.2.2.1)

Des Weiteren wurden murine Primärzellen (B-Zellen und dendritische Zellen) verwendet, die für die entsprechenden Versuche jeweils frisch isoliert und differenziert wurden (2.2.2.2).

2.1.5 Plasmide

Der eukaryotische Expressionsvektor pcDNATM3.1/Hygro⁽⁺⁾ (Invitrogen, Karlsruhe) wurde für eine starke, konstitutive Expression von Proteinen in einer Vielzahl von Säugerzellen entwickelt und für die Herstellung der in Tab. 2.2 aufgeführten Plasmide verwendet. Er enthält eine Hygromycin-Resistenz (unter der Kontrolle des SV40-Promotors und mit SV40-Polyadenylierungssignal) als Selektionsmarker in Säugerzellen und eine vorwärts-orientierte (+) *Multiple Cloning Site*. Der Cytomegalovirus- (CMV-) Promotor gewährleistet die hohe Expressionsstärke des Zielproteins. Die T7-Promotorsequenz ermöglicht eine *in vitro* Transkription in *Sense*-Orientierung. Polyadenylierungssignal und Transkriptions-Terminations-Sequenz des bovinen *Growth Hormone* (BGH) erhöhen die mRNA-Stabilität. Der SV40 Replikationsursprung dient der Amplifikation des Plasmids in Zelllinien, welche das *Large T Antigen* exprimieren. Der F1-Replikationsursprung kann für die Generierung von ssDNA (*single stranded*) durch den F1 Phagen genutzt werden.

Für die Amplifikation und Selektion des Vektors in *E. coli* enthält der Vektor einen pUC-Replikationsursprung und ein Ampicillin-Resistenzgen (β -Laktamase), (Abb. 2.3).

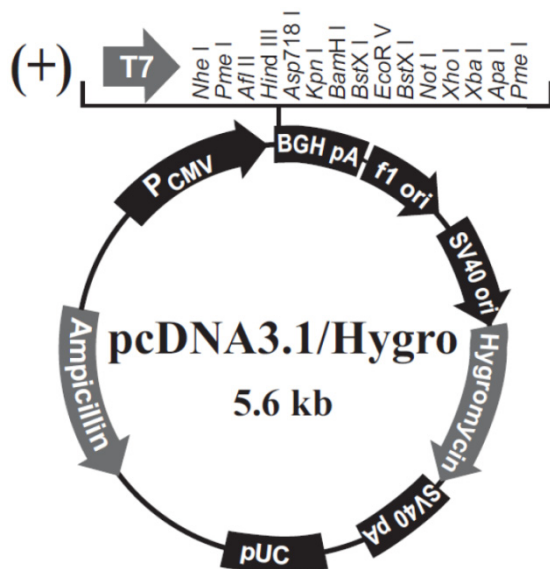


Abb. 2.3: Karte des Expressionsvektors pcDNA3.1/Hygro⁺ (5597 Nukleotide, aus Datenblatt des Herstellers). CMV-Promotor (Basen: 209-863), T7-Promotor (863-882), *Multiple Cloning Site* (895-1010), BGH-Polyadenylierungssignal (1021-1235), F1-Replikationsursprung (1298-1711), SV40-Promotor und SV40-Replikationsursprung (1776-2100), Hygromycinresistenz (2118-3141), SV40-Polyadenylierungssignal (3154-3526), pUC-Replikationsursprung (3786-4456, Komplementärstrang), Ampicillinresistenz (4601-5461, Komplementärstrang).

Für die Klonierung der SPPL-Expressionskonstrukte wurde mRNA aus Wildtyp-MEFs (murinen embryonalen Fibroblasten) isoliert (2.2.1.2) und unter Verwendung von Oligo-dT-Oligonukleotiden in cDNA umgeschrieben (2.2.1.6.4). Diese diente als *Template* für eine PCR zur Amplifikation des murinen *SPPL2a*- beziehungsweise *SPPL2b*-ORFs mit fusioniertem 3'-terminalem *Myc-Tag*. Hierfür wurden die Oligonukleotide *mSPPL2a-HindIII-Fw* und

mSPPL2a-Myc-XhoI-Rv beziehungsweise *mSPPL2b-KpnI-Fw* und *mSPPL2b-Myc-XbaI-Rv* genutzt (2.2.1.6.2). Unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *XhoI* beziehungsweise *KpnI* und *XbaI* (2.2.1.8) wurden die Sequenzen in den Vektor pcDNA3.1/Hygro⁺ subkloniert.

Die murine *CD74p41* cDNA (Klon IRAVp968E041D) wurde von ImaGenes (Berlin) bezogen. Basierend auf diesem *Template* wurde das Expressionskonstrukt der p41 Isoform *mCD74p41* fusioniert mit einem HA-Tag am 3'-Ende durch PCR generiert. Hierfür wurden die Oligonukleotide *mCD74-BamHI-Fw* und *mCD74-HA-XhoI-Rv* verwendet (2.2.1.6.2). Das PCR-Produkt wurde nach Restriktionsverdau mit *BamHI* und *XhoI* (2.2.1.8) in den Vektor pcDNA 3.1/Hygro⁺ subkloniert.

Tab. 2.2: Liste der verwendeten Plasmide.

Bezeichnung	Resistenz	Kodiertes Protein	Tag	Herkunft
pcDNA3.1/Hygro ⁺ mSPPL2a-Myc	Amp	mSPPL2a	C-Myc	Eigene Herstellung
pcDNA3.1/Hygro ⁺ mSPPL2b-Myc	Amp	mSPPL2b	C-Myc	Eigene Herstellung
pcDNA3.1/Hygro ⁺ mSPPL2a (D416A)-Myc	Amp	mSPPL2a (D416A)	C-Myc	Nur Güneli (Biochemisches Institut, CAU Kiel)
pcDNA3.1/Hygro ⁺ mSPPL2b (D414A)-Myc	Amp	mSPPL2b (D414A)	C-Myc	Nur Güneli (Biochemisches Institut, CAU Kiel)
pcDNA3.1/Hygro ⁺ mCD74p41-HA	Amp	mCD74 p41	C-HA	Eigene Herstellung
pcDNA3.1/Hygro ⁺ mCD74p31-HA	Amp	mCD74 p31	C-HA	Dr. Bernd Schröder (Biochemisches Institut, CAU Kiel), hergestellt unter Verwendung des pcDNA3.1/Hygro ⁺ mCD74p31-HA
pMSSVLT	Amp/Kan/G418	<i>Large T Antigen</i>	/	(Schuermann 1990)

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Gewebeproben

NET-Puffer (Natriumchlorid-EDTA-Tris-Puffer)

NaCl	100 mM
EDTA	100 mM (pH 8,0)
Tris	50 mM (pH 8,0)

Für die Isolierung von DNA aus Schwanzbiopsien und embryonalen Köpfen wurde das Gewebe zunächst über Nacht in 600 µl NET-Puffer, 60 µl 10 % (w/v) SDS und 60 µl Proteinase K (20 mg/ml in NET-Puffer, *Proteinase K recombinant PCR Grade*, Roche, Grenzach) bei 56 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 11000 x g zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 1:1 mit Isopropanol gemischt, um die DNA zu fällen. Die DNA wurde mit einer an der Spitze zugeschmolzenen Glaspasteurpipette gefischt, in 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Je nach Menge wurde die DNA schließlich bei 37 °C in 60-100 µl ddH₂O gelöst.

2.2.1.2 Isolierung von mRNA aus Zellen

Die Isolierung von mRNA aus Zellen erfolgte unter Verwendung des *NucleoSpin[®] RNA II Kits* (Macherey-Nagel, Düren, Germany) nach Angaben des Herstellers.

2.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm. Zur Bestimmung der Konzentration wurde daher die OD₂₆₀ mit Hilfe des *Synergy HT* (BioTek, Bad Friedrichshall) gemessen. Die anschließende Berechnung der Konzentration erfolgte durch das Gerät basierend auf dem Lambert-Beerschen Gesetz. Zur Bestimmung der Reinheit der Probe wurde außerdem die OD₂₈₀ gemessen und das Verhältnis der OD bei 260 zu der OD bei 280 nm gebildet. Bei reiner DNA ist das Verhältnis OD_{260/280} 1,8, bei reiner RNA 2.

2.2.1.4 Agarosegelelektrophorese

50 x TAE-Puffer

Tris	2 M
EDTA	0,05 M (pH 8,0)
Essigsäure	5,5 %

Die Auftrennung von DNA und RNA erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Je nach Größe der erwarteten DNA-Fragmente wurden Gele mit einem Anteil von 1-2 % (w/v) Agarose (SeqKem[®] LE Agarose, Lonza, Rockland, ME) verwendet (Tab. 2.3). Hierfür wurde die entsprechende Menge Agarose in 1 x TAE-Puffer in der Mikrowelle so lange aufgekocht,

bis diese vollständig gelöst war. Zur Visualisierung der DNA wurden 5 µl/100 ml 1 % (w/v) Ethidiumbromid (Carl Roth) zugesetzt, nachdem die Lösung auf etwa 60 °C abgekühlt war.

Die DNA/RNA Proben wurden im Verhältnis 5:1 mit DNA-Ladepuffer (Fermentas, St. Leon Rot) versetzt und bei einer Spannung von 120 V aufgetrennt. 1 x TAE-Puffer diente als Elektrophoresepuffer.

Die Detektion der aufgetrennten Fragmente erfolgte bei einer Wellenlänge von 312 nm unter Verwendung der Geldokumentationsanlage *Gel Jet Imager* (Intas, Göttingen). Als Größenstandard wurde der *Gene RulerTM 1 kb DNA Ladder* (Fermentas) oder der *Gene RulerTM 100 bp Plus DNA Ladder* (Fermentas) verwendet.

Tab. 2.3: Verwendete Agarosekonzentrationen in Abhängigkeit von der Fragmentgröße (Sambrook et al. 1989).

DNA/RNA Fragmentgröße (kb)	Agarose-Konzentration % (w/v)
5-60	0,3
1-20	0,6
0,8-10	0,7
0,5-7	0,9
0,4-6	1,2
0,2-3	1,5
0,1-2	2

2.2.1.5 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Für die Elution gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA aus dem Agarosegel (2.2.1.4) wurde die gewünschte Bande mit Hilfe eines Ethanol-gereinigten Skalpell auf einem UV-Tisch (Reprostar, Camag, Muttenz, Schweiz) ausgeschnitten. Die Verwendung einer geringeren Lichtintensität von 366 nm minderte das Risiko der Entstehung von Mutationen. Die Isolierung der DNA aus dem Gelfragment erfolgte mit dem *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben.

2.2.1.6 Polymerasekettenreaktion (*Polymerase chain reaction, PCR*)

PCRs (Mullis et al. 1986) wurden in einem Thermocycler (GeneAmp PCR System 2400, PerkinElmer, Wellesley, MA) durchgeführt. Für Genotypisierung- (2.2.1.6.1), Kolonie-Kontroll- (2.2.1.6.3) und RT-PCRs (2.2.1.6.4) wurde die *Taq* DNA Polymerase (Fermentas) genutzt. Klonierungs-PCRs (2.2.1.6.2) wurden aufgrund der geringeren Fehlerrate unter Verwendung der *Pfu* DNA Polymerase (Fermentas) durchgeführt. Die verwendeten Puffer und Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) stammten von der Firma Fermentas.

2.2.1.6.1 Genotypisierungs-PCR

Folgende Oligonukleotide kamen für die Bestimmung des Genotyps der Mäuse zum Einsatz:

Tab. 2.4: Oligonukleotide für Genotypisierungs-PCRs und verwendete *Annealing*-Temperaturen.

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Annealing-Temperatur
<i>mSPPL2a-Exon2-Fw</i>	AAA CTC ATT GAA GGA CTT GCT C	55 °C
<i>mSPPL2a-Exon2-Rv</i>	TTT CTA GGG AAC TTG GAA GTC	55 °C
<i>Neomycin-Kiel 3 Fw</i>	GTT GTC ACT GAA GCG GGA AGG GAC TGG CTG	58 °C
<i>Neomycin-Kiel 4 Rv</i>	GCG AAC AGT TCG GCT GGC GCG AGC CCC TGA	58 °C
<i>mSPPL2b-Fw</i>	CAT GCC TAC CTC CTT ACT CTG	55 °C
<i>mSPPL2b-Rv</i>	TGA GAT CTG ATA CCC TCT TCT G	55 °C
<i>β-Galaktosidase-Fw</i>	TTA TCG ATG AGC GTG GTG GTT ATG C	55 °C
<i>β-Galaktosidase-Rv</i>	GCG CGT ACA TCG GGC AAA TAA TAT C	55 °C
<i>mCD74-Geno-Fw</i>	GGC TAG GTC CCA GTG TAG GC	66 °C
<i>mCD74-wt-Rv</i>	AAT CAG CGC TCA AGG TCA CT	66 °C
<i>mCD74-ko-Rv</i>	CGC TGA CAG CCG GAA CAC GG	66 °C

Die Komponenten für die Genotypisierungs-PCRs wurden wie folgt pipettiert:

Tab. 2.5: Pipettierschema für Genotypisierungs-PCRs.

PCR-Ansatz Genotypisierungs-PCR (50 µl)	
Isolierte genomische DNA (2.2.1.1)	0,5-1 µg
10 µM Oligonukleotid Fw	1 µl
10 µM Oligonukleotid Rv	1 µl
10 x <i>Dream Taq</i> Puffer	5 µl
2 mM dNTPs	5 µl
<i>Dream Taq</i> Polymerase	0,5 µl
DMSO	2,5 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

Für die Bestimmung des Genotyps bezüglich des *CD74-Gens* wurden alle drei *CD74*-Oligonukleotide (Tab. 2.4) in einem PCR-Ansatz verwendet.

Für die verschiedenen Genotypisierungs-PCR-Ansätze wurde das folgende Temperaturprofil gewählt:

Tab. 2.6: Temperaturprofil für Genotypisierungs-PCRs.

	Temperatur (°C)	Dauer	Zyklen
Initialdenaturierung	95	5 min	
Denaturierung	95	15 s	30-40
Annealing	55-66 (Tab.2.4)	30 s	
Elongation	72	1 min/kb	
Finale Elongation	72	3 min	

2.2.1.6.2 Klonierungs-PCR

Folgende Oligonukleotide kamen für Klonierungs-PCRs zum Einsatz:

Tab. 2.7: Oligonukleotide für Klonierungs-PCRs und verwendete *Annealing*-Temperaturen.

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Annealing-Temperatur
<i>mSPPL2a-HindIII-Fw</i>	CTG AAA GCT TGC CAC CAT GGG GCT GCT GCA CTC G	60 °C
<i>mSPPL2a-Myc-XhoI-Rv</i>	GTT ACT CGA GTT ACA GAT CCT CTT CTG AGA TGA GTT TTT GTT CCT GTT GTA CAA TCT GCT CAT CAG TCG TC	60 °C
<i>mSPPL2b-KpnI-Fw</i>	ATT AGG TAC CGC CAC CAT GGC CGC GGC GCG GCT G	60 °C
<i>mSPPL2b-Myc-XbaI-Rv</i>	GTT ATC TAG ACT ACA GAT CCT CTT CTG AGA TGA GTT TTT GTT CGG CCG AAG TCT CTG GCT TCA CCA CAG G	60 °C
<i>mCD74-BamHI-Fw</i>	GAT CGG ATC CAC GCC ACC ATG GAT GAC CAA CGC GAC CT	55 °C
<i>mCD74-HA-XhoI-Rv</i>	GAT CCT CGA GTC AAG CGT AGT CTG GGA CGT CGT ATG GGT ACA GGG TGA CTT GAC CCA GTT C	55 °C

Die Komponenten für die Klonierungs-PCRs wurden wie folgt pipettiert:

Tab. 2.8: Pipettierschema für Klonierungs-PCRs.

PCR-Ansatz Klonierungs-Polymerase (50 µl)	
cDNA (2.1.5)	0,1-1 µg
10 µM Oligonukleotid Fw	1 µl
10 µM Oligonukleotid Rv	1 µl
10 x <i>Pfu</i> Puffer	5 µl
2 mM dNTPs	5 µl
<i>Pfu</i> Polymerase	0,5 µl
DMSO	2,5 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

Für die verschiedenen Klonierungs-PCR-Ansätze wurde das folgende Temperaturprofil gewählt:

Tab. 2.9: Temperaturprofil für Klonierungs-PCRs.

	Temperatur (°C)	Dauer	Zyklen
Initialdenaturierung	95	5 min	
Denaturierung	95	45 s	35
Annealing	55-60 (Tab.2.7)	30 s	
Elongation	72	1 min/kb	
Finale Elongation	72	10 min	

2.2.1.6.3 Kolonie-Kontroll-PCR

Kolonie-Kontroll-PCRs wurden durchgeführt, um zu prüfen, ob ein Bakterienklon den Vektor mit der gewünschten Sequenz enthielt. Es wurden jeweils das flankierende *Fw*-Oligonukleotid

der gewünschten Zielsequenz in Kombination mit einem in der Vektorsequenz bindenden *Rv*-Oligonukleotid (pcDNA3.1-RP/1, 5' CAA ACA ACA GAT GGC TGG C 3') verwendet.

Die Komponenten für die Kolonie-Kontroll-PCRs wurden wie folgt pipettiert:

Tab. 2.10: Pipettierschema für Kolonie-Kontroll-PCRs.

PCR-Ansatz Kolonie-Kontroll-PCR (50 µl)	
10 µM Oligonukleotid Fw	1 µl
10 µM Oligonukleotid Rv	1 µl
10 x <i>Dream Taq</i> Puffer	5 µl
2 mM dNTPs	5 µl
<i>Dream Taq</i> Polymerase	0,5 µl
DMSO	2,5 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl
DNA	Die zu untersuchende Kolonie wurde mit einer Pipettenspitze aufgenommen und kurz in den PCR-Ansatz getaucht (2.2.1.12).

Für die verschiedenen Kolonie-Kontroll-PCR-Ansätze wurde das folgende Temperaturprofil gewählt:

Tab. 2.11: Temperaturprofil für Kolonie-Kontroll-PCRs.

	Temperatur (°C)	Dauer	Zyklen
Initialdenaturierung	95	5 min	
Denaturierung	95	45 s	35
Annealing	55-60 (Tab.2.7)	30 s	
Elongation	72	1 min/kb	
Finale Elongation	72	10 min	

2.2.1.6.4 RT-PCR (Reverse Transkriptions-PCR)

Die Analyse der Expression spezifischer Gene erfolgte mit Hilfe einer RT-PCR. Die reverse Transkription isolierter mRNA (2.2.1.2) wurde mit Hilfe des *RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas) durchgeführt. Hierfür wurden 0,1-5 µg *RNA-Template* mit 1 µl der im Kit enthaltenen Random-Hexamer- oder Oligo-dT-Oligonukleotide versetzt und das Volumen mit Diethylpyrocarbonat- (DEPC-) Wasser auf 12 µl ergänzt. Der Ansatz wurde für 5 Minuten bei 70 °C inkubiert, kurz anzentrifugiert und auf Eis gestellt. Es erfolgte die Zugabe von 4 µl 5 x Reaktionspuffer, 1 µl Ribo LockTM Ribonuklease Inhibitor und 2 µl dNTPs (10 mM). Nach anschließender, 5 minütiger Inkubation bei 37 °C wurde 1 µl Reverse Transkriptase zugegeben und die Probe für 60 Minuten auf 45 °C erwärmt. Um die Reaktion zu beenden wurde der Ansatz 10 Minuten auf 70 °C erhitzt. Die so generierte cDNA wurde als *Template* für die nachfolgenden PCRs eingesetzt.

Folgende Oligonukleotide wurden für RT-PCRs verwendet:

Tab. 2.12: Oligonukleotide für RT-PCRs.

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
<i>mSPPL2a-RT-Exon1-Fw</i>	CAC TCG CTG CAC GCT CCC
<i>mSPPL2a-RT-Exon3-Rv</i>	CAC CTT CCT GTG CAA TTC TGG CT
<i>mSPPL2b-RT-Exon1-Fw</i>	TTT GCT GCT ACT CGC GGC
<i>mSPPL2b-RT-Exon3-Rv</i>	AGG GAC CAG CTT CTC CTT GC
<i>β-Aktin-Fw</i>	GTT ACA ACT GGG ACG ACA TGG
<i>β-Aktin-Rv</i>	GAT GGC TAC GTA CAT GGC TG

Die Komponenten für die RT-PCRs wurden wie folgt pipettiert:

Tab. 2.13: Pipettierschema für Klonierungs-PCRs.

PCR-Ansatz RT-PCR (50 µl)	
cDNA	2 µl
10 µM Oligonukleotid Fw	1 µl
10 µM Oligonukleotid Rv	1 µl
10 x <i>Dream Taq</i> Puffer	5 µl
2 mM dNTPs	5 µl
<i>Dream Taq</i> Polymerase	0,5 µl
DMSO	2,5 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

Für die verschiedenen RT-PCR-Ansätze wurden die folgenden Temperaturprofile gewählt:

Tab. 2.14: Temperaturprofil für RT-PCRs.

	Temperatur (°C)	Dauer	Zyklen
Initialdenaturierung	95	5 min	
Denaturierung	95	45 s	25-35
Annealing	60	30 s	
Elongation	72	1 min	
Finale Elongation	72	10 min	

2.2.1.7 Sequenzierungen

Sequenzierungen erfolgten über die Firma GATC (Konstanz) auf einem *ABL 3730xl* nach dem Kettenabbruchverfahren (Sanger *et al.* 1977). Die Sequenzdaten wurden mit Hilfe des Programms *Bioedit* (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA) ausgewertet.

2.2.1.8 Restriktionsverdau

Im Rahmen dieser Arbeit kamen die Restriktionsendonukleasen *HindIII*, *XhoI*, *KpnI*, *XbaI* und *BamHI* zum Einsatz. Ihre Verwendung zur sequenzspezifischen Spaltung von DNA er-

folgte nach den Angaben des Herstellers (Fermentas). Der Restriktionsverdau wurde in einem Volumen von 50 μl angesetzt.

Anschließend und in Abhängigkeit von den geplanten Folgeexperimenten wurde der linearisierte Vektor dephosphoryliert, um eine Religation zu vermeiden. Hierfür wurde dem Restriktionsansatz 1 μl FastAP (Fermentas) auf 1 μg DNA zugegeben, dieser für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend mittels Agarosegelelektrophorese (2.2.1.5) aufgereinigt.

2.2.1.9 Ligation

Die Ligation eines linearisierten Vektors mit der gewünschten *Insert*-DNA wurde im Wasserbad bei 16 °C über Nacht durchgeführt. Die Ansätze wurden wie folgt zusammengestellt:

Tab. 2.15: Pipettierschema für Ligationsansätze.

	Ligation	Positivkontrolle	Negativkontrolle
<i>Insert</i> -DNA	7 μl	-	-
Vektor (einfach geschnitten)	-	1 μl	-
Vektor (doppelt geschnitten, dephosphoryliert)	1 μl	-	1 μl
10 x Ligase-Puffer (Fermentas)	1 μl	1 μl	1 μl
T4-Ligase (Fermentas)	1 μl	1 μl	1 μl
ddH ₂ O	-	7 μl	7 μl

Einfach geschnitten = linearisiert durch eine Restriktionsendonuklease

Doppelt geschnitten = linearisiert durch zwei Restriktionsendonukleasen

Die Ligase wurde anschließend durch 10-minütiges Erhitzen auf 65 °C inaktiviert.

2.2.1.10 Herstellung von elektrokompetenten *E. coli XLI-blue*

LB-Medium

NaCl 10 g/l

Trypton/Pepton aus Casein 10 g/l

Hefeextrakt 5 g/l

pH 7,0 mit NaOH

Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurden dem Medium vor dem Autoklavieren 10 g/l Agar-Agar (hochreine Qualität, Carl Roth) hinzugefügt.

Für die Produktion elektrokompetenter *E. coli XLI-blue* wurde eine sterile Impföse in eine Bakterien-Stock-Lösung getaucht, auf einer tetrazyklinhaltigen (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Merck, Darmstadt)

LB-Platte fraktioniert ausgestrichen und die Platte bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde ein Klon gepickt, zum Animpfen von 50 ml tetrazyklinhaltigem LB-Medium verwendet und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. 20 ml dieser Vorkultur wurden in jeweils 1 l vorgewärmtem LB-Medium mit Tetrazyklin gegeben. Die Bakterienkultur wurde so lange bei 37 °C geschüttelt, bis sie eine OD₆₀₀ von 0,5-0,6 erreicht hatte. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf 250 ml Reaktionsgefäße verteilt und bei 2400 x g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und jeweils zwei Bakterienpellets in insgesamt 20 ml sterilem, eiskaltem ddH₂O resuspendiert. Danach wurden die Reaktionsgefäße mit sterilem, eiskaltem ddH₂O auf jeweils 250 ml aufgefüllt, erneut bei 4 °C und 2400 x g für 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Schritt wurde wiederholt und die Pellets im Anschluss in je 10 ml eiskalter, steriler 10 % (v/v) Glycerin-Lösung resuspendiert. Die Reaktionsgefäße wurden jeweils mit weiteren 40 ml der Glycerinlösung gespült und mit den 10 ml Bakteriensuspensionen in 50 ml Reaktionsgefäßen vereinigt. Danach wurden die Bakterien bei 0 °C und 2200 x g für 20 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets in jeweils 2 ml Glycerinlösung resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde in Aliquots von 50 µl auf Trockeneis schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.1.11 Transformation elektrokompenter Bakterien (Elektroporation)

50 µl Bakteriensuspension (2.1.2, 2.2.1.10) wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 µl des Ligationsansatzes (2.2.1.9) gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Peqlab, Erlangen) überführt. Im Anschluss an die Elektroporation bei 2,5 kV, 25 µF und 400 Ω im *Gene Pulser* (BioRad, München) wurden die Bakterien in 1 ml vorgewärmten LB-Medium (2.2.1.10) aufgenommen und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Bakterien bei 2200 x g sedimentiert, das Pellet in 200 µl LB-Medium resuspendiert und auf einer antibiotikumhaltigen LB-Agar-Platte (2.2.1.10) ausplattiert. Der verwendete Expressionsvektor pcDNA3.1 Hygro⁺ (Invitrogen) trägt ein Ampicillinresistenzgen. Daher wurde dieses Antibiotikum (Sigma-Aldrich) dem LB-Medium in einer Konzentration von 50 µg/ml zugesetzt. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.12 Amplifikation und Isolierung von Plasmiden

Transformierte *E. coli*s wurden zunächst auf antibiotikumhaltigen LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht wachsen gelassen (2.2.1.11). Zur Isolierung und Vermehrung eines einzelnen Klons wurde dieser mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen, kurz in den PCR-Ansatz für eine Kolonie-Kontroll-PCR (2.2.1.6.3) getaucht und anschließend zum Animpfen einer 3 ml (Mini) oder 150 ml (Midi) antibiotikumhaltigen (Ampicillin 50 µg/ml) LB-Kultur verwendet. Diese wurde über Nacht bei 37 °C und 220 Upm kultiviert.

Entsprechend der Menge der Übernachtskultur wurden die Plasmide anschließend entweder durch eine Minipräparation mit dem *GeneJet Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas) oder durch eine Midipräparation mit dem *Pure Yield Plasmid Midiprep System* (Promega, Madison, WI) nach Herstellerangaben isoliert.

Für die Amplifikation von Plasmiden, die den *SPPL2a*-ORF enthielten, wurden elektrokompetente *CopyCutter E. coli*s (2.1.2) verwendet. Nach Transformation und Erreichen einer Zelldichte von OD₆₀₀ 0,2 wurde 1 x *CopyCutter* Induktionslösung (Epicentre) zu der Kultur gegeben und die Bakterien für weitere 4 Stunden bei 37 °C und 220 Upm inkubiert. Um einen ausreichenden Luftaustausch in der Kultur zu ermöglichen, wurde die Inkubation in großen Reaktionsgefäßen durchgeführt. Danach erfolgte die Plasmidisolierung.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Zellkultur

2.2.2.1.1 Zellkulturbedingungen

1 x PBS

NaCl	137 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KCl	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM
pH	7,4

Die Arbeiten mit lebenden Säugerzelllinien erfolgten an der Sterilbank unter Berücksichtigung aller Vorgaben für steriles Arbeiten. Bei der Kultivierung von *Bone marrow derived*

dendritic cells (BMDCs) wurde außerdem darauf geachtet, Kontaminationen mit bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) zu vermeiden (gestopfte Spitzen, LPS-freie Lösungen). Alle Kultivierungen und Inkubationen wurden in einem Begasungsbrutschrank bei 37 °C, 5 %iger CO₂- und gesättigter Wasserdampfatosphäre durchgeführt.

MEF, HeLa, und HEK293 Zellen wurden in DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's Medium High Glucose* mit L-Glutamin; PAA, Cölbe, Germany) mit 10 % (v/v) FCS (*fetal calf serum*, fetales Kälberserum; PAA), 100 Units/ml Penicillin (PAA) und 100 µg/ml Streptomycin (PAA) kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml Accutase (PAA) auf die Zellen gegeben und die Schale für 10-15 Minuten im Brutschrank inkubiert, um die Zellen zu lösen. Um die Enzymreaktion zu stoppen, wurden 9 ml Kulturmedium dazugegeben, die Zellen darin resuspendiert und in einer geeigneten Verdünnung wieder ausgesät.

2.2.2.1.2 Einfrieren von Zellen zur Lagerung

Einfriermedium

FCS 20 % (v/v)

DMSO 10 % (v/v)

In vollständigem Zellkulturmedium (2.2.2.1.1)

Die einzufrierenden Zellen wurden in 10 cm Schalen kultiviert (2.2.2.1.1). Nach Erreichen einer etwa 80 %igen Konfluenz wurden die Zellen mit Accutase abgelöst (2.2.2.1.1) und wieder in Zellkulturmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde bei 210 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 10 ml Einfriermedium resuspendiert und auf 2 ml Schraubdeckelröhrchen verteilt. Nach einer 5 minütigen Abkühlphase auf Eis wurden die Zellen für mindestens 12 Stunden in Styroporbehältern bei -80 °C gelagert und im Anschluss für die langfristige Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.2.1.3 Auftauen von Zellen

Die aufzutauende Zellprobe (2.2.2.1.2) wurde aus dem flüssigen Stickstoff genommen, bei Raumtemperatur antauen gelassen und unter der Sterilbank kurz geöffnet, um möglicherweise eingedrungenen flüssigen Stickstoff entweichen zu lassen. Anschließend wurde die Probe im

37 °C Wasserbad so lange aufgetaut, bis nur noch ein kleines Eisstück übrig war. Die Zellen wurden dann sofort in 5 ml vorgewärmtes Zellkulturmedium (2.2.2.1.1) überführt, resuspendiert und bei 210 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Zellkulturmedium durch Resuspendieren und erneutes Zentrifugieren gewaschen, in 10 ml Zellkulturmedium gelöst und auf einer 10 cm Schale ausplattiert.

2.2.2.1.4 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahlen wurden die Zählkammern *C-Chips Neubauer Improved* (PAA) verwendet. Hierfür wurden die Zellen in geeigneter Verdünnung eingesetzt. Tote Zellen wurden zuvor mit dem Farbstoff Trypanblau (0,4 %, Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA) in einer 1:2 Verdünnung angefärbt. Die Durchführung erfolgte nach Beschreibung des Herstellers.

2.2.2.2 Isolierung und Kultivierung von murinen Zellen

2.2.2.2.1 Gewinnung embryonaler Mausfibroblasten

Murine embryonale Fibroblasten wurden von 13,5 Tage alten *SPPL2b^{-/-}* Embryonen und entsprechenden Wildtyp-Kontrollen isoliert (2.1.3). Hierfür wurde der Embryosack mit Hilfe steriler Pinzetten geöffnet und der Embryo in frisches PBS (2.2.2.1.1) überführt. Die fetalen Organe wurden entfernt und der Kopf abgetrennt und für die anschließende Genotypisierung (2.2.1.1, 2.2.1.6.1) verwendet. Anschließend wurden die Embryonen in PBS gewaschen, unter sterilen Bedingungen in 2 ml Trypsin-EDTA (PAA) zerkleinert und für 15 Minuten bei 37 °C unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Gewebestücke wurden im Anschluss durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert und in ein 15 ml Röhrchen mit 12 ml vorgewärmtem Kulturmedium (2.2.2.1.1) überführt. Die Zellen wurden für 3 Minuten bei 200 x g sedimentiert, in 10 ml frischem Medium resuspendiert und in einer 10 cm Schale kultiviert. In einer frühen Passage wurden die Zellen durch Transfektion (2.2.2.3) mit einem Expressions-Plasmid des *SV40 large T antigen* (pMSSVLT) immortalisiert (Tab. 2.2), (Schuermann 1990).

2.2.2.2.2 Gewinnung von Einzelzellsuspensionen aus murinen Geweben

Zur Isolierung von Zellen aus dem roten Knochenmark wurden Tibia und Femur der Mäuse unter Verwendung einer 27G-Kanüle (BD Biosciences, Heidelberg) mit kaltem PBS (PAA) gespült. Die Knochenmarkzellen wurden zur Vereinzelnung durch ein 100 µm Zellsieb (BD Biosciences) gefiltert.

Für die Generierung einer Einzelzellsuspension aus der Milz, dem Thymus oder den Lymphknoten wurde das jeweilige Organ zerschnitten und unter Zugabe von PBS einmal (Lymphknoten) beziehungsweise zweimal (Milz, Thymus) mit einem Spritzenstempel vorsichtig durch ein 100 µm Zellsieb gedrückt.

Peritonealzellen wurden isoliert, indem 7 ml PBS in den Bauchraum der Maus injiziert und die Zellen durch leichtes Massieren des Bauches gelöst wurden. Anschließend wurde der Puffer mit den darin enthaltenen Zellen mit der Spritze wieder aufgenommen und gesammelt.

2.2.2.2.3 Gewinnung von *Bone marrow derived dendritic cells* (BMDCs)

Kulturmedium für dendritische Zellen (DC-Medium)

RPMI-1640 mit L-Glutamin (PAA) versetzt mit:

FCS	10 % (v/v)
2-Mercaptoethanol (Gibco/Invitrogen)	50 µM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml

BMDCs wurden mit einigen Modifikationen nach dem Protokoll (Lutz *et al.* 1999) kultiviert. Hierfür wurden Zellen aus dem roten Knochenmark isoliert (2.2.2.2.2), für 10 Minuten bei 210 x g zentrifugiert und in Kulturmedium für dendritische Zellen resuspendiert. Anschließend wurden sie mit einer Dichte von 5×10^6 Zellen in 10 ml Medium mit 20 ng/ml murinem *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (mGM-CSF, Immunotools, Friesoythe) in einer 10 cm Kulturschale für Suspensionszellen ausplattiert. Drei Tage später wurden 10 ml DC-Medium mit 20 ng/ml mGM-CSF dazugegeben. An Tag 6 nach der Zellisolierung wurden 10 ml des Mediums abgenommen, die darin enthaltenen Zellen sedimentiert (220 x g, 10 Minuten), in 10 ml frischem DC-Medium mit 10 ng/ml mGM-CSF resuspendiert und wieder auf die Zellen gegeben. Ab Tag 8 wurden die BMDCs für weitere Experimente verwendet und entweder durch die Zugabe von 1 µg/ml *E.coli*-Lipopolysaccharid (L8274, Sigma-Aldrich)

für 24 Stunden stimuliert oder unstimuliert gelassen. Für alle Analysen wurden die adhärennten Zellen durch Accutase (PAA) abgelöst und mit den Suspensionszellen vereinigt.

2.2.2.2.4 Isolierung von B-Zellen

MACS-Puffer

EDTA	2 mM
BSA (Albumin Fraktion V, proteasefrei, Carl Roth)	0,5 % (w/v)

gelöst in 1 x PBS (2.2.2.1.1)

Zunächst wurden Einzelzellsuspensionen aus der murinen Milz gewonnen (2.2.2.2.2). Hieraus wurden IgM⁺ oder B220⁺ B-Zellen ohne vorherige Lyse der Erythrozyten durch Positiv-Selektion unter Verwendung von anti-Maus IgM beziehungsweise anti-Maus B220 *MicroBeads* und den LS Säulen des *MACS[®] Cell Separation Systems* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) isoliert. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben mit einigen Modifikationen. Die Zellen einer Wildtyp-, *CD74^{-/-}* oder *SPPL2a^{-/-} CD74^{-/-}* Milz beziehungsweise von zwei Milzen *SPPL2a*-defizienter Mäuse (2.1.3) wurden in 270 µl MACS-Puffer resuspendiert, mit 30 µl anti-Maus IgM oder B220 *MicroBeads* versetzt und 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden 10 ml MACS-Puffer dazu gegeben, die Zellen für 10 Minuten bei 210 x g zentrifugiert und in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Danach erfolgte die Aufreinigung der B-Zellen über die Säule. Die Reinheit der isolierten Zellen wurde im Anschluss durchflusszytometrisch mittels eines Antikörpers gegen B220 (CD45R), (2.2.2.4) untersucht und lag in der Regel zwischen 80 % und 90 %.

Für die Isolierung verschiedener B-Zell-Populationen der murinen Milz (T1, T2 und mature B-Zellen) wurden zunächst B220⁺ B-Zellen gewonnen. Diese wurden anschließend mit Antikörpern gegen B220, CD21 und CD24 (2.2.2.4) inkubiert und mit Hilfe von Durchflusszytometrie sortiert und isoliert (2.2.2.4). Als Puffer wurde sowohl für die Isolierung der B220⁺ Zellen als auch für die Durchflusszytometrie MACS-Puffer verwendet. Die durchflusszytometrische Zellsortierung erfolgte in Kooperation mit Hans-Heinrich Oberg und Sandra Ussat (Immunologisches Institut, CAU Kiel) an einem FACSaria I (BD Biosciences).

2.2.2.3 Transfektion von Zellen

Für die transiente Transfektion von HEKs und HeLa-Zellen wurde Turbofect (Fermentas) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers mit leichten Modifikationen bei semikonfluentem Wachstum. Für eine 10 cm Schale HEK293 oder HeLa Zellen wurden 2.5 µg DNA und 5 µl Turbofect in 250 µl DMEM (2.2.2.11) gegeben und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt. Nach einer 20 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden 800 µl Medium aus der zu transfizierenden Schale entnommen, mit dem Transfektionsansatz vermischt und tröpfchenweise auf den Zellen verteilt. Um die Zytotoxizität zu mindern, wurde 6 Stunden nach der Transfektion ein Mediumwechsel durchgeführt. Je nach Versuch erfolgte die Ablösung oder Fixierung der HEK293, oder HeLa Zellen für Folgeexperimente 24 bis 48 Stunden nach der Transfektion.

2.2.2.4 Durchflusszytometrie (*Fluorescence-activated cell sorting*, FACS)

FACS-Puffer

FCS	2 % (v/v)
NaN ₃	0,1 % (w/v)
EDTA	2 mM

gelöst in 1 x PBS (2.2.2.1.1)

pH 7,4

Erylysepuffer

NH ₄ Cl	155 mM
KHCO ₃	10 mM
EDTA	0,1 mM

Nach Herstellung einer Einzelzellsuspension des zu untersuchenden Gewebes (2.2.2.2.2) erfolgte die Lyse der Erythrozyten durch 12-minütige Inkubation in Erylysepuffer bei Raumtemperatur.

Die Zellsuspensionen (5×10^5 Zellen/100 µl FACS-Puffer) wurden mit den jeweiligen Antikörpern für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Es wurden folgende FITC-, PE-, PE/Cy5-, PE/Cy7- oder APC-konjugierte, murine Antikörper in einer 1:100 Verdünnung verwendet (Ausnahme: anti-CD24 M1/69, 1:200 verdünnt):

Tab. 2.16: Für die Durchflusszytometrie verwendete Fluorochrom-konjugierte Primärantikörper.

Antikörper	Herkunft
anti-CD3 (145-2C11)	eBioscience (San Diego, CA)
anti-CD4 (GK1.5)	eBioscience
anti-CD11c (N418)	eBioscience
anti-CD21/CD35 (8D9)	eBioscience
anti-CD45R (RA3-6B2)	eBioscience
anti-CD268 (BAFF-R, 7H22-E16)	eBioscience
anti-CD4 (PJP6)	Immunotools (Friesoythe)
anti-CD8a (YTS 169.4)	Immunotools
anti-CD19 (PeCa1)	Immunotools
anti-CD11b (M1/70)	BD Biosciences (Heidelberg)
anti-CD21/CD35 (7G6)	BD Biosciences
anti-CD117 (Ckit, 2B8)	BD Biosciences
anti-IgD (11-26c.2a)	BD Biosciences
anti-IgM (R6-60.2)	BD Biosciences
anti-Gr-1 (RB6-8C5)	BD Biosciences
anti-CD3 (17A2)	Biologend (San Diego, CA)
anti-CD4 (RM4-5)	Biologend
anti-CD8a (53-6.7)	Biologend
anti-CD23 (B3B4)	Biologend
anti-CD24 (M1/69)	Biologend
anti-CD49b (DX5)	Biologend
anti-F4/80 (CI:A3-1)	AbD Serotec (Düsseldorf)
anti-ST2 (DJ8)	mdBiosciences (Zürich, Schweiz)

Nach dem Waschen mit 200 µl FACS-Puffer wurden die gefärbten Zellen in 0,5 µg/ml Propidiumiodid (BD Biosciences) resuspendiert, um die toten Zellen anzufärben (PI⁺).

Die Messungen wurden mit Hilfe eines *FACSCanto* Durchflusszytometers (BD Biosciences) durchgeführt, die Daten unter Verwendung der *FACSDiva* (BD Biosciences) oder *FlowJo Software* (Tree Star Inc., Ashland, OR) ausgewertet.

2.2.2.5 Untersuchung des Ca²⁺ Flusses nach B-Zell-Rezeptorstimulation

Kreb's Ringer Lösung

NaCl	140 mM
HEPES	10 mM, pH 7,0
Glukose	10 mM
KCl	4 mM
MgCl ₂	1 mM
CaCl ₂	1 mM
EGTA	0,5 mM

Die Untersuchung der intrazellulären Ca²⁺ Konzentration nach B-Zell-Rezeptorstimulation erfolgte durch Dr. Michael Engelke und Dr. Kai Dittmann (Abteilung Zelluläre und Moleku-

lare Immunologie, Georg-August-Universität Göttingen). Hierfür wurden Splenozyten mit anti-CD45R- (B220-) PE-Cy7 (RA3-6B2), anti-CD21/CD35-FITC (7G6) und anti-CD24-PE (M1/69) (alle von BD Biosciences) gefärbt und für 25 Minuten bei 30 °C mit 1 μ M Indo-1-AM (Molecular Probes, Invitrogen) in RPMI-1640 mit L-Glutamin (PAA) mit 5 % (v/v) FCS (PAA) und 0,015 % Pluronic F127 (Molecular Probes, Invitrogen) bei leichtem Schwenken inkubiert. Die Zellen wurden 1:2 in RPMI mit 10 % (v/v) FCS verdünnt und für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in Krebs' s Ringer Lösung gewaschen, abzentrifugiert und wieder in Krebs' s Ringer Lösung resuspendiert. Nachdem die basalen Ca^{2+} Spiegel gemessen wurden, wurden die Zellen mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Ziege-anti-Maus IgM F(ab')₂ Fragmenten (Dianova, Hamburg) stimuliert. Nach 6 Minuten wurde CaCl_2 zu dem Zellkulturmedium gegeben, um die extrazelluläre Ca^{2+} Konzentration auf 1 mM einzustellen. Das Verhältnis der Fluoreszenz von Ca^{2+} gebundenem Indo-1 (405 nm) zu Ca^{2+} ungebundenem Indo-1 (530 nm) in T1 B-Zellen ($\text{B220}^+ \text{CD21}^{+/-} \text{CD24}^{++}$) wurde mit einem *LSRII* Durchflusszytometer (BD Biosciences) analysiert und die Daten wurden mit *FlowJo* (Tree Star Inc.) ausgewertet.

2.2.3 Immunisierung

Die T-Zell-unabhängige Immunantwort wurde durch intraperitoneale Immunisierung mit TNP-AECM-Ficoll (Biosearch Technologies, Novato, CA) untersucht. Hierfür wurde an Tag 0 Blut aus der Schwanzvene (Heparinblut) der Mäuse entnommen. Anschließend erfolgte die Immunisierung mit 100 μg TNP-Ficoll gelöst in 100 μl PBS (2.2.2.1.1). An Tag 14 wurden die Mäuse getötet und das Blut auf TNP-spezifische Antikörper untersucht (2.2.5.8.2).

Für die Untersuchung der T-Zell-abhängigen Immunantwort wurde den Mäusen Blut aus der Schwanzvene entnommen. Danach erfolgte die intraperitoneale Immunisierung mit 100 μg TNP-KLH (Biosearch Technologies) in PBS mit 50 % (v/v) komplettem Freund's Adjuvans (Sigma-Aldrich) in einem Endvolumen von 100 μl . An Tag 14 erfolgte eine *Booster*-Immunisierung mit 100 μg TNP-KLH in 100 μl PBS mit 50 % (v/v) inkomplettem Freund's Adjuvans (Sigma-Aldrich). An Tag 28 wurden die Mäuse getötet und das Blut auf TNP-spezifische Antikörper untersucht (2.2.5.8.2).

2.2.4 Knochenmarktransplantation

Die Knochenmarktransplantationen und die Auswertung der Ergebnisse wurden von Prof. Dr. Ralf Dressel, Dr. Michael Engelke und Dr. Kai Dittmann (Abteilung Zelluläre und Molekulare Immunologie, Georg-August-Universität Göttingen) durchgeführt. Knochenmarkszelluspensionen wurden aus *SPPL2a^{+/+}* und *SPPL2a^{-/-}* Mäusen (2.1.3) gewonnen (2.2.2.2) und intravenös in bestrahlte (9 Gy) *Rag2^{-/-} cyc^{-/-}* Mäuse (2.1.3) injiziert. Zehn Wochen nach der Transplantation wurde der Versuch beendet und die Immunzellzusammensetzung der lymphatischen Organe durchflusszytometrisch (2.2.2.4) analysiert. Die Bestrahlung der Mäuse fand in der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie (Universitätsmedizin Göttingen) durch Dr. Markus Herrmann statt.

2.2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.2.5.1 Proteinisolierung aus Zellen

PBS/Complete

Complete Stammlösung: 1 Tablette in 2 ml ddH₂O gelöst, Roche Applied Science, Mannheim gelöst in 1 x PBS (2.2.2.1.1)

Lysispuffer

NaCl	150 mM
Tris-HCl	50 mM, pH 7,4
Triton X-100	1 % (w/v)
SDS	0,1 % (w/v)
Complete Stammlösung	4 % (v/v)
Pepstatin A (Sigma-Aldrich)	0,1 % (w/v)
Pefabloc® SC-Protease-Inhibitor (Carl Roth)	4 mM
EDTA	4 mM

gelöst in 1 x PBS

Adhärente Zellen wurden zunächst auf Eis gekühlt und zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml PBS/Complete mit einem Zellschaber (Sarstedt, Nümbrecht) von der Schale abgelöst und für 5 Minuten bei 4 °C und 1000 x g sedimentiert.

Suspensionszellen wurden für 5 Minuten bei 4 °C und 210 x g sedimentiert und zweimal mit kaltem PBS/Complete gewaschen.

Anschließend wurden die Zellen in 40-100 µl Lysispuffer (abhängig von der Zellmenge) resuspendiert, sonifiziert (Level 4 für 20 Sekunden bei 4 °C, Branson Sonifier 450, Emerson Industrial Automation, Danbury, CT) und für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Die Proteinlysate wurden durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 15000 x g von Zelltrümmern befreit und die Proteinkonzentration bestimmt (2.2.5.2).

2.2.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

2.2.5.2.1 BCA-Assay

Die Proteinkonzentration wurde in der Regel unter Verwendung des *Bicinchoninic acid (BCA) Protein Assay Kit* (Thermo Scientific, Rockford, IL, (Smith *et al.* 1985)) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Für die Erstellung einer Eichgeraden wurde ein Albuminstandard (Pierce, Rockford, IL) in Konzentrationen von 0 bis 2 µg/ml verwendet. Die Bestimmung der Absorption bei 562 nm erfolgte unter Verwendung des *Synergy HT* (BioTek) und diente zur Berechnung der Proteinkonzentration basierend auf dem Lambert-Beerschen Gesetz.

2.2.5.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Coomassie-Färbelösung

20 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 (Carl Roth) wurden in 25 ml 96 % EtOH gelöst

Zugabe von 50 ml o-Phosphorsäure 85 % (v/v)

ad 500 ml mit ddH₂O

filtriert durch Faltenfilter

Lagerung 4 °C und lichtgeschützt

Bei sehr geringen Proteinkonzentrationen, beispielsweise nach Proteinisolierung aus Kernextrakten (2.2.5.8.3) wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt (Bradford 1976). Bei der Reaktion des Farbstoffes Coomassie-Blau mit basischen Aminosäuren kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums zu 595 nm. Die Proteinkonzentration kann daher durch Ermittlung der Extinktion bei dieser Wellenlänge berechnet werden. Als Standardreihe für die Eichung wurde Albumin (Pierce) in geeigneten Konzentrationen (0-0,5

mg/ml) verwendet. Für die Messung wurden 20 µl Probe in geeigneter Verdünnung beziehungsweise Standardlösung mit 200 µl Coomassie-Färbelösung versetzt und 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm mit Hilfe des *Synergy HT* (BioTek) gemessen. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte durch das Gerät basierend auf dem Lambert-Beerschen Gesetz.

2.2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

2.2.5.3.1 Glycin-SDS-PAGE (Laemmli-SDS-PAGE)

<u>5 x SDS-Ladepuffer</u>		<u>10 x SDS-Elektrodenpuffer</u>	
Tris HCl pH 6,8	625 mM	Glycin	1,93 M
DTT	500 mM	Tris	250 mM
Glycerin	50 % (v/v)	SDS	35 mM
SDS	5 % (w/v)		
 <u>Sammelgelpuffer</u>		 <u>Trenngelpuffer</u>	
Tris	0,5 M	Tris	1,5 M
SDS	0,4 % (w/v)	SDS	0,4 % (w/v)
pH 6,8		pH 8,8	

Die größenabhängige Auftrennung von Proteinen erfolgte in der Regel durch Glycin-SDS-PAGE (Laemmli 1970). Hierfür wurden 10-20 µg Proteinprobe mit reduzierendem SDS-Ladepuffer versetzt und für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. War das anschließende Ziel des Versuches die Detektion von murinem Sppl2a oder Sppl2b, wurde dieser Schritt durch eine 10 minütige Erwärmung auf 55 °C ersetzt, da Transmembranproteine des Typs III (multiple Transmembrandomänen) beim Aufkochen zum Aggregieren neigen. Je nach Größe des zu untersuchenden Proteins wurden Gele mit einem Anteil von 10 oder 12,5 % Acrylamid verwendet. Die Gele hatten eine Dicke von 1,5 mm.

Trenn- und Sammelgel wurden wie folgt zusammenpipettiert:

Tab. 2.17: Pipettierschema für Glycin-SDS-Polyacrylamidgele.

Stammlösung	Sammelgel 4,5 %	Trenngel 10 %	Trenngel 12,5 %
Acrylamidstammlösung (Rotiphorese® Gel 30 (37, 5:1), Carl Roth)	1,75 ml	3,3 ml	4,2 ml
Sammelgelpuffer	1,35 ml	/	/
Trenngelpuffer	/	2,6 ml	2,6 ml
ddH ₂ O	6,85 ml	4,0 ml	3,1 ml
Ammoniumperoxodisulfat (APS, Carl Roth) 10 % (w/v) in ddH ₂ O	60 µl	60 µl	60 µl
TEMED (Carl Roth)	30 µl	30 µl	30 µl

Molekulargewichtsmarker der Firma Fermentas wurden für die Bestimmung des Molekulargewichts verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1 x SDS-Elektrodenpuffer bei 80-120 V mit Hilfe des *Mini-Protean Elektrophorese-Systems* (BioRad).

2.2.5.3.2 Tricin-SDS-PAGE

3 x Gel-Puffer

Tris 3 M
HCl 1 M
SDS 0,3 % (w/v)
pH 8,45

2 x Reduzierender Probenpuffer

Tris/HCl, pH 6,8 75 mM
DTT 20 mM
Glycerin 20 % (v/v)
SDS 2 % (w/v)
Coomassie Blue G-250 0,05 % (w/v)

10 x Anodenpuffer

Tris 1 M
HCl 0,225 M
pH 8,9

10 x Kathodenpuffer

Tris 1 M
Tricin 1 M
SDS 1 % (w/v)
pH 8,25 (nicht eingestellt)

Um eine bessere Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht unter 30 kDa zu erreichen, wurde eine Tricin-SDS-PAGE durchgeführt (Schagger 2006). Hierfür wurde ein Trenngel mit T=16 % und C=6 % mit 6 M Urea verwendet (Tab. 2.18).

Es wurden 10-20 µg Proteinprobe in einem maximalen Volumen von 10 µl mit reduzierendem Probenpuffer versetzt, erhitzt wie unter 2.2.5.3.1 beschrieben und in die Geltaschen pipettiert. Als Molekulargewichtsmarker wurde der *Spectra™ Multicolor Low Range Protein*

Ladder (Fermentas) verwendet. Die Gele hatten eine Dicke von 1,5 mm und setzten sich zusammen aus dem Trenngel, dem intermediären Gel (etwa 0,5 cm breit) und dem Sammelgel (etwa 1 cm breit).

Trenn-, intermediäres und Sammelgel wurden wie folgt zusammenpipettiert:

Tab. 2.18: Pipettierschema für Tricin-SDS-Polyacrylamidgele.

Stammlösung	Sammelgel 4 %	intermediäres Gel 10 %	Trenngel 16 %/6 M Urea
50 % Acrylamidstammlösung (16, 6:1)	/	/	3,29 ml
30 % Acrylamidstammlösung (37, 5:1)	1,37 ml	3,18 ml	/
2 % Bisacrylamid	91 µl	261 µl	328 µl
Gelpuffer (3 x)	2,5 ml	3,33 ml	3,33 ml
Glycerin	/	1 g	/
Urea	/	/	3,6 g
ddH ₂ O	ad 10 ml	ad 10 ml	ad 10 ml
Ammoniumperoxidisulfat (APS, Carl Roth) 10 % (w/v) in ddH ₂ O	75 µl	50 µl	33,3 µl
TEMED (Carl Roth)	7,5 µl	10 µl	10 µl

Für die Elektrophorese (*Mini-Protean Elektrophorese-Systems*, BioRad) wurde die Kammer der unteren Elektrode (Anode) mit Anodenpuffer und die der oberen Elektrode (Kathode) mit Kathodenpuffer befüllt. Bis zum Erreichen des Trenngels wurde die Auftrennung bei 30 V durchgeführt. Anschließend wurde die Spannung auf 80 V erhöht.

2.2.5.4 Western blot

2.2.5.4.1 Western blot von Glycin-SDS-Gelen

Transferpuffer

Glycin	192 mM
Tris	25 mM
Methanol	20 % (v/v)

Der Transfer von Proteinen, welche zuvor durch Glycin-SDS-PAGE aufgetrennt wurden (2.2.5.3.1), auf eine Membran (*Western blot*) erfolgte mit Hilfe des *Semi-dry Blot*-Verfahrens unter Verwendung der *Blot*-Apparatur *Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell* (BioRad). Hierfür wurde das Trenngel zunächst in Transferpuffer überführt. Die Membran (Whatman

Protran Nitrocellulose Transfer Membran, Porengröße 0,2 μm , Whatman GmbH, Dassel), sowie 4 Lagen Filterpapier (Gel *blotting* Papier, Whatman GmbH) wurden auf die Gelgröße zugeschnitten und in Transferpuffer getränkt. Anschließend wurde die *Blot*-Apparatur wie folgt zusammengebaut:

- Anode
- Zwei Lagen Filterpapier
- Nitrocellulosemembran
- Gel
- Zwei Lagen Filterpapier
- Kathode

Der Transfer erfolgte bei 1,2 mA/cm^2 für 1 Stunde 45 Minuten. Um den Proteintransfer zu überprüfen, wurde im Anschluss eine Ponceau-Färbung (2.2.5.5) durchgeführt.

2.2.5.4.2 *Western blot* von Tricin-SDS-Gelen

Elektrodenpuffer

Tris 300 mM

Essigsäure 100 mM

pH 8,6 (nicht eingestellt)

Für den Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen aus einem Tricin-SDS-Gel (2.2.5.3.2) auf eine Membran wurde das *Semi-dry Blot*-Verfahren verwendet. Der Aufbau der Apparatur erfolgte wie in 2.2.5.4.1 beschrieben. Der Transfer erfolgte für 12-16 Stunden bei 0,37 mA/cm^2 und 4 °C in Elektrodenpuffer.

2.2.5.5 Ponceau-Färbung

Ponceau S Färbelösung

Essigsäure 5 % (v/v)

Ponceau S (Carl Roth) 0,1 % (w/v)

Die reversible Bindung des Azofarbstoffes Ponceau S an die Aminogruppen des Proteins wurde genutzt, um den Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran (2.2.5.4) zu überprüfen. Hierfür wurde die Membran für 1-2 Minuten in der Ponceau-Lösung geschwenkt und anschließend mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen, bis die Proteinbanden deutlich erkennbar waren. Danach konnte der *Blot* uneingeschränkt für die weiteren Analysen verwendet werden.

2.2.5.6 Proteindetektion auf *Western blots*

<u>1 x TBST</u>		<u>Blockierlösung</u>
NaCl	137 mM	5 % Milchpulver (w/v) in 1 x TBST
Tris	25 mM	
KCl	2,7 mM	
Tween 20	0,1 % (v/v)	

Für die Proteindetektion auf *Western blots* wurde die Membran zunächst für 1 Stunde bei Raumtemperatur in Blockierlösung geschwenkt, um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu minimieren. Anschließend erfolgte die Bindung des primären Antikörpers an sein Epitop. Hierfür wurde eine geeignete Verdünnung des Antikörpers (Tabelle 2.19) in Blockierlösung angesetzt und die Membran für die angegebene Zeit in dieser inkubiert.

Der Antikörper für die Detektion von SPPL2a wurde im Kaninchen gegen ein synthetisches Peptid von 19 Aminosäuren (aa 77-94, CHLSDIPPDGIRNKAVVVH) des luminalen, N-terminalen Endes der Protease generiert (Tab. 2.19). Der SPPL2b Antikörper wurde ebenfalls im Kaninchen gegen das C-terminale Peptid NGDEAQPIPVVKPETSA (aa 562-578) generiert (Tab. 2.19). Die Aufreinigung der Antikörper aus den Immunsereen erfolgte durch Affinitätschromatografie.

Tab. 2.19: Verwendete Primärantikörper für die Detektion von Proteinen im *Western blot*.

Antikörper	Herkunft	erzeugt in	Verwendung
Anti-mCD74 (In-1)	BD Biosciences, Heidelberg	Ratte, monoklonal	1:15000, 1 h RT
Anti-mSPPL2a	Pineda, Berlin (siehe Text)	Kaninchen, polyklonal	1:1000, 4 °C ü.N.
Anti-mSPPL2b	Pineda (siehe Text)	Kaninchen, polyklonal	1:200, 1 h 37 °C
Anti-mBcl2 (Poly6119)	BioLegend, San Diego, CA	Kaninchen, polyklonal	1:500, 4 °C ü.N.
Anti-mNF-κB2 p100/p52 (#4882)	Cell Signaling Technology®	Kaninchen, polyklonal	1:1000, 4 °C ü.N.
Anti-mMHCII (M5/114.15.2)	eBioscience, San Diego, CA	Ratte, monoklonal	1:1000, 4 °C ü.N.
Anti-GAPDH (FL-335), (h, m)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	Kaninchen, polyklonal	1:2500
Anti-Aktin (A2066), (h, m)	Sigma-Aldrich	Kaninchen, polyklonal	1:2500

Im Anschluss wurde die Membran dreimal 10 Minuten in Waschpuffer geschwenkt. Die *Horseradish peroxidase*- (HRP-) gekoppelten Sekundärantikörper Ziege-anti-Kaninchen-IgG und Ziege-anti-Ratte-IgG (Dianova) wurden in einer Verdünnung von 1:15000 verwendet. Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Überschüssiger Sekundärantikörper wurde durch dreimal 10 minütiges Waschen in Waschpuffer entfernt. Die HRP-Aktivität des gebundenen Sekundärantikörpers wurde mit Hilfe des *Amersham ECL Advance Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) und dem *ImageQuant Las 4000* (GE Healthcare, München) detektiert.

2.2.5.7 *Strippen von Western blots*

Das *Strippen* von *Western blots* (2.2.5.4) dient der Entfernung von gebundenem Antikörper (2.2.5.6), um eine erneute Detektion von Proteinen auf ein und demselben *Blot* zu ermöglichen. Je nachdem, wie stark die Bindung des zu entfernenden Antikörpers an sein Epitop war, kamen zwei verschiedene *Stripping*-Verfahren zum Einsatz.

Stripping-Puffer bei schwacher Bindung

Glycin 100 mM
 KCl 50 mM
 Mg-Acetat 20 mM
 pH 2,2

Die Inkubation der Membran in diesem Puffer erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran für dreimal 10 Minuten in TBST (2.2.5.6) gewaschen.

Stripping-Puffer bei starker Bindung

Tris	62,5 mM
SDS	2 %
2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)	0,7 % (v/v)

Die Inkubation der Membran in diesem Puffer erfolgte für 30 Minuten bei 60 °C. Anschließend wurde die Membran so lange in TBST gewaschen, bis kein 2-Mercaptoethanol-Geruch mehr wahrgenommen werden konnte.

2.2.5.8 Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA)

2.2.5.8.1 Bestimmung der basalen Immunglobulinkonzentrationen im Plasma

Die isotypspezifische Bestimmung der basalen Immunglobulinkonzentrationen im murinen Plasma erfolgte in Kooperation mit Dr. Zane Orinska (Abteilung für Immunologie und Zellbiologie, Forschungszentrum Borstel) beziehungsweise Dr. Michael Engelke und Dr. Kai Dittmann (Abteilung Zelluläre und Molekulare Immunologie, Georg-August-Universität Göttingen). Hierfür wurden 96-well ELISA-Platten (Nunc, Thermo Scientific, Langenselbold) mit isotypspezifischen Antikörpern gegen murines IgG1 (A85-3), IgG2a (RII-89), IgG2b (R9-91), IgG3 (R2-38), IgA (C10-3) und IgM (CII-41) (alle von BD Biosciences) verdünnt in 50 mM Carbonatpuffer, pH 9,1 bei 4 °C über Nacht beschichtet. Am folgenden Tag wurden die Platten dreimal mit PBST (0,05 % (v/v) Tween 20 in 1 x PBS (2.2.2.1.1)) gewaschen und mit 1 % (w/v) BSA in PBST für 1 Stunde blockiert. Nach erneutem, dreimaligem Waschen wurden die Plasmaproben in Duplikaten mit geeigneter Verdünnung aufgetragen und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Platten gewaschen, wie zuvor beschrieben und für die isotypspezifische Detektion der Immunglobuline entweder mit biotinyliertem anti- κ (187.1) und anti- λ (R26-46) oder biotinyliertem anti-IgG1 (A85-1), anti-IgG2a (R19-15), anti-IgG2b (R12-3) oder anti-IgG3 (R40-82) (alle von BD Biosciences) für 3 Stunden inkubiert, dreimal gewaschen und mit HRP-gekoppeltem Streptavidin (Calbiochem) detektiert. Alternativ wurde das *Clonotyping System-HRP* (5300-05, Southern Biotech, Birmingham, AL) für die isotypspezifische Detektion der Immunglobuline nach Angaben des Herstellers verwendet. Für die Bestimmung der Immunglobulinkonzentrationen wurden aufgereinigte murine Immunglobuline (BD Biosciences) als Standard verwendet. Für die kalorimetrische Detektion wurden 100 μ l *BM Blue POD Substrate* (Roche Mannheim) je Probe verwendet. Die Absorp-

tion bei 450 nm wurde nach Zugabe von 50 μ l 1 M H₂SO₄ mit Hilfe des *Synergy HT* oder *Powerwave 340* (beide BioTek Instruments, Winooski, VT) gemessen.

2.2.5.8.2 Bestimmung der TNP-spezifischen Antikörper

Für die Bestimmung der TNP-spezifischen Antikörper wurden 96-well ELISA Platten (Nunc, Thermo Scientific, Langenselbold) mit 10 μ g/ml TNP-Ovalbumin (Biosearch Technologies) in PBS (2.2.2.1.1) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten dreimal 3 Minuten auf dem Schüttler (Stufe 6, Titramax 100, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach) mit PBST (2.2.5.8.1) gewaschen und mit 1 % (w/v) Casein in PBS blockiert. Anschließend wurden die Platten erneut dreimal 3 Minuten wie zuvor beschrieben gewaschen. Serumproben (2.2.3) in einer Verdünnung von 1:750 in Blockierpuffer wurden in Duplikaten auf die Platten gegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Platten wie beschrieben gewaschen und Isotyp-spezifische, HRP-gekoppelte Ziege-anti-Maus-Immunglobulin-Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 (5300-05, Southern Biotech, Birmingham, AL) für 1 Stunde bei Raumtemperatur dazu gegeben. Abschließend wurden die Platten viermal gewaschen und 100 μ l *BM Blue POD Substrate* (Roche, Mannheim) je Probe für die Detektion der Peroxidaseaktivität eingesetzt. Die Absorption bei 450 nm wurde nach Zugabe von jeweils 50 μ l 1 M H₂SO₄ mit Hilfe des *Synergy HT* (BioTek Instruments) gemessen.

2.2.5.8.3 Bestimmung der NF- κ B-Aktivität in Kernextrakten

Für die Untersuchung der NF- κ B-Aktivität in murinen IgM⁺ Zellen der Milz wurden die Zellen zunächst durch magnetische Zellsortierung isoliert (2.2.2.2.4). Anschließend wurde Protein aus den Zellkernen isoliert und die Menge des darin enthaltenen aktivierten p65, p50, p52 und RelB bestimmt. Sowohl für die Herstellung der Kernextrakte als auch für die Detektion von aktiviertem NF- κ B wurde das *TransAMTM NF κ B Family Kit* (Active Motif, Rixensart, Belgien) nach Angaben des Herstellers verwendet. Das Prinzip beruht auf der Bindung von aktiviertem NF- κ B an seine Konsensussequenz, welche zuvor an eine ELISA-Platte gekoppelt wurde. Gebundener Transkriptionsfaktor wurde anschließend durch die Zugabe von p65-, p50-, p52- oder RelB-spezifischer Antikörper, gefolgt durch die Zugabe von HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper detektiert. Die Intensität der Blaufärbung bei nachfolgender Inkubation mit 100 μ l der Entwicklungslösung gab Aufschluss über die HRP-Aktivität und

somit über die Menge des gebundenen Sekundärantikörpers. Nach Beendigung der Enzymreaktion durch Zugabe von 50 μ l der sauren Stopp-Lösung erfolgte ein Farbumschlag von blau nach gelb, der bei 450 nm quantifiziert werden konnte (Abb. 2.4). Die Messung der Absorption erfolgte mit Hilfe des *Synergy HT* (BioTek Instruments).

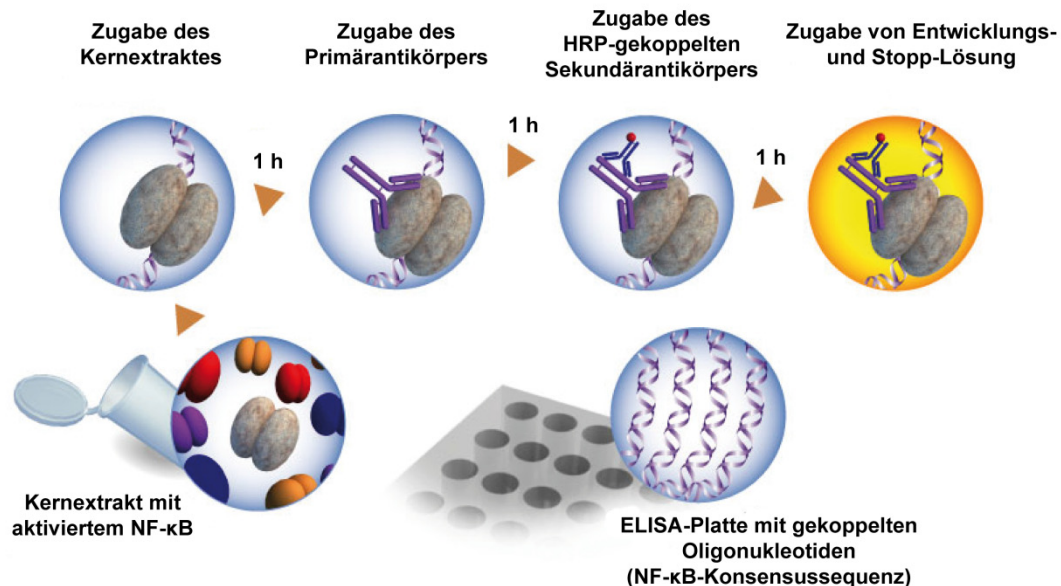


Abb. 2.4: Darstellung der Detektion von aktiviertem NF- κ B (Abbildung modifiziert aus Datenblatt des Herstellers). Der Kernextrakt mit aktiviertem NF- κ B wird auf ELISA-Platten mit gekoppelter NF- κ B-Konsensussequenz gegeben. Gebundenes aktiviertes NF- κ B wird durch p50-, p52-, p65- und RelB-spezifische Antikörper erkannt und gebunden. HRP-gekoppelter Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper und kann durch Zugabe von Entwicklungs- und Stopp-Lösung nachgewiesen werden.

2.2.6 Mikroskopische Methoden

2.2.6.1 Immunfluoreszenz

PFA-Fixierlösung

4 % (w/v) Paraformaldehyd (PFA, Fluka, Buchs, Schweiz) in 1 x PBS (2.2.2.1.1) bei 80 °C lösen
pH 7,4

Dabco-Stammlösung

200 mg/ml Diazobicyclooctan (Sigma-Aldrich) in 1 x PBS lösen
Aufbewahrung bei -20 °C

Mowiol-Stammlösung

10 g Mowiol (4-88 Reagent, Calbiochem, LaJolla, CA) in 40 ml 1 x PBS lösen

24 Stunden bei Raumtemperatur rühren

Zugabe von 20 ml 10 % Glycerin

24 Stunden bei Raumtemperatur rühren

pH 6-7

15 Minuten bei 11.000 x g zentrifugieren

Dabco/Mowiol/(DAPI)

Mowiol-Stammlösung 1 ml

Dabco-Stammlösung 0,1 ml

(1 mg/ml DAPI (Sigma-Aldrich) in 1 x PBS 1 µl)

Die Zellen (2.1.4) wurden auf runden Deckgläschen mit einem Durchmesser von 13 mm (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim) ausgesät, gegebenenfalls transfiziert (2.2.2.3) und bis zur gewünschten Konfluenz kultiviert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und schließlich für 20 Minuten bei Raumtemperatur in PFA-Fixierlösung inkubiert. Dabei binden die freien Aldehydgruppen des PFAs an freie Aminogruppen der Proteine. Danach wurden die Coverslips erneut dreimal mit PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellen wurden 0,2 % (v/v) Saponin in PBS für 5 Minuten auf die Zellen gegeben. Es folgte eine 10-minütige Inkubation mit 0,12 % (w/v) Glycin in PBS/0,2 % Saponin. Anschließend wurden die Coverslips mit PBS/0,2 % Saponin gewaschen.

Das Blockieren wurde für mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 10 % (v/v) FCS in PBS/0,2 % Saponin durchgeführt. Danach wurden 50 µl des Primärantikörpers in geeigneter Verdünnung (Tab. 2.20) auf Parafilm „M“ (Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI) in einer feuchten Kammer vorgelegt, der Coverslip darauf mit den Zellen nach unten platziert und für die angegebene Dauer inkubiert. Um die Zellen von überschüssigem ungebundenem Primärantikörper zu befreien, wurden die Coverslips der Reihe nach in fünf Bechergläser mit PBS/0,2 % Saponin eingetaucht, und auf 50 µl Sekundärantikörper in geeigneter Verdünnung (Tab. 2.20) gelegt. Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer lichtundurchlässigen feuchten Kammer. Schließlich wurden die Coverslips erneut gewaschen wie oben beschrieben. Zusätzlich wurden sie kurz in destilliertem Wasser gespült und im Anschluss mit 15 µl Dabco/Mowiol/(DAPI) auf Objektträger gezogen. Die optische Auswertung

erfolgte mit Hilfe des Mikroskops *Axiovert 200M* (Carl Zeiss, Jena) und der *Axio Vision 4.1 beta Version 08.2003 Software*. Die folgenden Filter wurden für die Betrachtung der verschiedenen Farben verwendet:

Alexa-Fluor 488-Fluoreszenz	BP485/20 und BP515-565
Alexa-Fluor 594-Fluoreszenz	BP565/30 und BP620/60
DAPI-Fluoreszenz	G365 und BP445/59

Tab. 2.20: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzen.

Primärantikörper	Herkunft	erzeugt in	Verwendung
Anti-c-Myc (C-19), (m, h)	Santa Cruz, Santa Cruz, CA	Kaninchen	1:500, 2 h RT oder 4 °C ü.N.
Anti-hLAMP2 (2D5)	Andrej Hasilik (Institut für Physiologische Chemie, Philipps-Universität Marburg, (Radons <i>et al.</i> 1992)	Maus	1:500, 2 h RT oder 4 °C ü.N.
Sekundärantikörper			
Alexa Fluor 594 Ziege-anti-Kaninchen-IgG (H+L), (A-11072)	Molecular Probes, Eugene, OR	Ziege	1:300, 1 h RT
Alexa Fluor 488 Ziege-anti-Maus-IgG (H+L), (A-11029)	Molecular Probes, Eugene, OR	Ziege	1:300, 1 h RT

Die Verwendung eines ApoTomes (Carl Zeiss) ermöglichte die Erstellung überstrahlungsfreier optischer Schnitte von Fluoreszenzpräparaten.

2.2.6.2 Untersuchung von Peyer'schen Plaques

Für die Ermittlung von Anzahl und Größe der Peyer'schen Plaques von Wildtyp- und verschiedenen *knock-out*-Mäusen wurde der Dünndarm entnommen und über Nacht in PFA-Fixierlösung (2.2.6.1) gelagert. Das Zählen der Peyer'schen Plaques erfolgte makroskopisch. Für die Vermessung wurden die Peyer'schen Plaques mit Hilfe eines Stereomikroskopes (SZ61, Olympus, Hamburg) untersucht und mit der Kamera *SC30* (Olympus) fotografiert. Die Vermessung erfolgte am Computerbildschirm mit dem Programm *Cell^A* (Olympus).

2.2.6.3 β -Galaktosidase-Färbung von Mausembryonen

0,1 M Phosphatpuffer

NaH₂PO₄ 0,1 M

pH 7,4

Färbelösung

X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-Galaktopyranosid, BTS-Biotech Trade Service GmbH, Sankt Leon-Rot)	1 mg/ml
K ₃ Fe(CN) ₆	5 mM
K ₄ Fe(CN) ₆	5 mM
MgCl ₂	2 mM
NP40 (Fluka)	0,02 % (v/v)
Na-Desoxycholat (Merck)	0,01 % (w/v)
Phosphatpuffer, pH 7,4	0,1 M

filtriert durch Faltenfilter, Lagerung bei -20 °C, lichtgeschützt

Die 13,5 Tage alten Mausembryonen wurden für 1 Stunde in PFA-Fixierlösung (2.2.6.1) bei 4 °C unter Schütteln inkubiert und im Anschluss zweimal für je 20-120 Minuten in PBS gewaschen. Danach wurde die Färbelösung zugegeben. Die Färbung erfolgte für 12-48 Stunden bei 30 °C unter Lichtausschluss und bei leichtem Schwenken. Durch Waschen mit PBS wurde die Färbung gestoppt und die Embryonen wurden mit PFA-Fixierlösung für 30 Minuten nachfixiert.

2.2.6.4 Histologie

2.2.6.4.1 Perfusion von Mäusen

Um murines Gewebe auf nachfolgende histologische Untersuchungen vorzubereiten, erfolgte eine Perfusion der Mäuse. Hierfür wurden die Mäuse mit einer Mischung aus 12 mg Ketamin (Bremer Pharma GmbH, Warburg) und 1,6 mg Xylazin (Bayer Vital GmbH, Leverkusen) pro ml in sterilem PBS (2.2.2.1.1) narkotisiert (10 μ l/g Körpergewicht) und die Narkose über den Lid- und Kneifreflex kontrolliert. Die Maus wurde an den Vorder- und Hinterbeinen auf der Präparationsunterlage fixiert und Bauch- und Brustraum geöffnet. Anschließend wurde in den linken Ventrikel des Herzens eine Kanüle (21G) eingeführt, der rechte Vorhof mit Hilfe einer Präparationsschere geöffnet und eine Lösung mit 1 % (w/v) Procain Hydrochlorid (Sigma-Aldrich) in 1 x PBS bei konstantem Druck von etwa 100 mmHg durch den Blutkreislauf der Maus gespült. Nach Entfärbung der Leber und der Nieren durch Herausspülen des Blutes wurde das Gewebe durch die Perfusion mit PFA-Fixierlösung (2.2.6.1) fixiert.

2.2.6.4.2 Paraffinschnitte

Perfundiertes und fixiertes Gewebe (2.2.6.4.1) wurde entnommen und über Nacht bei Raumtemperatur in PFA-Fixierlösung inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe für 5 Stunden in Wasser gelagert und danach über Nacht in 50 % (v/v) EtOH überführt. Es folgte die Einbettung der Proben in Paraffin in folgenden Inkubationsschritten bei Raumtemperatur:

- 60 Minuten 50 % (v/v) EtOH
- 60 Minuten 60 % (v/v) EtOH
- 60 Minuten 70 % (v/v) EtOH
- 30 Minuten 96 % (v/v) EtOH I
- 60 Minuten 96 % (v/v) EtOH II
- 90 Minuten 100 % (v/v) EtOH I
- 120 Minuten 100 % (v/v) EtOH II
- 90 Minuten Xylol I
- 90 Minuten Xylol II

Das Paraffin wurde auf etwa 60 °C erhitzt, um es zu schmelzen und das Gewebe wurde für mindestens 30 Minuten in flüssigem Paraffin gelagert. Danach wurde das Paraffin ausgewechselt und die Proben über Nacht bei 60 °C darin inkubiert. Die Einbettung erfolgte am nächsten Tag in geeigneten Einbettungskassetten. Die 5 µm dicken Schnitte wurden mit Hilfe des Mikrotoms *Leica SM2000R* (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) angefertigt.

2.2.6.4.3 Kryoschnitte

Perfundiertes und fixiertes Gewebe (2.2.6.4.1) wurde in 20 % (w/v) Saccharose in 1 x PBS (2.2.2.1.1) überführt und zunächst über Nacht bei 4 °C und anschließend für 2 Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Danach wurden die Proben in selbstgefertigte Förmchen aus Alufolie in geeigneter Größe gelegt und in Jung-Einbettmedium (Leica Microsystems GmbH) eingeschlossen. Um eine vollständige Durchtränkung des Gewebes mit diesem Einbettungsmedium zu gewährleisten, wurden die Proben zunächst für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und erst danach auf Trockeneis eingefroren. Die Herstellung der 3 µm dicken Schnitte erfolgte bei -20 °C Kammertemperatur und -20 °C Objekttemperatur an einem

Kryostaten (CM3050 S, Leica Microsystems GmbH). Es wurden *Superfrost® Plus* Objektträger (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig) verwendet.

2.2.6.4.4 Hämatoxylin-/Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Eosinlösung

Eisessig 1 % (v/v)
Eosin G (Roth) 0,1 % (w/v)
gelöst in 96 % EtOH

Für die Färbung mit Hämatoxylin und Eosin wurden Paraffinschnitte von 5 µm Dicke verwendet (2.2.6.4.2). Diese wurden zunächst entparaffiniert, indem sie zweimal für jeweils 10 Minuten in Rotihistol gelagert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe für die folgenden Zeiten inkubiert wurden:

2 Minuten 100 % (v/v) EtOH
2 Minuten 90 % (v/v) EtOH
2 Minuten 70 % (v/v) EtOH
2 Minuten 50 % (v/v) EtOH

Anschließend wurden die Schnitte in destilliertem Wasser gespült, für 1-2 Minuten in Hämatoxylinlösung (filtriert durch Faltenfilter, Shandon Gill 3 Hematoxylin, Thermo Scientific, Pittsburgh, PA) gefärbt und im Anschluss für 10 Sekunden in Eisessigwasser geschwenkt. Danach wurden die Objektträger 6 Minuten in Leitungswasser gewaschen und schließlich für 10-30 Sekunden mit Eosinlösung gegengefärbt. Nachdem die Proben zweimal mit destilliertem Wasser gespült wurden, erfolgte die Dehydrierung in der aufsteigenden Ethanolreihe. Die folgenden Inkubationszeiten wurden dabei eingehalten:

2 Minuten 50 % (v/v) EtOH
2 Minuten 70 % (v/v) EtOH
2 Minuten 90 % (v/v) EtOH
2 Minuten 100 % (v/v) EtOH

Zum Schluss wurden die Schnitte für zweimal 2 Minuten in Xylol gewaschen, in *Eukitt® quick-hardning mounting medium* (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich) eingedeckelt und mit Hilfe des Mikroskops *BX50* von Olympus und der *Software analySIS® 3.0* (Soft Imaging System GmbH, Münster) dokumentiert.

2.2.6.4.5 Immunhistologie

Kryoschnitte von 3 µm Dicke (2.2.6.4.3) wurden für 5 Minuten in 10 mM Citratpuffer (pH 6) gekocht, um die Epitope freizulegen. Anschließend wurden die Schnitte für dreimal 10 Minuten in PBST (2.2.5.8.1) gewaschen. Für die Detektion mit den Primärantikörpern anti-CD45R (RA3-6B2, Immunotools) und anti-CD3 (C7930, Sigma-Aldrich) wurden diese jeweils 1:50 in PBST mit 1 % (w/v) BSA verdünnt und auf die Schnitte gegeben. Die Inkubation erfolgte abgedeckt mit einer Plastikfolie in einer feuchten Kammer bei 4 °C über Nacht. Danach wurden die Schnitte dreimal 10 Minuten in PBST gewaschen. Als Sekundärantikörper zur Erkennung von anti-CD3 wurden der mit alkaliner Phosphatase gekoppelte anti-Kaninchen-IgG (C7930, Sigma-Aldrich) in einer Verdünnung von 1:300 in PBST verwendet. Die Detektion der Phosphatase-Aktivität erfolgte durch NBT-BCIP-Färbung (Sigma-Aldrich) nach Angaben des Herstellers. Die Sensitivität der anti-CD45R-Färbung wurde durch Inkubation mit biotinyliertem anti-Ratte-IgG (BA-9401, Vector Laboratories, Burlingame, CA), 1:300 verdünnt in PBST, gefolgt von der Zugabe von Streptavidin-HRP (Vectastain® ABC Kit, Vector Laboratories), verstärkt. Die HRP-Aktivität wurde mit dem *Peroxidase Substrate Kit DAB* (Vector Laboratories) nach Herstellerangaben sichtbar gemacht. Im Anschluss erfolgte die Einbettung in Dabco/Mowiol (2.2.6.1) und die Auswertung der Färbungen unter Verwendung des Mikroskops *BX50* (Olympus) und der *Software analySIS® 3.0* (Soft Imaging System GmbH).

2.2.6.4.6 Transmissions-Elektronenmikroskopie

Phosphatpuffer

0,1 M KH₂PO₄ 16 ml

0,1 M Na₂HPO₄ 84 ml

pH 7,2-7,4 (nicht eingestellt)

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen IgM-positiver Zellen erfolgten in Kooperation mit Prof. Renate Lüllmann-Rauch (Anatomisches Institut, CAU Kiel). IgM⁺ Zellen wurden durch magnetische Zellsortierung aus murinen Milzen isoliert (2.2.2.2.4). Für die Transmissions-Elektronenmikroskopie wurden die Zellen in 2,5 % (v/v) Glutaraldehyd in Phosphatpuffer, pH 7,4 für 1 Stunde bei 22 °C und über Nacht bei 4 °C fixiert. Die fixierten Zellen wurden sedimentiert (220 x g, 5 Minuten), in BSA eingeschlossen (Taupin 2008) und in 2,5 % (v/v) Glutaraldehyd in Phosphatpuffer gelagert. Die BSA-Blöcke wurden mit 2 % (w/v) OsO₄ nachfixiert und in Araldit eingebettet. Semidünnschnitte (1 µm) wurden mit Toluidine Blau, Ultradünnschnitte mit Uranylacetat und Bleicitrat gefärbt. Von jedem Tier wurden 50 B-Zellen bei 7000-facher Vergrößerung fotografiert. Vakuolen mit einem Durchmesser \geq 250 nm wurden am Computerbildschirm gezählt und die durchschnittliche Anzahl pro Zelle in jedem Tier berechnet.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Funktionen der Intramembranproteasen *Signal peptide peptidase like 2a* und *2b* (SPPL2a und SPPL2b) *in vivo* im Mausmodell untersucht. Hierfür wurden Mäuse, die für die entsprechende Protease defizient waren, mit geeigneten Wildtyp-Kontrolltieren verglichen.

3.1 Genotypisierung SPPL2a/b-defizienter Mäuse

Die Generierung der *SPPL2a-knock-out*-Maus durch die Insertion einer *Neomycinkassette* in Exon 2 des *SPPL2a*-Gens wurde von Dr. Bernd Schröder (Biochemisches Institut, CAU Kiel) durchgeführt und ist in Abschnitt 2.1.3 näher beschrieben. Die Insertion der *Neomycinkassette* in das *SPPL2a*-Gen wurde durch PCRs unter Verwendung *SPPL2a*- und *Neomycin*-spezifischer Oligonukleotide (Abb. 2.1) nachgewiesen. *Neomycin*-spezifische Oligonukleotide wurden so gewählt, dass sie ein 269 bp langes Fragment der *Neomycinkassette* amplifizieren (Abb. 3.1). Die Untersuchung mit *SPPL2a*-spezifischen Oligonukleotiden, welche in Intron 2 und am 3'-Ende des Exons 2 binden, führte zur Amplifikation einer 242 bp (Wildtyp) beziehungsweise 1323 bp (*SPPL2a*^{-/-}) langen Sequenz. Der Größenunterschied wurde hierbei durch die Insertion der *Neomycinkassette* im Exon 2 hervorgerufen (Abb. 3.1).

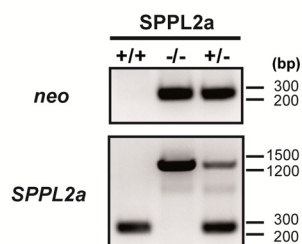


Abb. 3.1: Genotypisierung SPPL2a-defizienter Mäuse. Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte durch PCRs. DNA von *SPPL2a*^{+/+}, *SPPL2a*^{+/-} oder *SPPL2a*^{-/-} Tieren wurde aus Schwanzbiopsien isoliert und mit *Neomycin*- oder *SPPL2a*-spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert.

Heterozygote Mäuse für die Insertion eines *Genetraps* in Intron 2 des *SPPL2b*-Gens stammten vom CARD Institute, Kumamoto University, Japan (Araki *et al.* 1999) und wurden miteinander verpaart, um homozygote *knock-out*-Tiere zu erhalten. Das Prinzip zur Generierung der *SPPL2b-knock-out*-Mäuse ist in Abschnitt 2.1.3 dargestellt. Der hierfür verwendete *Genetrap*-Vektor enthielt als Reportergen die β -Galaktosidase-Sequenz aus *E. coli*.

Für den Nachweis der *Genetrap*-Insertion im *SPPL2b*-Gen wurden daher β -Galaktosidase- und *SPPL2b*-spezifische Oligonukleotide (Abb. 2.2) verwendet. Die *SPPL2b*-spezifischen Oligonukleotide amplifizierten eine 408 bp lange Sequenz des Wildtyp-Allels in dem Bereich

des Introns 2, der durch die Insertion der β -Galaktosidase-Sequenz in den *SPPL2b*-knock-out-Mäusen deletiert war. Das PCR-Produkt nach Amplifikation mit den β -Galaktosidase-spezifischen Oligonukleotiden entsprach der erwarteten Länge von 681 bp (Abb. 3.2a).

Zudem konnten die Insertion des Reportergens und die Promotoraktivität des *SPPL2b*-Gens in den *SPPL2b*-knock-out-Mäusen durch eine X-Gal-Färbung in murinem Gewebe nachgewiesen werden. Die β -Galaktosidase katalysiert die Hydrolyse der glykosidischen Bindung von β -Galaktopyranosiden. Die Spaltung von X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid) in Galaktose und einen blauen wasserunlöslichen Indigo-Farbstoff ermöglicht eine Identifizierung der Mäuse mit einem oder zwei *SPPL2b*-knock-out-Allelen. Hierfür wurde die Färbung in 13,5 Tage alten Embryonen durchgeführt. Während Wildtyp-Embryonen keine Färbung zeigten und *SPPL2b*-heterozygote Embryonen eine intermediäre Farbintensität aufwiesen, war die Blaufärbung in den homozygoten knock-out-Embryonen am stärksten zu beobachten (Abb. 3.2b).

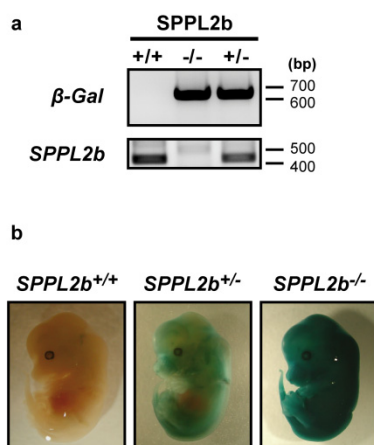


Abb. 3.2: Genotypisierung *SPPL2b*-defizienter Mäuse. (a) Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte durch PCRs mit Hilfe *SPPL2b*- oder β -Galaktosidase-spezifischer Oligonukleotide. Hierfür wurde DNA von *SPPL2b*^{+/+}, *SPPL2b*^{+/-} oder *SPPL2b*^{-/-} Tieren aus Schwanzbiopsien verwendet. (b) β -Gal-Färbung 13,5 Tage alter Embryonen. Die Insertion des β -Galaktosidase-Gens in die *SPPL2b*-Sequenz zur Generierung *SPPL2b*-defizienter Mäuse konnte durch die Spaltung von X-Gal in Galaktose und einen blauen Indigo-Farbstoff nachgewiesen werden. Während die *SPPL2b*^{+/-} Embryonen eine intermediäre Blaufärbung aufwiesen, wurden *SPPL2b*^{-/-} Embryonen deutlich stärker angefärbt. Wildtyp-Tiere zeigten keine oder nur eine sehr geringe Farbreaktion.

3.2 Überprüfung der Defizienz von *SPPL2a/b*

Das Fehlen des *SPPL2a*- beziehungsweise *SPPL2b*-Transkriptes in den entsprechenden knock-out-MEFs wurde mit Hilfe einer RT-PCR überprüft. Gesamt-RNA wurde aus den jeweiligen Zelllinien isoliert und unter Verwendung von Random-Hexamer-Oligonukleotiden in cDNA umgeschrieben. In Exon 1 und 3 des *SPPL2a* ORFs bindende Oligonukleotide (Abb. 2.1) wurden verwendet, um ein 342 bp langes Fragment des *SPPL2a* Wildtyp-ORFs zu amplifizieren. Erwartungsgemäß konnte dieses Fragment nicht aus der cDNA *SPPL2a*-defizienter Fibroblasten amplifiziert werden (Abb. 3.3a).

Für die Vervielfältigung eines 331 bp langen *SPPL2b* Wildtyp-Fragmentes wurden Oligonukleotide verwendet, welche spezifisch in Exon 1 und dem Übergang zwischen Exon 3 und 4 des Wildtyp-ORFs binden (Abb. 2.2) und dementsprechend zu keiner Amplifikation aus der cDNA *SPPL2b*-defizienter Zellen führten (Abb. 3.3b). Zusätzlich wurden β -Aktin-spezifische Oligonukleotide in einer parallel durchgeführten Kontroll-PCR verwendet (Abb. 3.3).

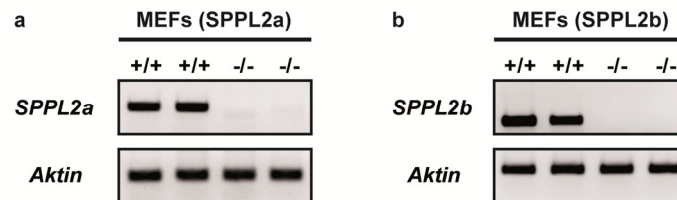


Abb. 3.3: Fehlen des *SPPL2a*- beziehungsweise *SPPL2b*-Wildtyp-Transkriptes in den entsprechenden *knock-out*-MEFs. Die mRNA wurde aus MEFs isoliert und unter Verwendung von Random-Hexamer-Oligonukleotiden in cDNA umgeschrieben. Oligonukleotide, welche spezifisch ein Fragment des *SPPL2a*- (a) beziehungsweise *SPPL2b*- (b) Wildtyp-ORFs amplifizieren, wurden für den Nachweis des Transkriptes verwendet. β -Aktin-spezifische Oligonukleotide dienten als Kontrolle.

Schließlich wurde die Defizienz von *SPPL2a* beziehungsweise *SPPL2b* in entsprechenden *knock-out*-MEFs auf Proteinebene geprüft. Hierfür wurden Proteinlysate der Zellen gelelektrophoretisch aufgetrennt und über *Western blot* detektiert. *SPPL2a* wurde durch den Antikörper anti-mSPPL2a bei einem apparenten Molekulargewicht von 70 kDa nachgewiesen. In den *SPPL2a*-defizienten Lysaten fehlte die entsprechende Bande (Abb. 3.4a).

Endogenes *SPPL2b* wurde unter Verwendung des Antikörpers anti-mSPPL2b nachgewiesen. Wildtyp-Lysate zeigten ein deutliches Signal bei etwa 70-75 kDa, welches in den *knock-out*-Lysaten in der Stärke nicht auftrat. Eine schwache Bande mit vergleichbarem Molekulargewicht, sowie eine weitere Bande bei einem apparenten Molekulargewicht von etwa 50 kDa waren auch in *knock-out*-Lysaten sichtbar. Es wird angenommen, dass es sich hierbei um unspezifische Bindungen des Antikörpers handelt (Abb. 3.4b).

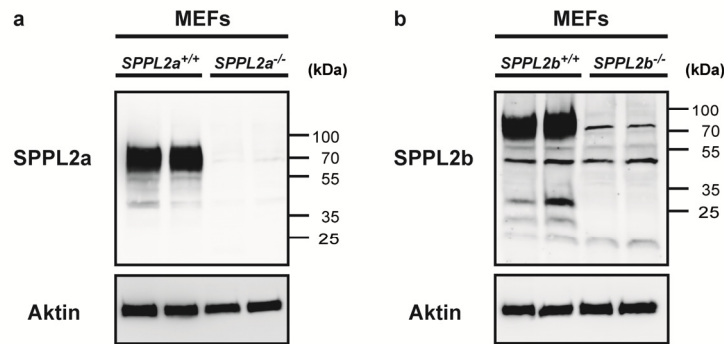


Abb. 3.4: *Western blot* zum Nachweis der SPPL2a- beziehungsweise SPPL2b-Defizienz auf Proteinebene in den entsprechenden *knock-out*-MEFs. SPPL2a (a) beziehungsweise SPPL2b (b) konnte in den Proteinlysaten von Wildtyp-MEFs, nicht jedoch in den jeweiligen *knock-out*-Lysaten detektiert werden. Aufgetragen wurden jeweils 20 μ g Protein. Die Auftrennung erfolgte in einem Tris-Glycin-Gel mit 10 % Polyacrylamid.

Zusammenfassend konnte die Defizienz von SPPL2a beziehungsweise SPPL2b auf RNA- und Proteinebene nachgewiesen werden. Die Mäuse stellen somit ein geeignetes Modell dar, um die Bedeutung dieser beiden Proteasen *in vivo* näher zu charakterisieren.

3.3 Herstellung und Validierung von *SPPL2a*- und *SPPL2b*-Expressionskonstrukten

Einige der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Funktion von SPPL2a und SPPL2b erfolgten in der Zellkultur. Für die Generierung der hierfür benötigten Expressionskonstrukte wurde die mRNA aus Wildtyp-MEFs in cDNA umgeschrieben und diente als *Template* für die Amplifikation des murinen *SPPL2a*- beziehungsweise *SPPL2b*-ORFs mit fusioniertem 3'-terminalem *Myc-Tag*. Als Expressionsvektor wurde pcDNA3.1/Hygro⁺ verwendet.

Um zu prüfen, ob die Konstrukte exprimiert wurden und die Proteine die erwartete subzelluläre Lokalisation zeigten, wurden HeLa-Zellen transient mit *SPPL2a-Myc* beziehungsweise *SPPL2b-Myc* transfiziert. Ein gegen das Myc-Epitop gerichteter Antikörper diente dem anschließenden Nachweis der Proteasen in den fixierten Zellen. Zudem erfolgte eine Kofärbung mit einem Antikörper gegen das lysosomale/spät endosomale Protein LAMP2. Wie bereits in der Literatur beschrieben (Friedmann *et al.* 2006), konnte die lysosomale/spät endosomale Lokalisation von SPPL2a durch die Kolo-kalisation mit LAMP2 bestätigt werden. SPPL2b zeigte hingegen kaum Kolo-kalisation mit LAMP2 und wurde entsprechend den Angaben in der Literatur vor allem an der Plasmamembran detektiert (Friedmann *et al.* 2006), (Abb. 3.5).

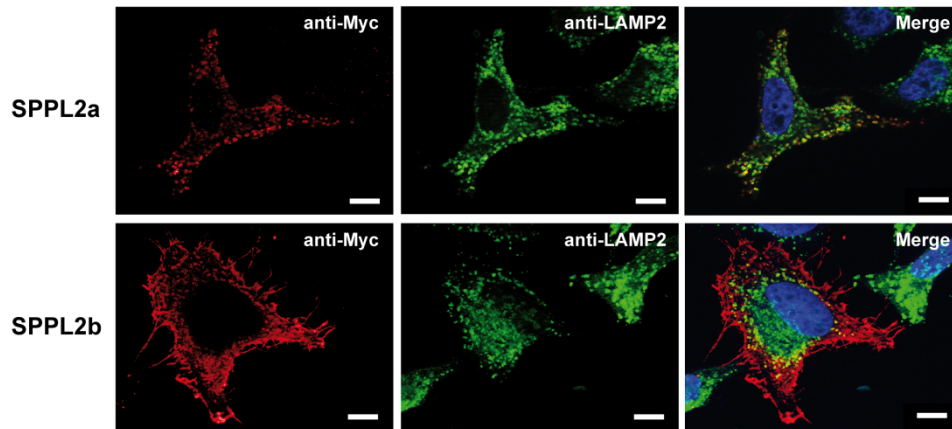


Abb. 3.5: Subzelluläre Lokalisation von SPPL2a-Myc und SPPL2b-Myc in transient transfizierten HeLa-Zellen. Das überexprimierte SPPL2a beziehungsweise SPPL2b wurde durch anti-Myc visualisiert. Lysosomen/späte Endosomen wurden mit Hilfe eines Antikörpers gegen LAMP2 dargestellt. Der Zellkern wurde durch DAPI angefärbt (blau). Größenmarker: 10 μ m.

3.4 Allgemeine Charakterisierung der SPPL2a- und der SPPL2b-defizienten Mäuse

Bei der Verpaarung heterozygoter $SPPL2a^{+/-}$ Mäuse sowie auch $SPPL2b^{+/-}$ Mäuse wurden homozygote *knock-out*-Tiere mit einer Häufigkeit von etwa 1:4 geboren und entsprachen somit der erwarteten Mendelschen Frequenz (Abb. 3.6). Es war daher davon auszugehen, dass keine erhöhte pränatale Sterblichkeit bei den SPPL2a- und SPPL2b-defizienten Embryonen vorlag.

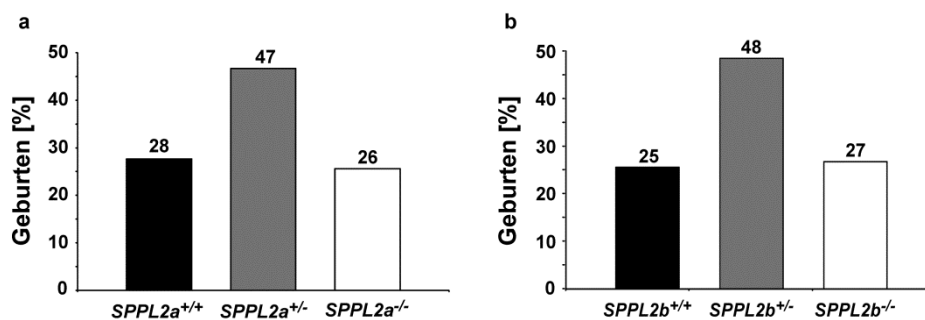


Abb. 3.6: Prozentualer Anteil von $SPPL2a^{+/+}$, $SPPL2a^{+/-}$ und $SPPL2a^{-/-}$ Mäusen (a) sowie von $SPPL2b^{+/+}$, $SPPL2b^{+/-}$ und $SPPL2b^{-/-}$ Mäusen (b) bei der Geburt. Gezählt wurden 777 (SPPL2a) beziehungsweise 241 (SPPL2b) Jungtiere.

Auch postnatal waren die *knock-out*-Tiere beider Linien lebensfähig, hatten eine gesunde Fellstruktur und zeigten keine offensichtlichen Verhaltensauffälligkeiten oder erhöhte Sterblichkeiten im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. In der Homozygotenverpaarung erwiesen

sich *SPPL2a*^{-/-} und *SPPL2b*^{-/-} Mäuse als fertil mit Wurfgrößen von bis zu acht (*SPPL2a*^{-/-}) beziehungsweise zehn (*SPPL2b*^{-/-}) Jungen.

Auffällig war allerdings eine gestörte Schmelzstruktur der Zähne *SPPL2a*-defizienter Mäuse, die in den *SPPL2b*^{-/-} Tieren nicht zu beobachten war. Dies zeigte sich in der deutlich helleren Zahnfarbe der *SPPL2a*^{-/-} Mäuse sowie einer erhöhten Brüchigkeit des Zahnschmelzes, woraus eine stärkere Abnutzung der Zahnspitzen sowie diverse Bruchstellen des Zahnschmelzes resultierten (Abb. 3.7).

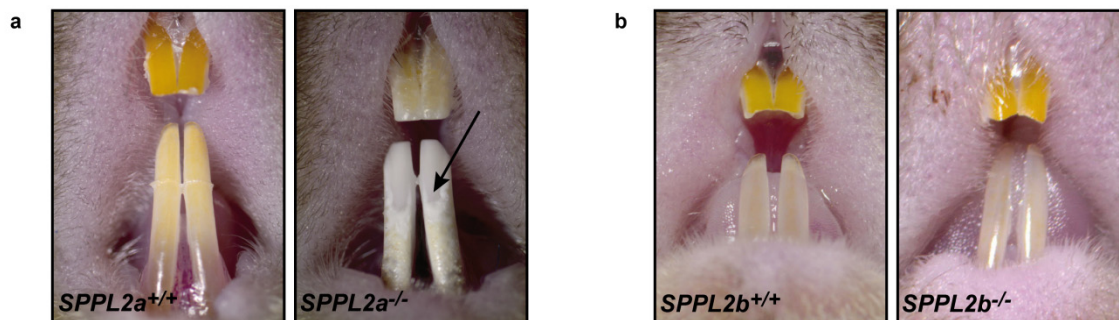


Abb. 3.7: Gestörte Schmelzstruktur und damit einhergehender Verlust der natürlichen Zahnfarbe und Schmelzstabilität bei *SPPL2a*-defizienten Mäusen. (a) Der Pfeil zeigt die Bruchkanten des Schmelzes an den Schneidezähnen von *SPPL2a*^{-/-} Mäusen. Die Zähne sind zudem auffällig weiß. **(b)** Im Gegensatz hierzu haben die Zähne *SPPL2b*-defizienter Mäuse eine natürliche Zahnfarbe und es sind keine Anzeichen für eine erhöhte Brüchigkeit des Schmelzes zu erkennen.

Während der murinen Zahnschmelzbildung unterscheidet man die Sekretions- von der Resorptionsphase (Maturierungsphase). In der Sekretionsphase synthetisieren die Ameloblasten spezifische Proteine, sezernieren diese in den Extrazellularraum und bilden dadurch das Grundgerüst, in welchem die Mineralisierung des Schmelzes stattfindet. In Abhängigkeit von der Verweildauer der Ameloblasten in dieser Phase, kann diese Matrix unterschiedlich stark ausgebildet sein, was später über die Schichtdicke des muren Zahnschmelzes entscheidet (Hu *et al.* 2007). Unmittelbar nach Beginn des Matrixaufbaus kommt es zur Bildung von Kristallkeimen, welche sich durch Aufnahme gleichartiger Substanzen oder Zusammenlagerung verschiedener Primärkristalle stetig vergrößern. Während dieser voranschreitenden Mineralisierung sezernieren die Ameloblasten Proteasen in den Extrazellularraum, welche die Matrix abbauen. Die restlichen Matrixbestandteile werden von den Ameloblasten rückresorbiert, so dass der Proteinanteil im fertig ausgereiften Schmelz nahezu vollständig fehlt (Hu *et al.* 2007; Smith 1998).

Die murine Zahnentwicklung bietet den Vorteil, dass die verschiedenen Phasen der Schmelzbildung an ein und demselben Zahn untersucht werden können. Da die Zähne von Nagetieren

lebenslang wachsen, kann die Entwicklung des Schmelzes von der Bildung der Schmelzmatrix (proximales Ende des Zahnes) bis zur Schmelzreifung (in distaler Richtung) verfolgt werden. Eine genauere histologische Untersuchung der SPPL2a-defizienten Mäuse in Kooperation mit Prof. Dr. Renate Lüllmann-Rauch (Anatomisches Institut, CAU Kiel) zeigte, dass die sekretorische Phase der Matrixbildung in Wildtyp- und SPPL2a-defizienten Mäusen vergleichbar ablief (Daten nicht gezeigt, Manuskript in Revision). Dies änderte sich deutlich in der Maturierungsphase. Die Rückresorption der Matrixproteine erfolgte, wie in HE-gefärbten Schnitten erkennbar war, unvollständig und die Mineralisierung war im Vergleich zu Wildtyp-Zähnen deutlich reduziert (Röntgen-Mikroanalysen, Nur Güneli, Biochemisches Institut, CAU Kiel; Dr. Peter Appelt, Institut für Geowissenschaften, CAU Kiel, Daten nicht gezeigt, Manuskript in Revision). Die Struktur der Ameloblasten in der Maturierungsphase war stark verändert (in Kooperation mit Dr. Antonius LJJ Bronckers, Department of Oral Cell Biology ACTA, University of Amsterdam, Daten nicht gezeigt, Manuskript in Revision).

3.5 Immunologische Charakterisierung der SPPL2a- beziehungsweise SPPL2b-defizienten Mäuse

3.5.1 Durchflusszytometrische Analyse der Immunzellzusammensetzung

In Überexpressionsstudien wurde gezeigt, dass SPPL2a/b die Intramembranproteolyse von TNF α (Fluhrer *et al.* 2006; Friedmann *et al.* 2006) und dem Fas Liganden (Kirkin *et al.* 2007), zwei Molekülen mit hoher immunologischer Relevanz, katalysieren. Es war daher davon auszugehen, dass das Fehlen einer dieser Proteasen Auswirkungen auf die Funktionalität des Immunsystems haben könnte. Aus diesem Grund wurden die verschiedenen Immunzellpopulationen in unterschiedlichen lymphatischen Geweben (Knochenmark, Milz, Lymphknoten, Thymus), sowie im Blut und im Peritonealraum SPPL2a- beziehungsweise SPPL2b-defizienter Mäuse durchflusszytometrisch analysiert und mit denen in Wildtyp-Tieren verglichen. Durch die Detektion verschiedener CD-Marker auf der Zelloberfläche konnten B- und T-Zellen, Granulozyten, dendritische Zellen, NK-Zellen, Mastzellen und Makrophagen voneinander unterschieden werden. Zudem war innerhalb der T-Zellen, B-Zellen und Granulozyten eine weitere Einteilung in Subpopulationen beziehungsweise verschiedene Entwicklungsstadien möglich. Diese Analysen wurden zum Teil in Kooperation mit Dr. Zane Orinska (Abteilung für Immunologie und Zellbiologie, Forschungszentrum Borstel) durchgeführt.

Bereits im Knochenmark, in dem sich die verschiedenen Blutzelllinien aus pluripotenten Stammzellen differenzieren, war eine signifikante Reduktion B220-positiver Zellen in *SPPL2a*-defizienten Mäusen erkennbar (Abb. 3.8a, Tab. 3.1). Diese Defizienz verstärkte sich in der Milz, den Lymphknoten, den Zellen des Peritonealraums und im Blut. Hier konnte eine hoch signifikante Reduktion im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden (Abb. 3.8a, Tab. 3.1). B220 ist ein allgemeiner B-Zell-Marker, der spezifisch von B-Zellen aller Entwicklungsstadien exprimiert wird (Coffman & Weissman 1981). Es war daher davon auszugehen, dass bei den *SPPL2a*^{-/-} Mäusen eine Störung der B-Zell-Entwicklung oder Homöostase vorlag. Die *SPPL2b*^{-/-} Tiere wiesen hingegen keinen vergleichbaren B-Zell-Defekt auf. Der prozentuale Anteil B220-positiver Zellen im Knochenmark, in der Milz, den Lymphknoten und im Peritonealraum war mit dem in Wildtyp-Tieren vergleichbar (3.8b, Tab. 3.2).

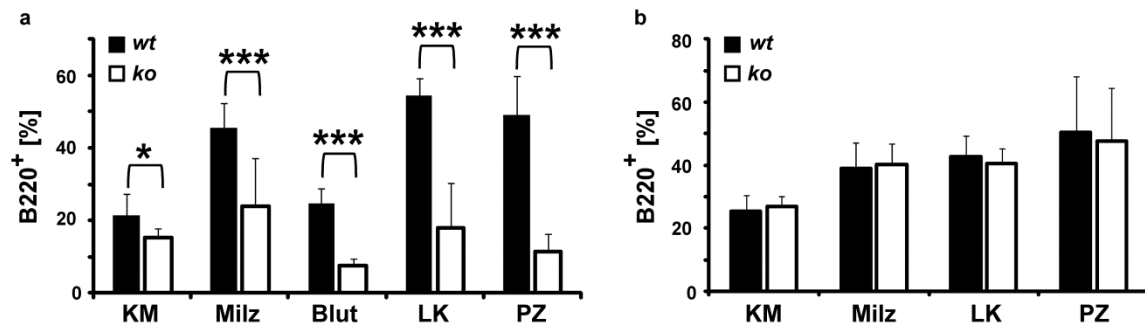


Abb. 3.8: Durchflusszytometrische Analyse der B-Zell-Populationen in *SPPL2a*^{-/-} (a) und *SPPL2b*^{-/-} Mäusen (b). (a) Der prozentuale Anteil von B-Zellen an den lebenden Zellen (B220⁺, % der PI Zellen) ist signifikant reduziert in Knochenmark (KM, n=7), Milz (n=9), Blut (n=6), Lymphknoten (LK, n=6) und dem Peritonealraum (PZ, n=12) *SPPL2a*-defizienter Mäuse (*ko*) im Vergleich zum Wildtyp (*wt*). (b) Der B-Zell-Anteil in Knochenmark, Milz, Blut, Lymphknoten und dem Peritonealraum (alle n=6) *SPPL2b*-defizienter Mäuse (*ko*) ist mit dem im Wildtyp (*wt*) vergleichbar (MW ± Stabw., ***P<0.001, *P<0.05, ungepaarter, zweiseitiger t-Test).

Alle weiteren untersuchten Zellpopulationen *SPPL2a*- und *SPPL2b*-defizienter Tiere (T-Zellen, Granulozyten, dendritische Zellen und NK-Zellen) wichen mit Ausnahme der T-Zellen in Milz und Lymphknoten von *SPPL2a*^{-/-} Mäusen weder in ihrer Menge noch in der Expressionsstärke der untersuchten Oberflächenmarker signifikant vom Wildtyp ab (Tab. 3.1, Tab. 3.2).

Tab. 3.1: Immunzellen in verschiedenen lymphatischen Geweben, Blut und Peritoneallavage von Wildtyp- und SPPL2a-defizienten Mäusen.

Zelltyp		<i>SPPL2a</i> ^{+/+}		<i>SPPL2a</i> ^{-/-}		P
		MW	Stabw	MW	Stabw	
<u>Knochenmark</u>						
B-Zellen	B220 ⁺	21,4	6,1	15,3	2,5	0,031*
T-Zellen	CD3 ⁺	1,8	1,2	1,1	1	0,066
Reife Granulozyten	CD11b ⁺ Gr1 ⁺⁺	63,4	9,6	70,5	1,4	0,137
Unreife Granulozyten	CD11b ⁻ Gr1 ⁺	8,1	2,6	7,8	3,2	0,623
Dendritische Zellen	CD11c ⁺	2,9	2,5	2,8	2	0,714
NK-Zellen	CD49b ⁺	2,6	0,6	2,1	0,7	0,078
<u>Milz</u>						
B-Zellen	B220 ⁺	45,6	6,6	23,9	13,1	<0,001***
T-Zellen	CD3 ⁺	32,7	4,4	38,3	3,6	0,01*
<u>Lymphknoten</u>						
B-Zellen	B220 ⁺	54,4	5	18	12,3	<0,001***
T-Zellen	CD3 ⁺	35,7	4,2	59,5	11,4	0,018*
Makrophagen	F4/80 ⁺	4,8	3,6	3,6	1,3	0,12
Dendritische Zellen	CD11c ⁺	0,5	0,2	0,7	0,7	0,872
<u>Blut</u>						
B-Zellen	B220 ⁺	24,6	4,2	7,6	1,9	<0,001***
<u>Peritonealzellen</u>						
B-Zellen	B220 ⁺	49,2	10,8	11,4	5	<0,001***
Mastzellen	Ckit ⁺⁺ ST2 ⁺⁺	1,8	0,8	3,8	2,2	0,061
<u>Thymus</u>						
Doppelt-positive T-Zellen	CD4 ⁺ CD8 ⁺	78,8	4,3	81,5	5,7	0,289
CD4 ⁺ T-Zellen	CD4 ⁺ CD8 ⁻	13,7	2,8	11,5	3,6	0,193
CD8 ⁺ T-Zellen	CD4 ⁻ CD8 ⁺	3,4	1,2	3,1	1,4	0,582
Doppelt-negative T-Zellen	CD4 ⁻ CD8 ⁻	4,2	1,2	3,8	1,4	0,54

Zellen von sechs Mäusen jedes Genotyps wurden durchflusszytometrisch analysiert und die angegebenen Immunzellpopulationen als % der lebenden Zellen (Propidiumiodid negativ) ermittelt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung, ***P<0.001, *P<0.05, ungepaarter, zweiseitiger t-Test.

Die relative Anzahl der T-Zellen in der Milz und in den Lymphknoten war in den SPPL2a-defizienten Tieren leicht erhöht (Tab. 3.1). Eine tatsächliche Beeinträchtigung dieser Zellen im *knock-out*-Tier konnte allerdings nicht bestätigt werden, da die Reifung und Anzahl im Thymus, dem Hauptorgan der T-Zell-Entwicklung, nicht verändert war (Abb. 3.9, Tab. 3.1). Da es sich bei allen Werten um den Prozentanteil an den lebenden Zellen handelte, war anzunehmen, dass die erhöhten Werte lediglich die B-Zell-Defizienz widerspiegeln.

Tab. 3.2: Immunzellen in verschiedenen lymphatischen Geweben und Peritoneallavage von Wildtyp- und SPPL2b-defizienten Mäusen.

Zelltyp		<i>SPPL2b</i> ^{+/+}		<i>SPPL2b</i> ^{-/-}		P
		MW	Stabw	MW	Stabw	
<u>Knochenmark</u>						
B-Zellen	B220 ⁺	25,2	5,3	26,9	3,2	0,513
T-Zellen	CD3 ⁺	1,9	1,5	2,5	1,9	0,591
Reife Granulozyten	CD11b ⁺ Gr1 ⁺⁺	62,8	5,8	62,8	5,1	0,992
Unreife Granulozyten	CD11b ⁻ Gr1 ⁺	9,3	1,6	8,8	1,8	0,628
Dendritische Zellen	CD11c ⁺	3,4	2,6	2,5	1,8	0,514
NK-Zellen	CD49b ⁺	2,2	0,4	2,2	0,3	0,822
<u>Milz</u>						
B-Zellen	B220 ⁺	38,8	8,3	40	6,7	0,787
T-Zellen	CD3 ⁺	34	9,7	36,8	6,9	0,588
<u>Lymphknoten</u>						
B-Zellen	B220 ⁺	42,5	6,8	40,4	4,9	0,556
T-Zellen	CD3 ⁺	42,7	8,5	41,3	14,7	0,843
Makrophagen	F4/80 ⁺	2,9	2,1	3,1	2	0,897
Dendritische Zellen	CD11c ⁺	0,6	0,2	0,4	0,1	0,365
<u>Peritonealzellen</u>						
B-Zellen	B220 ⁺	50,4	17,7	47,5	17	0,782,
Mastzellen	Ckit ⁺⁺ ST2 ⁺⁺	3,3	1,4	3,9	1,1	0,415
<u>Thymus</u>						
Doppelt positive T-Zellen	CD4 ⁺ CD8 ⁺	82,3	2,5	80,9	3,8	0,485
CD4 ⁺ T-Zellen	CD4 ⁺ CD8 ⁻	10,2	2	12	2,3	0,167
CD8 ⁺ T-Zellen	CD4 ⁻ CD8 ⁺	2,6	1,1	3	1,2	0,546
Doppelt negative T-Zellen	CD4 ⁻ CD8 ⁻	4,9	1	4	0,8	0,102

Zellen von sechs Mäusen jedes Genotyps wurden durchflusszytometrisch analysiert und die angegebenen Immunzellpopulationen als % der lebenden Zellen (Propidiumiodid negativ) ermittelt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung, ungepaarter, zweiseitiger t-Test.

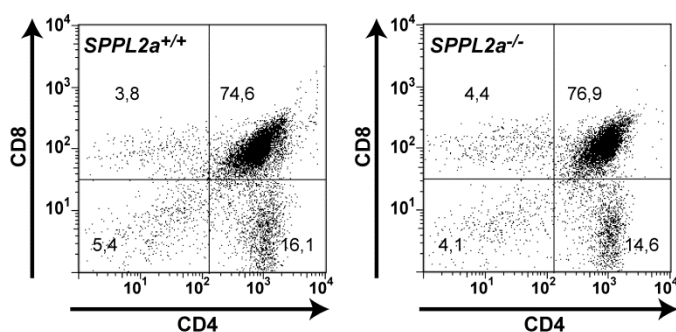


Abb. 3.9: Durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Zusammensetzung im Thymus. Die anhand von CD4 und CD8 unterschiedenen Entwicklungsstadien der T-Zellen sind in *SPPL2a*^{-/-} und Wildtyp-Mäusen vergleichbar. Der *Dot Plot* zeigt die lebenden Zellen (PI) in einem repräsentativen Experiment. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der jeweiligen Zellpopulationen an den lebenden Zellen an.

SPPL2a-defiziente Tiere zeigten somit einen sehr spezifischen Defekt des B-Zell-Kompartments, der offensichtlich nicht durch SPPL2b kompensiert werden konnte. Im Folgenden sollte dieser Phänotyp näher charakterisiert werden.

3.5.2 Morphologische und histologische Untersuchung der lymphatischen Organe

B-Zellen machen einen Anteil von etwa 40-50 % der Splenozyten in der durchschnittlichen murinen Milz, dem Ort der B-Zell-Reifung, aus. Zudem wurde eine entscheidende Funktion von B-Lymphozyten für die Entwicklung des mucosalen Immunsystems, insbesondere der Ausbildung von Peyer'schen Plaques am Dünndarm beschrieben (Golovkina *et al.* 1999). Es stellte sich daher die Frage, ob die in den *SPPL2a*^{-/-} Mäusen gefundene B-Zell-Reduktion morphologisch sichtbare Auswirkungen auf die Ausbildung dieser Organe hat. Um dies zu klären, wurden die Milzen von Wildtyp- (n=13) und *SPPL2a*^{-/-} (n=14) Mäusen gewogen und deren durchschnittliches Gewicht im Verhältnis zum Körpergewicht berechnet. Es konnte eine signifikante Reduktion (P-Wert=0,021) des *SPPL2a*^{-/-} Milzgewichtes (2,1 mg/g Körpergewicht ± 0,7) im Vergleich zum Wildtyp (2,9 mg/g Körpergewicht ± 1) ermittelt werden.

Eine Reduktion sowohl der Größe als auch der Anzahl von Peyer'schen Plaques in den *SPPL2a*-defizienten Mäusen war bereits mit bloßem Auge erkennbar. Für eine genauere Quantifizierung wurden die Peyer'schen Plaques von je neun Wildtyp- und *SPPL2a*-defizienten Tieren makroskopisch gezählt und stereomikroskopisch vermessen. Beide Parameter unterschieden sich in den *SPPL2a*^{-/-} Mäusen mit hoher Signifikanz (P-Wert < 0,001) von denen in Wildtyp-Tieren (Abb. 3.10).

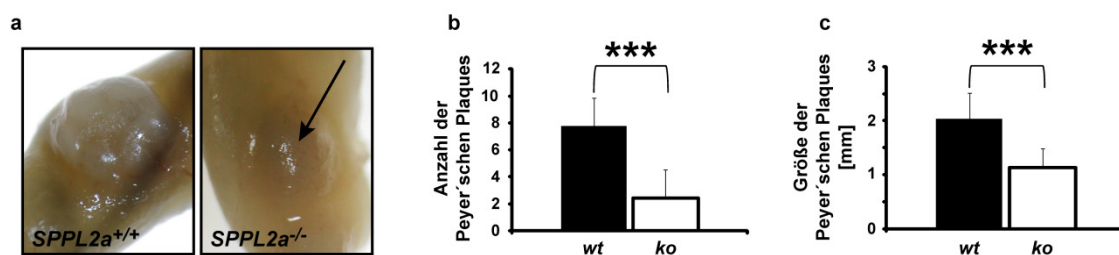


Abb. 3.10: Hypoplastische Peyer'sche Plaques des Dünndarms *SPPL2a*-defizienter Mäuse (Pfeil, a).

(b) Die Anzahl der Peyer'schen Plaques wurde makroskopisch bestimmt. Im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren ($7,8 \pm 2,1$) ist sie in den *SPPL2a*^{-/-} Tieren hoch signifikant reduziert ($2,4 \pm 2,1$). **(c)** Der Durchmesser der Peyer'schen Plaques wurde stereomikroskopisch vermessen und in Wildtyp- ($2,0 \text{ cm} \pm 0,5$) und *SPPL2a*^{-/-} ($1,1 \pm 0,3$) Mäusen verglichen. Der Unterschied zwischen den beiden Genotypen ist hoch signifikant. **(b, c)** MW ± Stabw., n=9, ***<0,001, ungepaarter, zweiseitiger t-Test.

Eine anschließende histologische Analyse sollte Aufschluss darüber geben, ob die beobachtete Reduktion der Milzgröße sowie die hypoplastischen Peyer'schen Plaques tatsächlich auf die B-Zell-Defizienz zurückzuführen sind. Aus diesem Grund wurden Paraffinschnitte von Milz und Peyer'schen Plaques angefertigt und zunächst mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt.

Während Hämatoxylin für die Anfärbung von sauren beziehungsweise basophilen Strukturen (blau) wie beispielsweise die Zellkerne mit der darin enthaltenen DNA und das mit Ribosomen besetzte raue ER genutzt wird, färbt Eosin die acidophilen beziehungsweise basischen (eosinophilen) Strukturen wie zum Beispiel zytoplasmatische Proteine rötlich. Somit können in lymphatischen Geweben die Bereiche mit hoher Lymphozytendichte (wenig Zytoplasma, großer Zellkern) durch eine deutliche Blaufärbung hervorgehoben werden (Lüllmann-Rauch 2009). In der Milz der SPPL2a-defizienten Tiere war die weiße Pulpa, welche die Lymphozyten enthält, im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert (Abb. 3.11). Um zu belegen, dass diese Reduktion vor allem durch die B-Zell-Defizienz bedingt war, wurden Kryoschnitte der Milz angefertigt, welche mit Antikörpern gegen B220 (B-Zellen) und CD3 (T-Zellen) inkubiert wurden. HRP- beziehungsweise alkaline Phosphatase-gekoppelte Sekundärantikörper und eine anschließende DAB- beziehungsweise NBT-BCIP-Färbung dienten dem Nachweis der jeweiligen Primärantikörper.

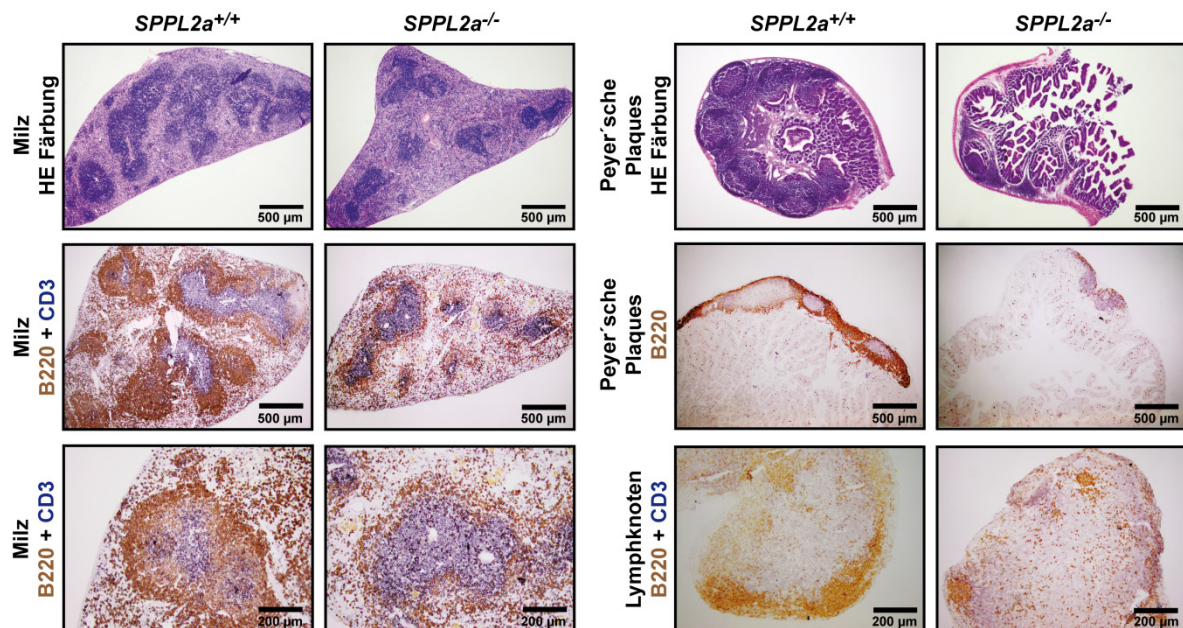


Abb. 3.11: Histologische Untersuchung der lymphatischen Organe SPPL2a-defizienter Mäuse. Repräsentative Paraffinschnitte von Milzen und Peyer'schen Plaques von *SPPL2a^{-/-}* und Wildtyp-Mäusen wurden mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt. Die weiße Pulpa der Milz und die Peyer'schen Plaques sind in den SPPL2a-defizienten Tieren verkleinert. B-Zellen (B220⁺, braun) und T-Zellen (CD3⁺, blau) wurden in Kryoschnitten von Milzen, Peyer'schen Plaques und Lymphknoten immunhistologisch analysiert. Die Anzahl der B-Zellen ist deutlich reduziert in *SPPL2a^{-/-}* Tieren, während T-Zellen in vergleichbarer Menge detektierbar sind. Der Aufbau der lymphatischen Organe ist darüber hinaus nicht beeinträchtigt.

Während die T-Zellen (CD3, blau) in *knock-out*- und Wildtyp-Milzen in vergleichbarer Anzahl detektiert werden konnten, war eine eindeutige Verminderung der B-Zellen (B220, braun) erkennbar. Auch in den Peyer'schen Plaques zeigte die Hämatoxylin-/Eosin-Färbung

eine fast vollständige Defizienz der Lymphozyten, welche durch die immunhistologische Unterscheidung von B220- und CD3-positiven Zellen auf das Fehlen von B-Zellen zurückgeführt werden konnte. Der gleiche Befund wurde zudem in den Lymphknoten erbracht (Abb. 3.11). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die verbliebenen B- und T-Lymphozyten *SPPL2a*-defizienter Mäuse innerhalb der Milz, den Peyer'schen Plaques und den Lymphknoten eine korrekte Anordnung zeigten. B- und T-Zell-Zone waren klar gegeneinander abgetrennt und der generelle Aufbau der lymphatischen Organe war nicht beeinträchtigt (Abb. 3.11).

3.5.3 Humorale Immunreaktion in *SPPL2a*-defizienten Mäusen

Die starke aber nicht vollständige Defizienz von B-Zellen in *SPPL2a*^{-/-} Mäusen führte zu der Frage, ob die verbliebenen B-Zellen funktional sind und somit in der Lage, Antikörper zu produzieren. Einen ersten Eindruck darüber verschaffte die Bestimmung der basalen Immunglobulinkonzentrationen im Blutplasma. Es wurden daher mit Hilfe von ELISAs die Konzentrationen der verschiedenen Immunglobulinsubklassen (IgM, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ und IgA) in den *SPPL2a*^{-/-} Tieren bestimmt und mit dem Wildtyp verglichen (in Kooperation mit Dr. Zane Orinska, Abteilung für Immunologie und Zellbiologie, Forschungszentrum Borstel). Die Analyse zeigte eine signifikante Reduktion der Isotypen IgM, IgG₁, IgG_{2b} und IgA (Abb. 3.12).

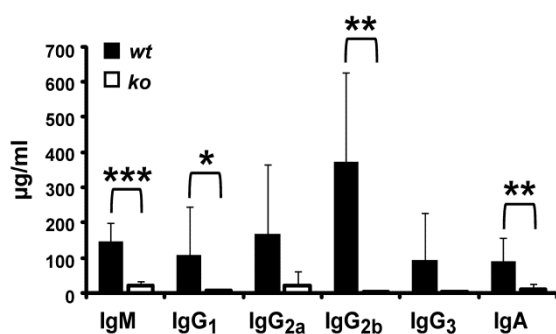


Abb. 3.12: Signifikante Reduktion basaler Immunglobulinkonzentrationen im Plasma *SPPL2a*-defizienter Mäuse. Die Konzentrationen der verschiedenen Immunglobulinklassen wurden mit Hilfe von ELISAs bestimmt und sind in den *SPPL2a*^{-/-} Mäusen (*ko*) im Vergleich zum Wildtyp (*wt*) signifikant reduziert (MW ± Stabw., IgM / IgA n=13, IgG_{2a} n=9, IgG₁/IgG_{2b}/IgG₃ n=10, ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05, ungepaarter, zweiseitiger t-Test).

In zwei weiteren Versuchen sollte geklärt werden, ob die Induktion einer Immunantwort und infolgedessen die Produktion spezifischer Antikörper durch die intraperitoneale Verabreichung von Antigenen in den *SPPL2a*^{-/-} Tieren möglich ist. Untersucht wurde sowohl die Immunisierung mit dem T-Zell-unabhängigen Antigen TNP-Ficoll, als auch mit dem T-Zell-abhängigen Antigen TNP-KLH. Dabei ist das Hapten TNP auf Grund seiner geringen Größe

selbst nicht in der Lage, eine Immunantwort zu induzieren. Die antigene Wirkung wird erst durch die Bindung an ein Trägermolekül ausreichender Größe erzeugt. Bei Ficoll handelt es sich um ein Kopolymer aus Saccharose und Epichlorhydrin. KLH ist ein hochmolekularer Proteinkomplex aus der Hämolymphe der Großen Kalifornischen Schlüssellocknapfschnecke und ist eines der größten bekannten Proteine.

SPPL2a-defizienten Mäusen und vergleichbaren Wildtyp-Kontrolltieren wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen und anschließend die intraperitoneale Immunisierung mit TNP-Ficoll durchgeführt. An Tag 14 wurden die Plasmaproben durch ELISAs auf TNP-spezifische Antikörper der Subklassen IgM, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} und IgG₃ untersucht. Als Referenz diente das jeweilige Präimmunserum. Es konnte eine signifikante Reduktion aller Isotypen festgestellt werden (Abb. 3.13a).

Die intraperitoneale Immunisierung mit TNP-KLH in Kombination mit komplettem Freund's Adjuvans wurde nach vorheriger Blutabnahme aus der Schwanzvene durchgeführt. An Tag 14 wurde erneut Blut aus der Schwanzvene entnommen und eine *Booster*-Immunisierung mit TNP-KLH und inkomplettem Freund's Adjuvans durchgeführt. An Tag 28 wurde der Versuch beendet und alle Plasmaproben wurden auf TNP-spezifische Immunglobuline der Klassen IgM, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} und IgG₃ untersucht. Die Präimmunplasmaproben dienten als Referenzen. Die IgM-Spiegel in *SPPL2a*^{-/-} Plasmaproben erreichten an Tag 28 der Immunisierung etwa 52 % der durchschnittlichen Wildtyp-Immunglobulinkonzentration. Darüber hinaus waren alle weiteren untersuchten Subklassen in SPPL2a-defizienten Mäusen signifikant reduziert und lagen an der Nachweisgrenze (Abb. 3.13b).

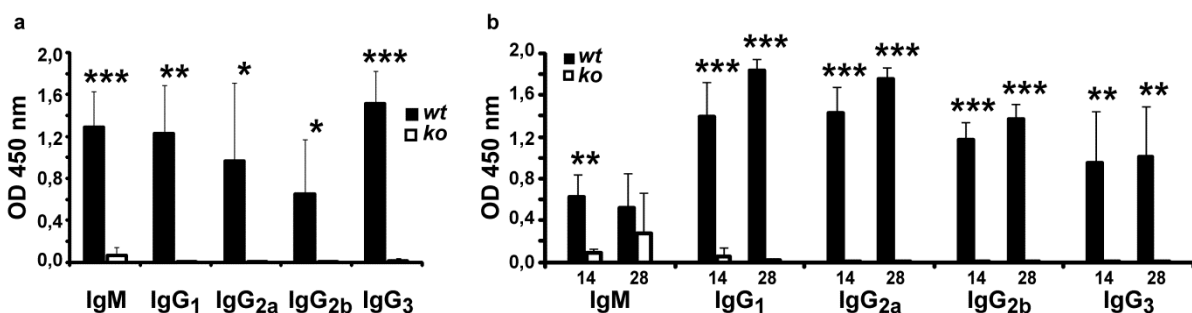


Abb. 3.13: Beeinträchtigte humorale Immunantwort in *SPPL2a*^{-/-} Mäusen. *SPPL2a*^{-/-} (*ko*) und Wildtyp- (*wt*) Mäuse wurden entweder mit dem T-Zell-unabhängigen Antigen TNP-Ficoll (**a**) oder dem T-Zell-abhängigen Antigen TNP-KLH (**b**) immunisiert. Die Hapten-spezifischen Immunglobulinkonzentrationen im Plasma wurden 14 Tage nach Antigenverabreichung gemessen (**a**, **b**). Für TNP-KLH erfolgte eine weitere Immunisierung an Tag 14 und die TNP-spezifischen Antikörper wurden nach weiteren 2 Wochen an Tag 28 erneut bestimmt (**b**). Die Bildung TNP-spezifischer Antikörper ist für alle Immunglobulinklassen in den SPPL2a-defizienten Tieren stark beeinträchtigt. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte ± Stabw., n=6 pro Genotyp und Versuch, ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05, ungepaarter, zweiseitiger t-Test.

Der entdeckte B-Zell-Defekt in SPPL2a-defizienten Mäusen betraf demnach nicht nur die Anzahl der B-Lymphozyten sondern auch deren Funktionalität. Es war daher wichtig, die betroffenen B-Zell-Subpopulationen genau zu identifizieren, sowie die verbliebenen B-Lymphozyten zu charakterisieren.

3.5.4 Nachweis eines entwicklungsspezifischen B-Zell-Defektes in SPPL2a-defizienten Mäusen

Eine Reduktion B220-positiver Zellen konnte bereits im Knochenmark, dem primären lymphatischen Organ, in dem sich die immaturren B-Zellen aus hämatopoietischen Stammzellen entwickeln, beobachtet werden (Abb. 3.8a, Tab. 3.1). Die Differenz zum Wildtyp vergrößerte sich jedoch in der Peripherie, in der vor allem reife B-Zellen zirkulieren (Abb. 3.8a, Tab. 3.1). Zudem ergab die durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarker B220, CD21, CD23 und des B-Zell-Rezeptors IgD, die von naiven, reifen B-Lymphozyten stark exprimiert werden (Cancro 2004), eine deutliche Reduktion auf B-Zellen SPPL2a-defizienter Mäuse (Abb. 3.14). Es war daher wahrscheinlich, dass es sich bei der beobachteten Defizienz der B-Zellen um einen entwicklungsspezifischen Defekt handelte.

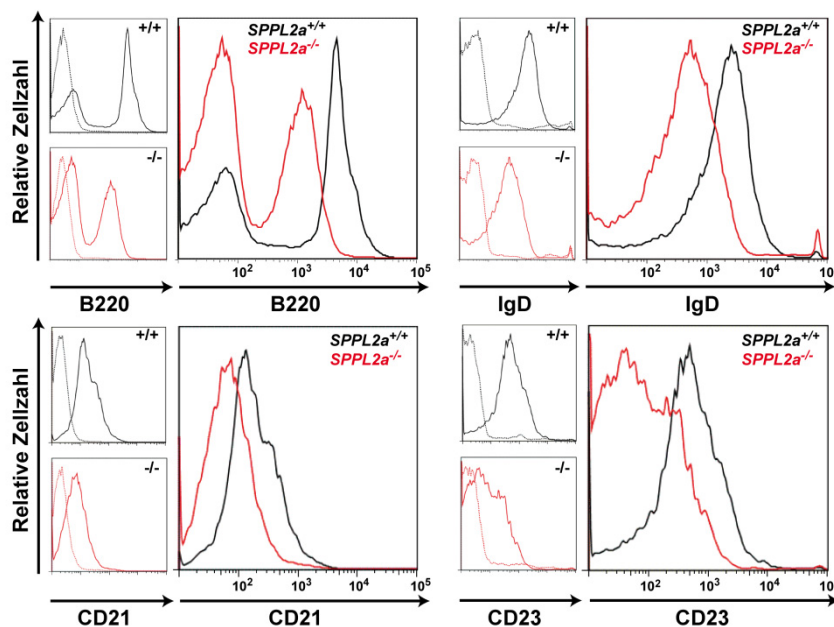


Abb. 3.14: Durchflusszytometrische Analyse verschiedener B-Zell-Marker in der Milz. Reduktion von B220, CD21, CD23 und IgD auf der Oberfläche SPPL2a-defizienter B-Zellen (*ko*) im Vergleich zum Wildtyp (*wt*), (in Kooperation mit Dr. Zane Orinska). Dargestellt ist jeweils ein exemplarisches Histogramm mit den zugehörigen Isotypkontrollen (gestrichelte Linie). Gezeigt sind die lebenden (PI) Zellen (B220) beziehungsweise die lebenden B220⁺ Zellen (CD21, CD23, IgD).

Um diese Hypothese zu prüfen, wurden zunächst Zellen aus dem Knochenmark isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Eine parallele Untersuchung der B220- und der IgM-Expression auf der Oberfläche erlaubte eine Einteilung der B-Zellen in drei verschiedene Entwicklungsstadien, Pro- und Pre-B-Zellen, die frühesten Vorläufer von B-Lymphozyten ($B220^+/IgM^-$), immature B-Zellen ($B220^+/IgM^+$) und reife, rezirkulierende B-Zellen ($B220^{++}$), (Hardy *et al.* 2007). Die Analyse der Zellen im Knochenmark zeigte, dass der relative Anteil der frühen B-Zell-Stadien, Pro-/Pre-B-Zellen sowie immature B-Zellen, in *SPPL2a*^{-/-} und Wildtyp-Mäusen vergleichbar war. Im Gegensatz hierzu fehlte die Population der reifen, rezirkulierenden B-Zellen nahezu vollständig in den *SPPL2a*-defizienten Tieren (Abb. 3.15, Tab. 3.3). Da zudem weder im Knochenmark noch im Blut eine Akkumulation unreifer B-Zell-Vorstufen festgestellt werden konnte (Tab. 3.1, Abb. 3.15, Tab. 3.3), war anzunehmen, dass die unreifen B-Zellen das Knochenmark in normaler Anzahl verlassen konnten und über das Blut die Milz erreichten. Es war daher zu prüfen, ob die B-Zell-Defizienz durch eine Störung der Maturierung in der Milz hervorgerufen wurde. Aus diesem Grund wurden Splenozyten aus *SPPL2a*-defizienten Mäusen und vergleichbaren Wildtyp-Tieren durchflusszytometrisch untersucht. Eine Detektion der Oberflächenmarker B220, CD21 und CD24 erlaubt die Unterteilung in drei verschiedene Reifungsstadien. Transitional 1 (T1) Zellen ($B220^+/CD21^{+/-}/CD24^{++}$) differenzieren zu Transitional 2 (T2) Zellen ($B220^+/CD21^{++}/CD24^{++}$), aus denen schließlich die maturen B-Zellen ($B220^+/CD21^{+/-}/CD24^{+/-}$) hervorgehen (Su & Rawlings 2002).

Die *SPPL2a*^{-/-} Mäuse wiesen sowohl in der absoluten Zellzahl als auch bei ihrem relativen Anteil eine vergleichbare Anzahl der Transitional 1 Zellen und somit des ersten Reifungsstadiums auf. Bereits bei der Betrachtung der T2 Population wurde jedoch eine fast vollständige Defizienz dieses Stadiums erkennbar. Die maturen B-Zellen waren deutlich reduziert und zeigten zudem eine etwas geringere CD21-Expression (Abb. 3.15, Tab. 3.3). Es konnte somit ein entwicklungsspezifischer B-Zell-Defekt beim Übergang vom T1 in das T2 Stadium in der Milz ermittelt werden.

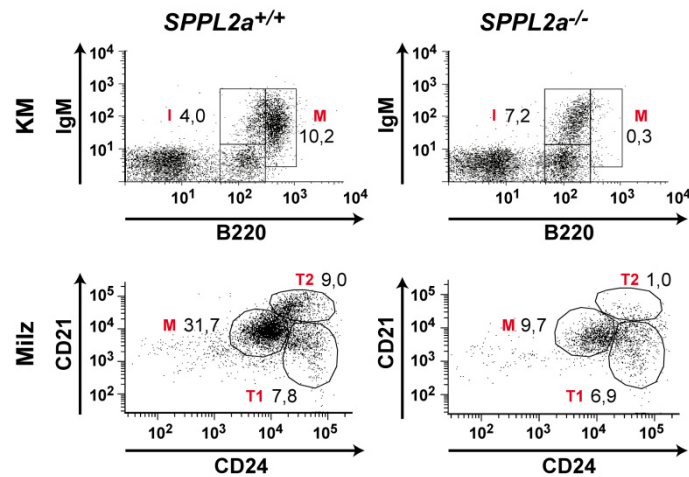


Abb. 3.15: Identifizierung eines entwicklungspezifischen B-Zell-Defektes in *SPPL2a*^{-/-} Mäusen. Die Anzahl von Pro-/Pre-, immaturren (I) sowie rezirkulierenden maturaen (M) B-Zellen wurde im Knochenmark *SPPL2a*-defizienter Mäuse und vergleichbarer Wildtyp-Kontrolltiere durchflusszytometrisch analysiert. Hierfür wurde eine Kofärbung der Oberflächenmarker B220 und IgM durchgeführt. Dargestellt sind die lebenden Lymphozyten. Die Zahlen zeigen den prozentualen Anteil der jeweiligen Population an den lebenden (PI) Zellen. Die verschiedenen Reifungsstadien in der Milz, T1, T2 und mature (M) B-Zellen wurden durch die Kofärbung von B220, CD21 und CD24 unterschieden. Im *Dot Plot* gezeigt sind die lebenden, B220-positiven Zellen. Die Zahlen beschreiben den prozentualen Anteil der Stadien an den lebenden (PI) Zellen. Der Entwicklungsdefekt *SPPL2a*-defizienter B-Zellen liegt beim Übergang vom T1 in das T2 Stadium in der Milz. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment.

3.5.5 Defizienz verschiedener B-Zell-Subpopulationen

Während der B-Zell-Reifung können aus den unreifen Vorstufen verschiedene Subpopulationen maturaer B-Zellen hervorgehen. So unterscheidet man in der Milz vor allem zwischen follikulären und Marginalzonen B-Zellen, die über ihre voneinander abweichende Expression von CD21 und CD23 differenziert werden können (Pillai *et al.* 2005). Eine genauere Unterteilung in follikuläre ($B220^+ CD21^{+/-} CD23^+$) und Marginalzonen B-Zellen ($B220^+ CD21^{++} CD23^{+/-}$), zeigte, dass beide, in der Milz vertretenen reifen Subpopulationen, gleichermaßen von diesem Defekt betroffen waren (Tab. 3.3). Neben diesen beiden B-Zell-Arten, die man auch als B2-B-Zellen bezeichnet, gibt es die sogenannten B1 B-Zellen. Sie unterscheiden sich von B2 B-Zellen vor allem in der Expressionsstärke von B220 im Verhältnis zu CD19 (Ghosn *et al.* 2011) und sind im Gegensatz zu follikulären B-Zellen, die vor allem Proteinantigene erkennen, überwiegend für Polysaccharidantigene spezifisch, die zu ihrer T-Zell-unabhängigen Aktivierung führen (Allman & Pillai 2008). Da die Immunisierung mit dem T-Zell-unabhängigen Antigen TNP-Ficoll kaum eine Immunantwort auslöste (Abb. 3.13a), konnte angenommen werden, dass in den *SPPL2a*^{-/-} Mäusen die B1 B-Zell-Population ebenfalls betroffen ist.

Zur Prüfung dieser Frage wurden Peritonealzellen, die für ihren großen Anteil an B1 B-Zellen bekannt sind, aus *knock-out*- und passenden Wildtyp-Kontrolltieren durchflusszytometrisch auf ihre B220- und CD19-Expression überprüft. Die SPPL2a-defizienten Tiere zeigten eine signifikante Reduktion sowohl der B2 als auch der B1 B-Zell-Population (Abb. 3.16, Tab. 3.3).

Tab. 3.3: B-Zell-Populationen in Knochenmark, Milz und dem Peritonealraum von Wildtyp- und SPPL2a-defizienten Mäusen.

Zelltyp		<i>SPPL2a</i> ^{+/+}		<i>SPPL2a</i> ^{-/-}		P
		MW	Stabw	MW	Stabw	
<u>Knochenmark (% lebender Zellen)</u>						
B-Zellen	B220 ⁺	21,4	6,1	15,3	2,5	0,031*
Pro-/pre-B-Zellen	B220 ⁺ IgM ⁻	8,5	1,9	10,3	2	0,099
Unreife B-Zellen	B220 ⁺ IgM ⁺	3,6	1,9	4,1	2,3	0,694
Rezirkulierende B-Zellen	B220 ⁺⁺	8,6	3,6	0,7	0,2	<0,001***
<u>Milz (% lebender Zellen)</u>						
B-Zellen	B220 ⁺	45,6	6,6	23,9	13,1	<0,001***
T1 Transitional	B220 ⁺ CD21 ^{+/-} CD24 ⁺⁺	7,5	0,7	8,2	4,9	0,785
T2 Transitional	B220 ⁺ CD21 ⁺⁺ CD24 ⁺⁺	11,2	3,1	0,5	0,6	<0,001***
Reife B-Zellen	B220 ⁺ CD21 ^{+/-} CD24 ^{+/-}	23,9	7,1	7,0	4,4	0,007**
<u>Milz (x10⁶ Splenozyten)</u>						
B-Zellen	B220 ⁺	33,3	13,5	4,2	2,2	0,021*
T1 Transitional	B220 ⁺ CD21 ^{+/-} CD24 ⁺⁺	5,2	2,3	1,8	0,6	0,056
T2 Transitional	B220 ⁺ CD21 ⁺⁺ CD24 ⁺⁺	7,9	2,9	0,1	0,1	0,013*
Reife B-Zellen	B220 ⁺ CD21 ^{+/-} CD24 ^{+/-}	17,8	7,3	1,8	1,2	0,021*
Follikuläre B-Zellen	B220 ⁺ CD21 ^{+/-} CD23 ⁺	29,5	8,5	8,7	4,1	0,023*
Marginalzonen B-Zellen	B220 ⁺ CD21 ⁺⁺ CD23 ^{+/-}	4,6	1,6	1,3	0,2	0,026*
<u>Peritonealzellen (% lebender Zellen)</u>						
B-Zellen	B220 ⁺ CD19 ⁺	49,2	10,8	11,4	5,0	<0,001***
B1	B220 ^{+/-} CD19 ⁺⁺	34,2	13,8	6,7	4,7	<0,001***
B2	B220 ⁺⁺ CD19 ^{+/-}	15,1	6,9	2,1	1,7	0,001**

Die Zellen beider Genotypen wurden durchflusszytometrisch analysiert und die verschiedenen B-Zell-Populationen sowohl als % lebender Zellen (Propidiumiodid negativ) wie auch der absoluten Zellzahl bestimmt. Knochenmark: n=7, Milz: n=9, Blut: n=6, Lymphknoten: n=5, Peritonealzellen: n=12. Gezeigt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen, ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05, ungepaarter t-Test.

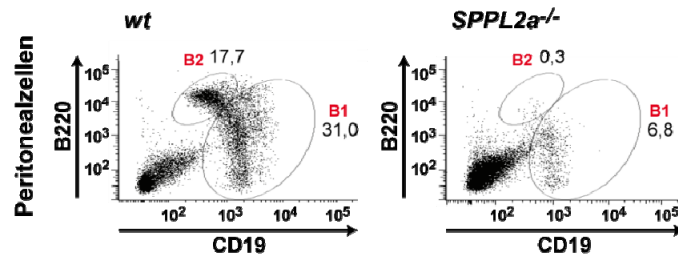


Abb. 3.16: Durchflusszytometrische Analyse der B1 und B2 B-Zellen im Peritonealraum *SPPL2a*-defizienter Mäuse. Die beiden Zellpopulationen wurden durch eine Kofärbung von B220 und CD19 voneinander getrennt. Sowohl die B1 ($B220^{+/}$, $CD19^{++}$) als auch die B2 B-Zellen ($B220^{++}$, $CD19^{+/}$) sind in den *SPPL2a*^{-/-} Tieren im Vergleich zum Wildtyp (*wt*) reduziert. Im *Dot Plot* gezeigt sind die lebenden Zellen (PI) von einem repräsentativen Experiment. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der jeweiligen Population an den lebenden Zellen an.

3.5.6 Ausschluss eines Stromazell-Defektes als Ursache für die B-Zell-Defizienz

B-Zell-Entwicklung und -Maturierung sind keine zellautonomen Prozesse sondern erfolgen in Abhängigkeit von Signalen, die von benachbarten Zellen ausgesendet werden (Kurosaka *et al.* 1999). Grundsätzlich waren daher zwei verschiedene Entstehungswege für den Entwicklungsdefekt in *SPPL2a*^{-/-} Tieren denkbar. Zum einen konnte die Ursache in einer der hämatopoietischen Zelllinien wie beispielsweise den B-Zellen selbst zu finden sein. Andererseits war auch ein Defekt denkbar, der von den Stromazellen ausging, also den umgebenden Gewebezellen, die nicht hämatopoietischen Ursprungs waren. Aus diesem Grund wurden T1, T2 und mature B-Zellen zunächst auf ihre *SPPL2a*-Expression untersucht. Hierfür wurden die verschiedenen Populationen durchflusszytometrisch isoliert und *SPPL2a* in den Proteinlysaten durch *Western blot* detektiert. *SPPL2a* konnte in allen drei Entwicklungsstadien nachgewiesen werden (Abb. 3.17). Dies machte einen B-Zell-intrinsischen Defekt in den *SPPL2a*^{-/-} Mäusen wahrscheinlich.

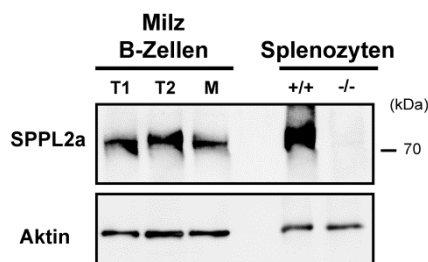


Abb. 3.17: T1, T2 und mature B-Zellen der Milz von Wildtyp-Mäusen exprimieren *SPPL2a*. Die Sortierung und Isolierung der Zellen erfolgte mit Hilfe von Durchflusszytometrie. Die Auftrennung der Lysate (10 µg/Spur) erfolgte durch SDS-PAGE unter Verwendung eines Tris-Glycin-Puffersystems. Die Detektion von Aktin diente als Kontrolle für die Proteinbeladung des Gels. Splenozytenlysate aus Wildtyp- und *SPPL2a*^{-/-} Tieren dienen der Kontrolle der Antikörperspezifität. Gezeigt ist eines von zwei unabhängigen Experimenten.

Um jedoch einen Beitrag der Stromazellen zu dem beobachteten Entwicklungsdefekt sicher auszuschließen, wurden Knochenmarktransplantationen in Kooperation mit Prof. Dr. Ralf

Dressel, Dr. Michael Engelke und Dr. Kai Dittmann (Abteilung Zelluläre und Molekulare Immunologie, Georg-August-Universität Göttingen) durchgeführt. Knochenmarkzellen von Wildtyp- oder *SPPL2a*^{-/-} Mäusen wurden in bestrahlte *Rag2*^{-/-}*cyc*^{-/-} Mäuse übertragen, die keine B-, T- oder funktionale NK-Zellen aufweisen. *Rag2*^{-/-}*cyc*^{-/-} Mäuse welche mit *SPPL2a*^{-/-} Knochenmark transplantiert wurden, entwickelten einen Phänotyp, welcher mit dem der *SPPL2a*-knock-out-Mäuse vergleichbar war, wohingegen Wildtyp-Knochenmark in der Lage war, eine normale B-Zell-Entwicklung zu induzieren (Abb. 3.18, Tab. 3.4). Diese Beobachtung ist mit der Annahme eines B-Zell-intrinsischen Defektes vereinbar.

Tab. 3.4: B-Zell-Populationen in *Rag2*^{-/-}*cyc*^{-/-} Mäusen zehn Wochen nach der Transplantation von Knochenmark aus *SPPL2a*^{+/+} (n=8) oder *SPPL2a*^{-/-} (n=8) Mäusen.

Zelltyp		<i>SPPL2a</i> ^{+/+}		<i>SPPL2a</i> ^{-/-}		P
		MW	Stabw	MW	Stabw	
<u>Knochenmark (% lebender Zellen)</u>						
B-Zellen	B220 ⁺	11,8	3,3	10,9	5,3	0,694
Pro-/pre-B-Zellen	B220 ⁺ IgM ⁻	6,2	0,6	7,7	2,5	0,136
Unreife B-Zellen	B220 ⁺ IgM ⁺	6,0	1,9	5,1	1,8	0,362
Rezirkulierende B-Zellen	B220 ⁺⁺	2,6	1,3	0,3	0,1	<0,001***
<u>Milz (% lebender Zellen)</u>						
B-Zellen	B220 ⁺	41,6	1,3	20,8	6,9	<0,001***
T1 Transitional	B220 ⁺ CD21 ^{+/-} CD24 ⁺⁺	6,4	1,7	11,1	3,8	0,018*
T2 Transitional	B220 ⁺ CD21 ⁺⁺ CD24 ⁺⁺	2,9	0,3	0,2	0,1	<0,001***
Reife B-Zellen	B220 ⁺ CD21 ^{+/-} CD24 ^{+/-}	24,2	3,6	3,2	2,0	<0,001***
T-Helferzellen	CD3 ⁺ CD4 ⁺	10,0	2,4	14,9	3,5	0,038*
Zytotoxische T-Zellen	CD3 ⁺ CD8 ⁺	2,5	0,5	6,0	2,7	0,004**
<u>Milz (x10⁶ Splenozyten)</u>						
B-Zellen	B220 ⁺	42,5	7,9	11,3	5,2	<0,001***
T1 Transitional	B220 ⁺ CD21 ^{+/-} CD24 ⁺⁺	7,3	1,5	5,7	2,4	0,300
T2 Transitional	B220 ⁺ CD21 ⁺⁺ CD24 ⁺⁺	3,0	0,2	0,1	0,1	<0,001***
Reife B-Zellen	B220 ⁺ CD21 ^{+/-} CD24 ^{+/-}	22,7	4,2	1,9	1,5	<0,001***
T-Helferzellen	CD3 ⁺ CD4 ⁺	9,6	2,7	7,8	3,3	0,194
Zytotoxische T-Zellen	CD3 ⁺ CD8 ⁺	2,4	0,5	2,8	1,3	0,671

Knochenmark von *SPPL2a*^{+/+} oder *SPPL2a*^{-/-} Mäusen wurde in bestrahlte *Rag2*^{-/-}*cyc*^{-/-} Mäuse transplantiert. Knochenmark und Milz wurden zehn Wochen nach der Transplantation durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der jeweiligen Zellpopulation an den lebenden Zellen, (PI, n=8), (KM, Milz) sowie die absoluten Zellzahlen (n=5), (Milz). Gezeigt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen, ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05, ungepaarter t-Test.

Zusammenfassend belegten die durchflusszytometrischen Analysen eine Störung der B-Zell-Entwicklung beim Übergang vom Transitional 1 in das Transitional 2 Stadium in der Milz SPPL2a-defizienter Mäuse (Abb. 3.15, Tab. 3.3). Es wurde gezeigt, dass die Ursache hierfür in den Zellen hämatopoietischen Ursprungs, vermutlich den B-Zellen selbst, zu finden ist (Abb. 3.17, Tab. 3.4, Abb. 3.18).

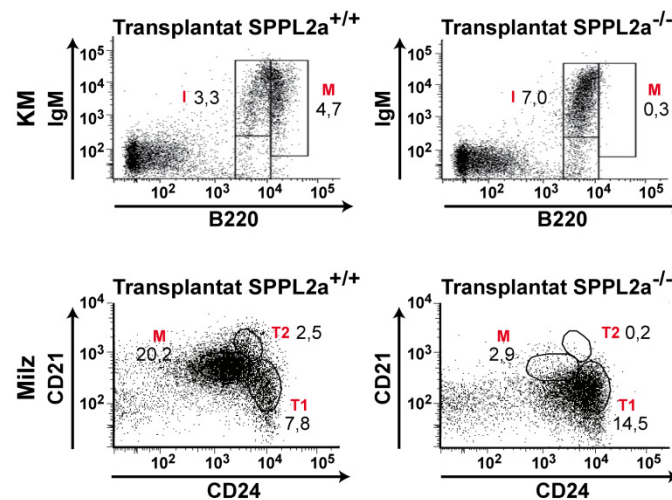


Abb. 3.18: Durchflusszytometrische Analyse der B-Zell-Reifung nach Knochenmarkstransplantation. Knochenmark von Wildtyp- oder SPPL2a-defizienten Mäusen wurde in bestrahlte *Rag2^{-/-}cyc^{-/-}* Mäuse transplantiert. Nach zehn Wochen wurden die B-Zell-Populationen in Knochenmark (KM) und Milz durchflusszytometrisch untersucht. Pre-/Pro-, immature und reife B-Zellen im Knochenmark wurden durch eine Kofärbung von B220 und IgM getrennt. Der *Dot Plot* zeigt die Lymphozyten von einem repräsentativen Experiment. Die Zahlen stellen den prozentualen Anteil an den lebenden Zellen (PI) dar. Die verschiedenen Reifungsstadien in der Milz, T1, T2 und mature (M) B-Zellen wurden durch die Kofärbung von B220, CD21 und CD24 unterschieden. Im *Dot Plot* gezeigt sind die B220-positiven Zellen von einem repräsentativen Experiment. Die Zahlen beschreiben den prozentualen Anteil der Stadien an den lebenden (PI) Zellen. Die Empfänger des SPPL2a^{-/-} Knochenmarks entwickelten den gleichen B-Zell-Defekt wie die SPPL2a^{-/-} Mäuse.

3.5.7 Untersuchung wichtiger Signalwege in SPPL2a-defizienten B-Zellen

Um weitere Hinweise über die mögliche molekulare Ursache für den beobachteten Maturierungsdefekt zu erhalten, wurden die beiden wichtigsten Signalwege in B-Zellen, die für die Differenzierung vom T1 zum T2 Stadium eine zentrale Rolle spielen, näher untersucht. Die Signale, die vom B-Zell-Rezeptor selbst ausgehen, sind absolut entscheidend für das Überleben und die Differenzierung von B-Zellen (Khan 2009). Eine Stimulierung des B-Zell-Rezeptors führt unter anderem zu einer Freisetzung von Ca²⁺ aus dem Endoplasmatischen Retikulum und infolgedessen zum Einstrom von Ca²⁺ über die Plasmamembran in die Zelle. Somit kann anhand von Messungen der intrazellulären Ca²⁺ Konzentrationen nach BCR-Stimulation eine Aussage über die Funktionalität dieses Signalweges getroffen werden

(Scharenberg *et al.* 2007). Diese Versuche wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Ralf Dressel, Dr. Michael Engelke und Dr. Kai Dittmann (Abteilung Zelluläre und Molekulare Immunologie, Georg-August-Universität Göttingen) durchgeführt.

Splenozyten aus *SPPL2a*^{-/-} Mäusen und entsprechenden Wildtyp-Kontrolltieren wurden mit Antikörpern gegen B220, CD24 und CD21 gefärbt und mit dem Ca²⁺-sensitiven Fluorophor Indo-1-AM inkubiert. Es wurde spezifisch der Ca²⁺ Einstrom in den T1 B-Zellen (B220⁺, CD24⁺, CD21⁻) analysiert. Hierfür wurden die Zellen mit Ziege anti-Maus IgM F (ab')₂ Fragmenten stimuliert und die Ca²⁺ Freisetzung aus den intrazellulären Speichern in Ca²⁺ freiem Medium detektiert. Danach wurde dem Kulturmedium 1 mM CaCl₂ zugegeben, um den Ca²⁺ Einstrom über die Plasmamembran zu untersuchen. Während die Ca²⁺ Freisetzung aus den intrazellulären Speichern in Wildtyp- und *SPPL2a*^{-/-} Mäusen vergleichbar zu sein schien, zeigte sich ein deutlich schwächerer Einstrom extrazellulären Ca²⁺ über die Plasmamembran (Abb. 3.19).

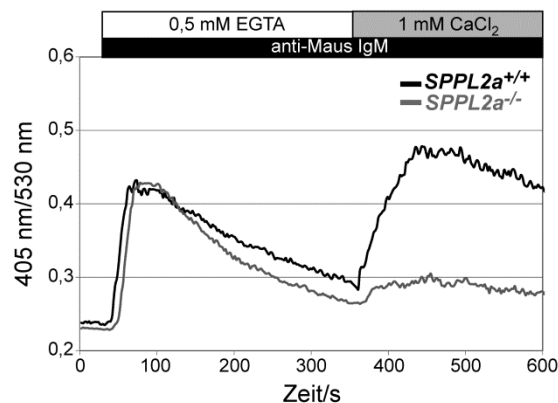


Abb. 3.19: Störung der Ca²⁺ Freisetzung nach B-Zell-Rezeptorstimulation in *SPPL2a*^{-/-} T1 B-Zellen. Splenozyten von *SPPL2a*^{-/-} und Wildtyp-Mäusen wurden mit Antikörpern gegen B220, CD21 und CD23 gefärbt und mit dem Ca²⁺ sensitiven Fluorophor Indo-1-AM inkubiert. Für die Analyse wurden spezifisch die T1 B-Zellen (B220⁺, CD24⁺, CD21⁻) betrachtet. Nachdem die basalen Ca²⁺ Konzentrationen über einen Zeitraum von 30 Sekunden gemessen wurden, erfolgte die Stimulierung der Zellen mit Ziege anti-Maus IgM F (ab')₂ Fragmenten und der Ca²⁺ Einstrom wurde über 5 Minuten in Abwesenheit von extrazellulärem Ca²⁺ und für weitere 5 Minuten unter Zugabe von 1 mM extrazellulärem Ca²⁺ gemessen. Während die Ca²⁺ Freisetzung aus den intrazellulären Speichern in Wildtyp- und *knock-out*-T1 Zellen vergleichbar zu sein scheint, ist der Einstrom über die Plasmamembran in den *SPPL2a*^{-/-} Zellen deutlich reduziert. Die Abbildung ist repräsentativ für drei durchgeführte Experimente.

Ein weiteres Signal, welches bei der Reifung vom T1 zum T2 Stadium von entscheidender Bedeutung ist, geht von der Bindung des Zytokins BAFF an einen seiner drei Rezeptoren, den BAFF-Rezeptor aus. BAFF-Rezeptor-Signale führen zu einer Aktivierung des alternativen NF-κB-Signalweges und dadurch zu einer verstärkten Expression antiapoptotisch wirkender

Proteine der Bcl-2-Familie (MacKay & Schneider 2009). Es wurde daher überprüft, ob der BAFF-Rezeptor in den *SPPL2a*^{-/-} Tieren eine mit dem Wildtyp vergleichbare B-Zell-Oberflächenexpression zeigt. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch. Hierfür wurden B220-positive Zellen über magnetische Zellsortierung isoliert und mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern gegen CD21, CD24 und BAFF-Rezeptor gefärbt. Es wurden spezifisch die T1 Zellen (CD24⁺, CD21⁻) von Wildtyp- und *knock-out*-Tieren verglichen. In den *SPPL2a*^{-/-} Mäusen konnte eine Reduktion des BAFF-Rezeptors an der Oberfläche der T1 Zellen gemessen werden (Abb. 3.20).

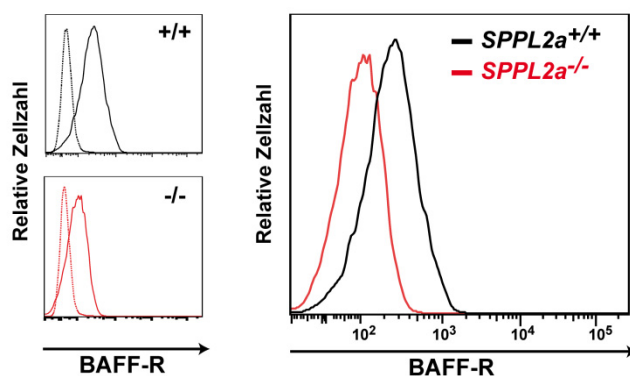


Abb. 3.20: Reduzierte BAFF-Rezeptor-Expression auf der Oberfläche SPPL2a-defizienter T1 B-Zellen. B220⁺ Zellen wurden aus Milzen von Wildtyp- und *SPPL2a*^{-/-} Mäusen isoliert und mit Antikörpern gegen CD21, CD24 und BAFF-Rezeptor gefärbt. T1 B-Zellen (CD24⁺, CD21⁻) wurden durchflusszytometrisch auf ihre BAFF-Rezeptorexpression untersucht. *SPPL2a*-defiziente Zellen zeigen eine Reduktion der Expression im Vergleich zu Wildtyp-Zellen. Die Abbildung ist repräsentativ für drei durchgeführte Experimente. Die kleinen links aufgeführten Histogramme zeigen die Isotypkontrollen (gestrichelte Linie).

Es sollte daher weiter untersucht werden, ob die geringere Oberflächenexpression des BAFF-Rezeptors in *SPPL2a*-defizienten T1 B-Zellen zu einer geringeren Aktivierung des alternativen NF- κ B-Signalweges und infolgedessen zu einer geringeren Expression eines der Zielgene, Bcl-2, führt.

Hierfür wurden IgM-positive Zellen durch magnetische Zellsortierung gewonnen, die Zellkerne daraus isoliert und aus diesen Proteinlysate hergestellt. Mit Hilfe eines ELISAs wurde die Konzentration von aktivem NF- κ B bestimmt. Eine DNA-Sequenz, die von aktiviertem NF- κ B erkannt wurde, wurde auf ELISA-Platten immobilisiert. Bei Zugabe der Kernextrakte konnte darin enthaltener aktivierter Transkriptionsfaktor an die Sequenz binden. Dieser wurde anschließend durch die Inkubation mit HRP-gekoppelten Antikörpern gegen vier verschiedene Mitglieder der NF- κ B Familie (p50, p52, p65, RelB) detektiert. Entgegen der Erwartungen zeigte sich keine Reduktion der NF- κ B-Aktivierung. Stattdessen war die Menge von aktiviertem p50, p52 und RelB signifikant erhöht (Abb. 3.21).

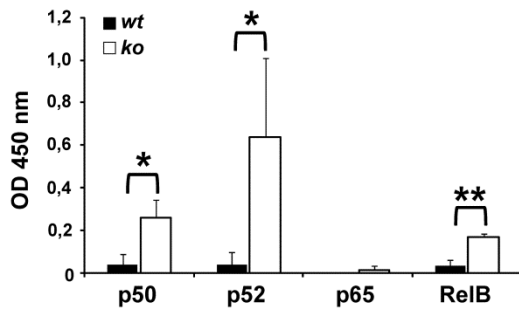


Abb. 3.21: Erhöhte Aktivierung von NF-κB in Kernextrakten von *SPPL2a*^{-/-} IgM⁺ Zellen der Milz. IgM⁺ Zellen aus Milzen von Wildtyp- und *SPPL2a*^{-/-} Tieren (n=3) wurden durch magnetische Zellsortierung isoliert. Es wurden Kernextrakte aus den Zellen hergestellt und die Konzentrationen von aktiviertem NF-κB (p50, p52, p65 und RelB) durch ELISAs analysiert. Die detektierte Menge von p50, p52 und RelB ist in den *SPPL2a*^{-/-} Extrakten signifikant erhöht. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte ± Stabw., **P<0.01, *P<0.05, ungepaarter t-Test.

Zur Absicherung dieses Ergebnisses wurden p52 und seine inaktive Vorstufe p100 zusätzlich durch einen *Western blot* von IgM-positiven Zellen der Milz aus *SPPL2a*^{-/-} und Wildtyp-Mäusen analysiert. Das NF-κB-Mitglied NF-κB2 wird als Vorläuferprotein mit einem Molekulargewicht von 100 kDa (p100) synthetisiert. Mit der Aktivierung des Transkriptionsfaktors geht dessen Prozessierung in ein Protein von 52 kDa einher (p52). Das Verhältnis von p52 zu p100 sagt daher etwas über den Aktivierungsstatus des Transkriptionsfaktors aus. Obwohl im *Western blot* in den *SPPL2a*^{-/-} Zellen eine geringere Menge der inaktiven Vorstufe p100 detektiert werden konnte, konnte keine Erhöhung der aktiven p52 Form festgestellt werden (Abb. 3.22). Der starke Anstieg von aktivem p52, der durch den ELISA detektiert wurde, konnte somit nicht bestätigt werden. Allerdings wurde auch hier keine Verringerung der Aktivität, wie man sie infolge der reduzierten BAFF-R-Oberflächenexpression erwarten könnte, nachgewiesen.

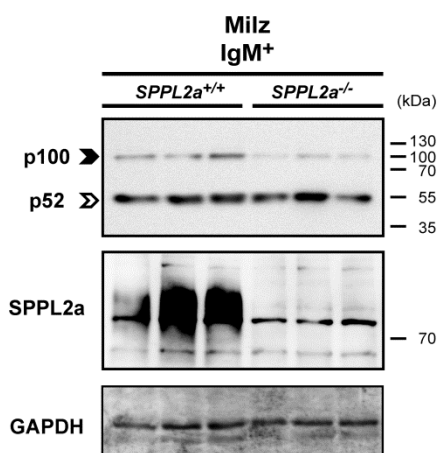


Abb. 3.22: IgM-positive B-Zellen aus Milzen von *SPPL2a*-defizienten Mäusen zeigen keine veränderte Aktivierung von NF-κB2. Die IgM⁺ Zellen von Wildtyp- und *SPPL2a*^{-/-} Tieren (n=3) wurden durch magnetische Zellsortierung isoliert und Proteinlysate daraus hergestellt. Die Auftrennung der Lysate (10 µg/Spur) erfolgte durch SDS-PAGE unter Verwendung eines Tris-Glycin-Puffersystems. Der Antikörper gegen NF-κB2 erkannte sowohl die inaktive (p100) als auch die aktive (p52) Form des Transkriptionsfaktors. Die Detektion von GAPDH diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung des Gels. Die hier verwendeten Lysate wurden für weitere *Western blot* Analysen genutzt (Abb. 3.26).

Eines der Zielgene von aktiviertem NF-κB in B-Zellen ist Bcl-2 (He *et al.* 2004). Eine veränderte Aktivierung dieses Signalweges sollte sich daher auch in der Bcl-2-Expression widerspiegeln. Daher wurden Proteinlysate aus IgM-positiven B-Zellen von *SPPL2a*^{-/-} und Wildtyp-Mäusen hergestellt und die Menge an Bcl-2-Protein durch *Western blot* detektiert. Es

zeigte sich kein Unterschied zwischen der Expression in Wildtyp- und SPPL2a-defizienten Zellen (Abb. 3.23).

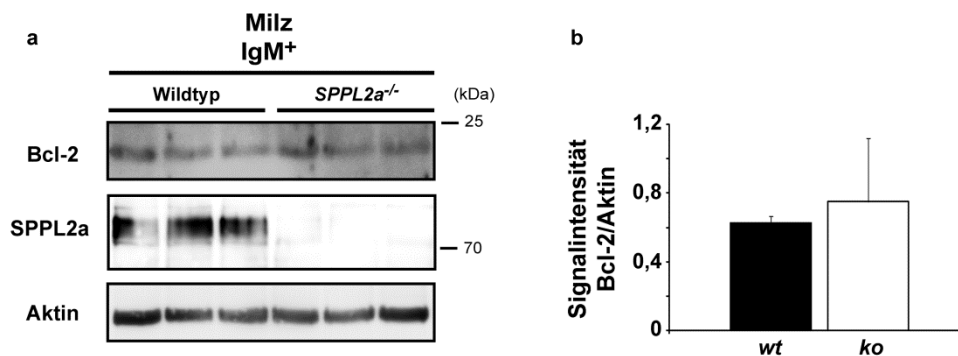


Abb. 3.23: IgM-positive B-Zellen aus Milzen von SPPL2a-defizienten Mäusen zeigen keine veränderte Bcl-2-Expression. (a) IgM⁺ Zellen von Wildtyp- und SPPL2a^{-/-} Tieren (n=3) wurden durch magnetische Zellsortierung isoliert und Proteinlysate daraus hergestellt. Die Auftrennung der Lysate (20 µg/Spur) erfolgte durch SDS-PAGE unter Verwendung eines Tris-Glycin-Puffersystems. Die Detektion von Aktin diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung. (b) Quantifizierung der Signalintensitäten von Bcl-2 im Verhältnis zur entsprechenden Aktinkontrolle (a). Gezeigt ist der Mittelwert von Wildtyp- und ko-Tieren ± Stabw., ungepaarter t-Test.

3.6 Die Intramembranproteolyse der invarianten Kette (CD74) durch SPPL2a und deren Bedeutung für die murine B-Zell-Entwicklung

3.6.1 SPPL2a und SPPL2b prozessieren CD74 bei Überexpression

Das Forschen nach der molekularen Ursache des entdeckten B-Zell-Defektes in SPPL2a^{-/-} Mäusen führte zu der Suche neuer Substrate von SPPL2a, die mit der Entwicklung dieser Zellen in Verbindung stehen könnten. Ein Protein, welches die grundlegenden Anforderungen eines SPPL2a-Substrates erfüllt, ist das Typ II Transmembranprotein invariante Kette (CD74). Dieses Chaperon von MHCII unterliegt in den MHCII-Kompartimenten der stufenweisen proteolytischen Degradierung. Bei dem letzten beschriebenen proteolytischen Schnitt, handelt es sich um die Intramembranproteolyse eines verbleibenden N-terminalen Fragmentes (NTF) von etwa 80 Aminosäuren, welche zur Freisetzung einer intrazellulären Domäne (ICD) führt. Es wird diskutiert, dass diese ICD als Transkriptionsfaktor agieren kann und als solcher essentiell für die weitere Reifung von B-Zellen in der Milz ist (Matza *et al.* 2003). Die Protease, welche diesen letzten Intramembranschnitt katalysiert, wurde bisher nicht identifiziert. Die endosomale Lokalisation, die Typ II Topologie sowie die vorausgehende Proteolyse durch andere Proteasen machen CD74 jedoch zu einem potenziellen Substrat von SPPL2a.

Um dies zu prüfen, wurden Koexpressionsstudien in HEK293-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen entweder mit CD74p31-HA (p31 Isoform von CD74 mit HA-Epitop) allein oder in Kombination mit der aktiven beziehungsweise inaktiven (D416A) Form von SPPL2a transfiziert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die ausschließlich mit dem Leervektor transfiziert wurden. In den CD74p31-HA transfizierten Zellen und den mit der inaktiven Form von SPPL2a kotransfizierten Zellen war ein Fragment mit einem Molekulargewicht zwischen 10 und 15 kDa durch einen Antikörper gegen den N-Terminus von CD74 deutlich im *Western blot* detektierbar. Es war möglich, dass es sich hierbei um das etwa 80 Aminosäuren lange, membrangebundene CD74-NTF handelte. Das Fragment konnte bei der Kotransfektion mit der aktiven Form von SPPL2a nicht detektiert werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass SPPL2a bei Überexpression in der Lage ist, CD74 zu prozessieren. Ein Fragment, welches der freigesetzten intrazellulären Domäne von CD74 entsprechen könnte, war jedoch im *Western blot* nicht nachweisbar (Abb.3.24).

Interessanterweise zeigte auch die Kotransfektion mit der aktiven Form von SPPL2b ein Verschwinden des NTFs. Bei Kotransfektion mit der als inaktiv beschriebenen Form von SPPL2b (D414A), (Fluhrer *et al.* 2006) war das Fragment etwas schwächer detektierbar als bei Kotransfektion mit inaktivem SPPL2a oder CD74p31-HA allein. Es konnte jedoch auch hier deutlich nachgewiesen werden (Abb.3.24). Unter Überexpressionsbedingungen ist demnach auch SPPL2b befähigt, CD74-NTF zu schneiden. Da SPPL2b-defiziente Mäuse jedoch keinen B-Zell-Phänotyp aufweisen, war es wichtig, die Prozessierung von CD74 durch die beiden Proteasen endogen zu analysieren.

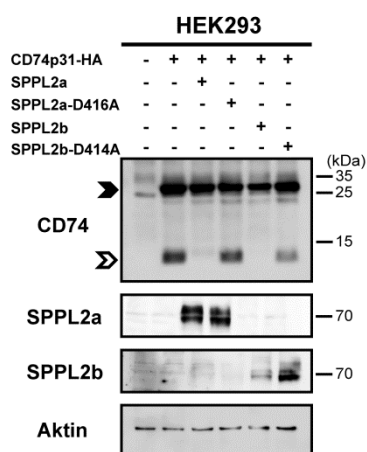


Abb. 3.24: Koexpression der aktiven SPPL2a- beziehungsweise SPPL2b-Form mit CD74 verhindert die Akkumulation des CD74-NTFs. HEK293-Zellen wurden entweder mit CD74 (CD74p31-HA) allein oder in Kombination mit der aktiven beziehungsweise inaktiven (D416A) Form von SPPL2a oder der aktiven beziehungsweise inaktiven (D414A) Form von SPPL2b transfiziert. Mit dem Leervektor transfizierte Zellen dienten als Kontrolle. Anschließend wurden Proteinlysate dieser Zellen (20 µg/Spur) durch SDS-PAGE unter Verwendung eines Tris-Glycin-Puffersystems aufgetrennt und durch *Western blot* analysiert. Für die Detektion von CD74 wurde ein Antikörper gegen den N-Terminus des Proteins, verwendet. Der schwarze Pfeil markiert das ungeschnittene CD74p31-HA. Der weiße Pfeil zeigt das CD74-NTF, welches, bei Transfektion mit CD74p31-HA allein, deutlich nachweisbar ist. Bei Kotransfektion mit der aktiven, nicht jedoch der inaktiven Form von SPPL2a oder SPPL2b fehlt das CD74-NTF. Die Detektion von Aktin diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung.

3.6.2 CD74 ist ein Substrat von SPPL2a *in vivo*

Um die Proteolyse von CD74 durch SPPL2a *in vivo* zu untersuchen, wurden Proteinlysate aus Wildtyp- und SPPL2a-defizienten Splenozyten elektrophoretisch aufgetrennt und mit dem Antikörper gegen den N-Terminus von CD74 auf dem *Western blot* detektiert. SPPL2a-defiziente Proben zeigten eine starke Akkumulation des bereits in den HEK293-Zellen nachgewiesenen Fragmentes zwischen 10 und 15 kDa. Diese Akkumulation war in den Wildtyp-Lysaten nicht nachweisbar. Eine weitere Bande war bei einem apparenten Molekulargewicht von 31 kDa detektierbar. Dabei handelte es sich vermutlich um die ungeschnittene p31 Form der beiden beschriebenen Isoformen (p31 und p41) von CD74 (Landsverk *et al.* 2009). Auffällig war, dass die Menge des ungeschnittenen CD74 in *SPPL2a*^{-/-} Splenozyten im Vergleich zum Wildtyp reduziert war (Abb. 3.25). Da jedoch B-Zellen die Hauptpopulation CD74 exprimierender Zellen in der Milz darstellen, konnte diese Reduktion auch die B-Zell-Defizienz widerspiegeln.

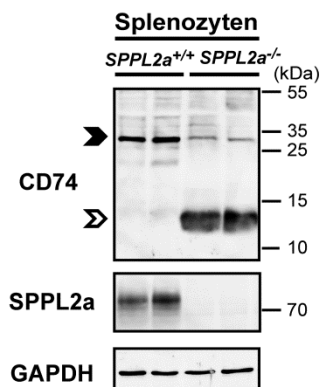


Abb. 3.25: Akkumulation des CD74-NTFs in SPPL2a-defizienten Splenozyten. Proteinlysate (20 µg/Spur) von jeweils zwei Wildtyp- und SPPL2a-defizienten Tieren wurden durch SDS-PAGE unter Verwendung eines Tris-Glycin-Puffersystems aufgetrennt und durch *Western blot* analysiert. Für die Detektion von CD74 wurde ein Antikörper gegen den N-Terminus des Proteins, verwendet. Der schwarze Pfeil markiert das ungeschnittene CD74p31. Der weiße Pfeil zeigt das CD74-NTF, welches in SPPL2a-defizienten Lysaten akkumuliert. Die Detektion von GAPDH diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung des Gels.

Um dies abzusichern, wurden Lysate IgM-positiver Zellen aus Milzen von Wildtyp- und *SPPL2a*^{-/-} Tieren (n=3) hergestellt und durch *Western blot* analysiert. Die Reduktion des ungeschnittenen CD74 in den *knock-out*-Tieren war hier nicht mehr zu beobachten, jedoch erschien die Akkumulation des CD74-NTF deutlicher (Abb. 3.26a). Diese Ergebnisse konnten in dendritischen Zellen, welche CD74 ebenfalls endogen exprimieren, bestätigt werden (Abb. 3.26b). Hierfür wurden diese von jeweils drei Tieren pro Genotyp aus hämatopoietischen Vorläuferzellen des Knochenmarks differenziert (*Bone marrow derived dendritic cells*, BMDCs), entweder mit LPS aktiviert oder unstimuliert belassen und daraus Proteinlysate hergestellt. Die Detektion von CD74 im *Western blot* erfolgte entsprechend der Vorgehensweise bei den Splenozyten.

Der proteolytische Schnitt, der der Intramembranproteolyse vorausgeht und aus dem das CD74-NTF hervorgeht, wird durch Cathepsin S katalysiert. Um sicherzustellen, dass es sich bei dem in den *SPPL2a*^{-/-} Zellen akkumulierenden Fragment tatsächlich um das durch Cathepsin S generierte NTF handelt, wurden zusätzlich Lysate IgM-positiver B-Zellen aus der Milz von *Cathepsin S*^{-/-} Mäusen hergestellt und durch *Western blot* auf die Prozessierung von CD74 untersucht. Hier konnte ebenfalls eine Fragment-Akkumulation festgestellt werden. Dieses NTF wies ein etwas höheres Molekulargewicht auf, als in *SPPL2a*^{-/-} Tieren und spiegelte somit die weiter C-terminal gelegene Schnittstelle von Cathepsin S wider. Im Vergleich zu dem in *SPPL2a*^{-/-} B-Zellen detektierten NTF akkumulierte das Cathepsin S-NTF jedoch etwas schwächer. Die Detektion von MHCII als Kontrolle für die Proteinbeladung zeigte eine zusätzliche Bande bei einem etwas höheren Molekulargewicht in den *Cathepsin S*^{-/-} Zellen. Dabei handelte es sich vermutlich um MHCII, welches durch die inhibierte Proteolyse von CD74 durch Cathepsin S noch an den N-terminalen Teil von CD74 gebunden war (Abb. 3.26a).

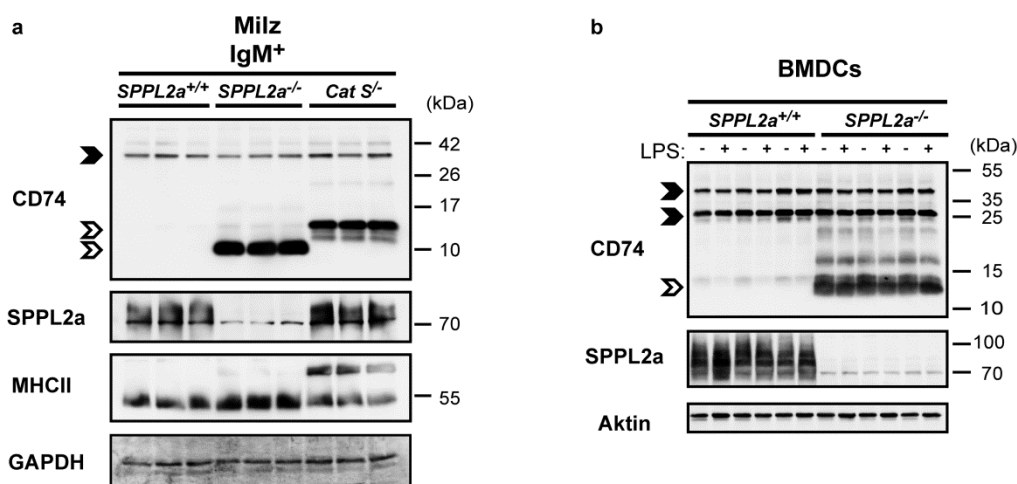


Abb 3.26: Akkumulation von CD74-NTF in *SPPL2a*- beziehungsweise *Cathepsin S*-defizienten IgM⁺ Zellen (a) und *SPPL2a*-defizienten dendritischen Zellen (b). (a) Proteinlysate IgM-positiver Zellen aus der Milz von Wildtyp- *SPPL2a*^{-/-} und *Cathepsin S*^{-/-} (*Cat S*^{-/-}) Tieren (n=3), (10 µg/Spur) wurden durch SDS-PAGE unter Verwendung eines Tris-Tricin-Puffersystems aufgetrennt. (b) Dendritische Zellen wurden aus Knochenmarkzellen von je drei Tieren pro Genotyp differenziert (*Bone marrow derived dendritic cells*, BMDCs) und entweder mit LPS stimuliert oder unstimuliert für die Herstellung von Proteinlysaten verwendet. Die Auftrennung der Proteine (20 µg/Spur) erfolgte durch SDS-PAGE unter Verwendung eines Tris-Glycin-Puffersystems. (a,b) Für die anschließende Detektion von CD74 im *Western blot* wurde ein Antikörper verwendet, der gegen den N-Terminus des Proteins gerichtet war. Die schwarzen Pfeile markieren die ungeschnittene CD74p31 beziehungsweise p41. Die weißen Pfeile zeigen die CD74-NTFs, welche in *SPPL2a*-beziehungsweise *Cathepsin S*-defizienten Zellen akkumulieren. Die Detektion von entweder MHCII und GAPDH (a) oder Aktin (b) diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung des Gels. Für die Detektion von MHCII wurden die Lysate vor dem Auftragen auf das Gel nicht erhitzt. Die Akkumulation von CD74-NTF ist in allen *SPPL2a*-beziehungsweise *Cathepsin S*-defizienten Proben deutlich zu erkennen und in *SPPL2a*^{-/-} BMDCs von der Stimulation mit LPS unabhängig. (a) Die hier verwendeten B-Zell-Lysate wurden für weitere *Western blot* Analysen genutzt (Abb. 3.22).

3.6.3 Die Bedeutung von SPPL2b für die Prozessierung von endogenem CD74

In Überexpressionsexperimenten wurde nachgewiesen, dass auch SPPL2b in der Lage ist, CD74 zu prozessieren. Im Gegensatz zu den SPPL2a-defizienten Mäusen zeigten *SPPL2b*^{-/-} Tiere jedoch keine vergleichbare Störung der B-Zell-Entwicklung (Abb. 3.8b, Tab. 3.2). Es sollte daher untersucht werden, ob dies auch mit dem Fehlen einer endogenen CD74-NTF-Akkumulation in den *SPPL2b*-knock-out-Mäusen einhergeht. Dies wurde in Lysaten aus IgM⁺ und aus Knochenmarkvorläuferzellen generierten dendritischen Zellen überprüft. Die SPPL2b-defizienten Zellen wiesen keine CD74-NTF-Akkumulation auf (Abb. 3.27). SPPL2a scheint somit unter physiologischen Bedingungen die wichtigste Protease für die Intramembranproteolyse von CD74 zu sein.

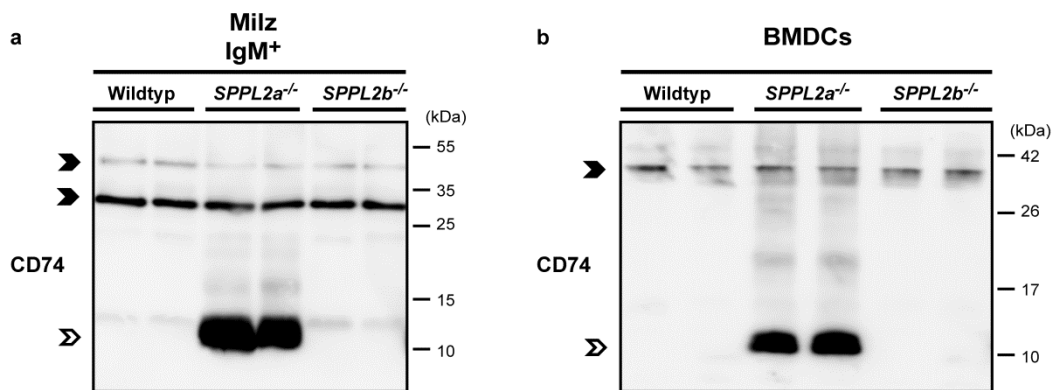


Abb 3.27: SPPL2b-defiziente IgM-positive B-Zellen der Milz und BMDCs zeigen keine Akkumulation eines CD74-NTFs. (a) IgM-positive Zellen wurden aus der Milz von Wildtyp-, *Spl2a*^{-/-} und *SPPL2b*^{-/-} Tieren (n=2) positiv selektiert und die Proteine daraus isoliert. Die Auftrennung der Lysate (10 µg/Spur) erfolgte durch SDS-PAGE unter Verwendung eines Tris-Glycin-Puffersystems. (b) Dendritische Zellen wurden aus Knochenmarkzellen differenziert (*Bone marrow derived dendritic cells*, BMDCs), mit LPS stimuliert und für die Herstellung von Proteinlysaten verwendet. Die Auftrennung der Proteine (10 µg / Spur) erfolgte durch SDS-PAGE unter Verwendung eines Tris-Tricin-Puffersystems. Für die Detektion von CD74 (a, b) wurde ein Antikörper verwendet, der gegen den N-Terminus des Proteins gerichtet war. Die schwarzen Pfeile markieren das ungeschnittene CD74p31 beziehungsweise CD74p41. Der weiße Pfeil zeigt das CD74-NTF, welches in *SPPL2a*^{-/-} Lysaten akkumuliert. Die Akkumulation des CD74-NTF ist in allen SPPL2a-defizienten Proben deutlich zu erkennen und fehlt in den *SPPL2b*^{-/-} Lysaten. Anhand des ungeschnittenen CD74p31 wurde die gleichmäßige Proteinbeladung überprüft.

3.6.4 Auswirkungen der fehlenden CD74-Intramembranproteolyse in den SPPL2a-defizienten B-Zellen

3.6.4.1 Akkumulation endosomaler Vesikel in *SPPL2a*^{-/-} B-Zellen

Die Entdeckung des B-Zell-Defektes in SPPL2a-defizienten Mäusen sowie die Identifizierung von CD74 als neues Substrat von SPPL2a führten zu der Frage, ob beide Prozesse miteinander in Verbindung stehen, das heißt, inwiefern die fehlende Proteolyse von CD74 in den SPPL2a-defizienten B-Zellen ursächlich für den Entwicklungsdefekt ist.

In der Literatur wird die Funktion der intrazellulären Domäne von CD74 als Signalmolekül für die B-Zell-Reifung beschrieben (Matza *et al.* 2003). Allerdings konnten weiterführende Arbeiten zeigen, dass Mäuse, die sowohl für CD74 als auch für MHCII defizient sind, eine normale B-Zell-Entwicklung zeigen (Maehr *et al.* 2004). Zudem scheint der Phänotyp in den *SPPL2a*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den *CD74*^{-/-} Mäusen sehr viel ausgeprägter zu sein (Shachar & Flavell 1996). Die Bedeutung der CD74-ICD für die B-Zell-Reifung muss daher kontrovers betrachtet werden.

In vorherigen Arbeiten wurde beschrieben, dass Überexpression von CD74 zu einer Anhäufung vergrößerter Vakuolen endosomalen Ursprungs und somit einer Störung des endosomalen Transports führt. Dem N-Terminus von CD74 wurde in diesem Zusammenhang eine entscheidende Funktion zugesprochen (Boes *et al.* 2005; Nordeng *et al.* 2002). Da in den SPPL2a-defizienten B-Zellen, ähnlich der Situation bei einer Überexpression, stark erhöhte Mengen des CD74-NTFs vorliegen (Abb., 3.25a, 3.27a), musste eine störende Wirkung dieses Fragmentes als ursächlich für den beobachteten B-Zell-Defekt in Erwägung gezogen werden. Um dies zu prüfen, wurden IgM-positive Zellen aus der Milz SPPL2a-defizienter und Wildtyp-Mäuse durch magnetische Zellsortierung isoliert und in Kooperation mit Prof. Dr. Renate Lüllmann-Rauch (Anatomisches Institut, CAU Kiel) elektronenmikroskopisch untersucht. Die Reinheit der isolierten B-Fractionen wurde jeweils durchflusszytometrisch durch die Detektion von B220 bestimmt, (Abb. 3.28) und betrug zwischen 80 und 90 Prozent.

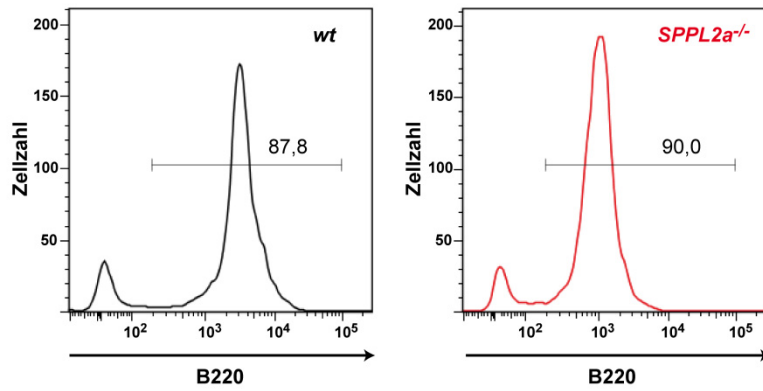


Abb. 3.28: Analyse der Reinheit IgM-positiv selektionierter B-Zellen aus der Milz von Wildtyp- und *SPPL2a*^{-/-} Mäusen. Die durch magnetische Zellsortierung isolierten B-Zellen wurden mit Propidiumiodid und einem Antikörper gegen B220 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Zahlen zeigen den prozentualen Anteil lebender (PI⁻) B-Zellen (B220⁺) von einem repräsentativen Experiment.

Tatsächlich zeigten die elektronenmikroskopischen Bilder eine vermehrte Anzahl an Vakuolen in den *SPPL2a*^{-/-} Zellen im Vergleich zum Wildtyp von denen viele luminale Einschlüsse geringer Elektronendichte aufwiesen (Abb. 3.29).

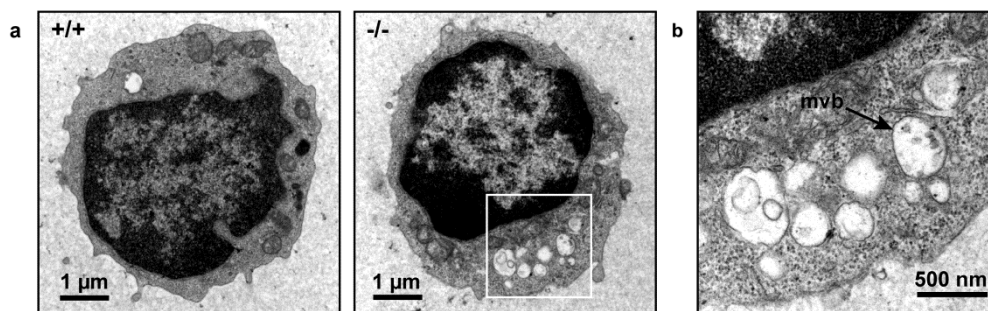


Abb. 3.29: Akkumulation von Vakuolen in *SPPL2a*-defizienten B-Zellen. (a) IgM⁺ B-Zellen aus Milzen von Wildtyp- und *SPPL2a*^{-/-} Mäusen wurden isoliert und deren Ultrastruktur mit Hilfe von Transmissionselektronenmikroskopie untersucht. Die *SPPL2a*^{-/-} Zellen weisen zahlreiche Vakuolen auf, welche in Wildtyp-Zellen nicht in dieser Anzahl zu finden sind. (b) Die Vakuolen in *SPPL2a*-defizienten IgM⁺ Zellen zeigen heterogene Einschlüsse von geringer Elektronendichte. Gelegentlich wurden multivesikuläre Körperchen gefunden.

Um diese Vakuolen näher zu charakterisieren, wurden immunoelektronenmikroskopische Analysen in Kooperation mit Dr. Eeva-Liisa Eskelinen (Department of Biosciences, Division of Biochemistry and Biotechnology, University of Helsinki) durchgeführt, in denen es möglich war, CD74, LAMP1 und MHCII-Komplexe innerhalb dieser Strukturen nachzuweisen und somit deren endosomalen/lysosomalen Ursprung zu belegen (Daten nicht gezeigt).

3.6.4.2 Die veränderte Ultrastruktur SPPL2a-defizienter B-Zellen ist abhängig von der Akkumulation des N-terminalen Fragmentes von CD74

Die fehlende Proteolyse von CD74 in SPPL2a-defizienten B-Zellen führt zu einer starken Akkumulation des CD74-NTFs (Abb. 3.25a, 3.27a). Zudem waren in den Zellen vermehrt CD74-positive Vakuolen zu finden (3.6.3, Abb. 3.29). Aufgrund von früheren Berichten, die eine Funktion des N-Terminus von CD74 für die Regulation des endosomalen Transportes beschreiben (Boes *et al.* 2005; Nordeng *et al.* 2002), lag die Vermutung nahe, dass die NTF-Akkumulation ursächlich für das Auftreten der beobachteten Vakuolen ist.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden SPPL2a-defiziente Mäuse mit *CD74*^{-/-} Mäusen verpaart, um SPPL2a/CD74 doppelt-defiziente Tiere zu generieren. In diesen Mäusen war somit eine CD74-NTF-Akkumulation ausgeschlossen. Sollte diese also ursächlich für die endosomalen Veränderungen und den B-Zell-Defekt sein, so war mit einer Verbesserung des Phänotyps in den doppelt-defizienten Mäusen zu rechnen.

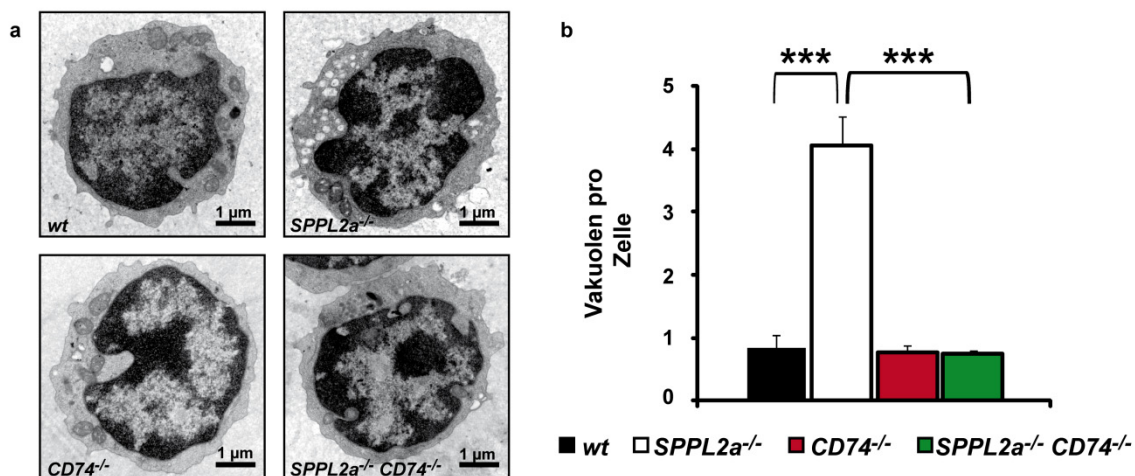


Abb. 3.30: Keine Akkumulation endosomaler Vakuolen in *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} B-Zellen. IgM⁺ Zellen aus der Milz von Wildtyp- (*wt*), *SPPL2a*^{-/-}, *CD74*^{-/-} und *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} Mäusen wurden isoliert und durch Transmissionselektronenmikroskopie untersucht. (a) Es ist jeweils eine repräsentative Zelle für jeden Genotyp gezeigt. (b) Die durchschnittliche Anzahl der Vakuolen (Durchmesser ≥ 250 nm) pro Zelle wurde gezählt. Hierfür wurden 50 Zellen pro Maus und drei (*CD74*^{-/-}, *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-}) beziehungsweise sechs (Wildtyp, *SPPL2a*^{-/-}) Mäuse pro Genotyp ausgewertet. In den *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} IgM⁺ Zellen ist die Anzahl der Vakuolen mit der im Wildtyp vergleichbar. Gezeigt sind die Mittelwerte ± Stabw., ***P<0.001, one-way ANOVA mit Bonferroni Post-hoc-Test. Gezeigt sind die Signifikanzen zwischen Wildtyp und *SPPL2a*^{-/-}, Wildtyp und *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-}, *SPPL2a*^{-/-} und *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} sowie *CD74*^{-/-} und *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-}.

In Kooperation mit Prof. Dr. Renate Lüllmann-Rauch (Anatomisches Institut, CAU Kiel) wurden IgM-positive B-Zellen aus Milzen aller vier Genotypen (Wildtyp, *SPPL2a*^{-/-}, *CD74*^{-/-}, *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-}) durch magnetische Zellsortierung isoliert und elektronenmikroskopisch

untersucht. Die doppelt-defizienten Zellen zeigten eine deutlich reduzierte Vakuolenanzahl im Vergleich zu *SPPL2a*^{-/-} Zellen, die mit der von Wildtyp- und *CD74*^{-/-} B-Zellen vergleichbar war (Abb. 3.30). Die Analyse von jeweils 50 Zellen pro Tier und drei Tieren pro Genotyp bestätigte diese Differenz als hoch signifikant (Abb. 3.30b). Somit konnte ein direkter Zusammenhang zwischen dem akkumulierenden NTF von CD74 und den Veränderungen des endosomalen Systems belegt werden.

3.6.4.3 Untersuchung wichtiger Signalwege in *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} Mäusen

Der nachgewiesene Zusammenhang zwischen akkumulierendem CD74-NTF in *SPPL2a*^{-/-} B-Zellen und der Störung des endosomalen Systems führte zu der Frage, ob und inwiefern diese Beobachtung mit dem Maturierungsdefekt der Zellen in Verbindung stehen könnte. Es ist bekannt, dass eine Reihe wichtiger Signalwege in den B-Zellen von einem funktionalen endosomalen System abhängig ist. Wie bereits beschrieben, zeigen *SPPL2a*-defiziente B-Zellen einen verminderten Einstrom von Ca²⁺ über die Plasmamembran nach B-Zell-Rezeptor-Stimulation, sowie eine reduzierte Oberflächenexpression des BAFF-Rezeptors.

Wenn wie vermutet eine Beeinflussung des endosomalen Systems zu den beobachteten Störungen dieser Signalwege führt, müsste die zusätzliche Defizienz von CD74 in den *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} defizienten Tieren ebenfalls zu einer Normalisierung führen.

Wie zuvor beschrieben wurde daher die Ca²⁺ Freisetzung nach BCR-Stimulation untersucht. Der reduzierte Ca²⁺ Einstrom über die Plasmamembran in *SPPL2a*^{-/-} T1 B-Zellen konnte durch das zusätzlich Fehlen von CD74 erhöht werden und entsprach der Intensität in *CD74*^{-/-} und Wildtyp-Zellen (Abb. 3.31).

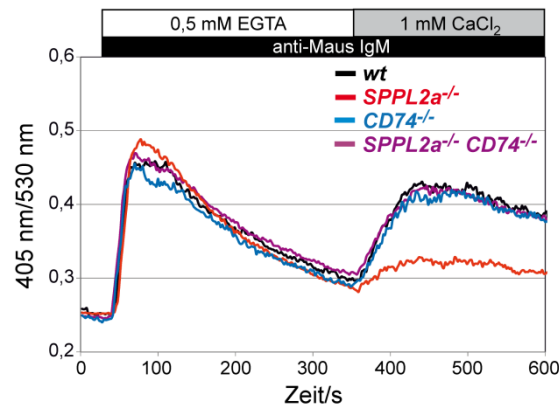


Abb. 3.31: *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} T1 B-Zellen zeigen eine normale Ca^{2+} Freisetzung nach B-Zell-Rezeptorstimulation. Splenozyten von *SPPL2a*^{-/-} und Wildtyp-Mäusen wurden mit Antikörpern gegen B220, CD21 und CD24 gefärbt und mit dem Ca^{2+} sensitiven Fluorophor Indo-1-AM inkubiert. Für die Analyse wurden spezifisch die T1 B-Zellen (B220^+ , CD24^+ , CD21^+) betrachtet. Nachdem die basalen Ca^{2+} Konzentrationen über einen Zeitraum von 30 Sekunden gemessen wurden, erfolgte die Stimulierung der Zellen mit Ziege anti-Maus IgM F (ab')₂ Fragmenten und der Ca^{2+} Einstrom wurde über 5 Minuten in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} und für weitere 5 Minuten unter Zugabe von 1 mM extrazellulärem Ca^{2+} gemessen. Der reduzierte Ca^{2+} Einstrom über die Plasmamembran in den *SPPL2a*^{-/-} Zellen ist in den *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} T1 Zellen wiederhergestellt und von dem in Wildtyp- und *CD74*^{-/-} Zellen nicht zu unterscheiden. Die Abbildung ist repräsentativ für drei durchgeführte Experimente.

Die BAFF-Rezeptor-Oberflächenexpression wurde ebenfalls, wie zuvor beschrieben, durchflusszytometrisch bestimmt und zeigte eine deutliche Erhöhung in den doppeldefizienten Zellen. Auch hier entsprach das Expressionsniveau in *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} T1 B-Zellen dem in *CD74*^{-/-} oder Wildtyp-Zellen (Abb. 3.32).

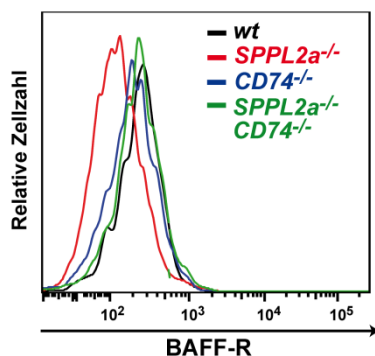


Abb. 3.32: Die BAFF-Rezeptor-Expression auf der Oberfläche von *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} T1 B-Zellen entspricht der Wildtyp-Expression. B220^+ Zellen wurden aus Milzen von Wildtyp-, *SPPL2a*^{-/-}, *CD74*^{-/-} und *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} Mäusen isoliert und mit Antikörpern gegen CD21, CD24 und BAFF-Rezeptor gefärbt. T1 B-Zellen (CD24^+ , CD21^+) wurden durchflusszytometrisch auf ihre BAFF-Rezeptor-Expression untersucht. Die Reduktion des BAFF-Rezeptors auf der Oberfläche *SPPL2a*-defizienter T1 B-Zellen zeigt sich nicht in *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} Zellen, welche sich in der Expressionsstärke nicht von Wildtyp- und *CD74*^{-/-} Zellen unterscheiden. Die Abbildung ist repräsentativ für drei durchgeführte Experimente.

Eine Prüfung der NF- κ B-Aktivität in *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} IgM⁺ B-Zellen durch ELISAs ergab ebenso wie in den *CD74*^{-/-} Zellen eine Normalisierung der aktivierten NF- κ B-Konzentrationen auf das Wildtyp-Niveau (Abb. 3.33). Somit konnte durch die zusätzliche Defizienz von CD74 in *SPPL2a*^{-/-} Tieren und die konsequente Verhinderung einer CD74-NTF-Akkumulation eine Normalisierung aller untersuchten Signalwege erreicht werden.

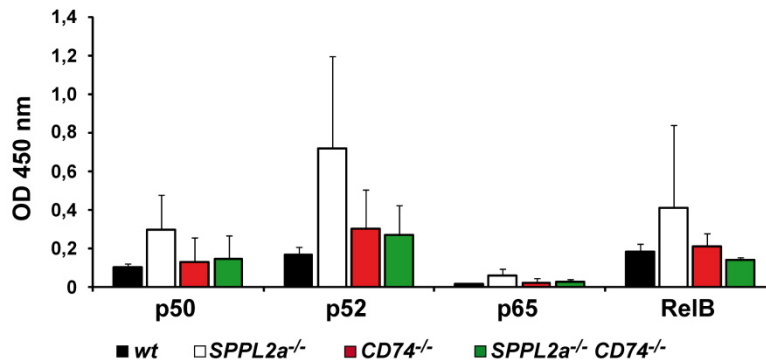


Abb. 3.33: Normalisierung der NF-κB-Aktivierung in Kernextrakten von *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} IgM⁺ Zellen der Milz. Kernextrakte aus IgM⁺ Zellen der Milzen von Wildtyp-, *SPPL2a*^{-/-}, *CD74*^{-/-} und *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} Tieren (n=3) wurden durch ELISAs auf ihre Konzentrationen von aktiviertem NF-κB (p50, p52, p65 und RelB) analysiert. Die erhöhten Mengen von p50, p52 und RelB in den *SPPL2a*^{-/-} Extrakten normalisierten sich durch die zusätzliche Defizienz von CD74 in den *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} Proben. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte ± Stabw., *one-way* ANOVA mit Bonferroni Post-hoc-Test.

3.6.4.4 B-Zell-Entwicklung in *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} Mäusen

Akkumulierendes CD74-NTF in *SPPL2a*^{-/-} Mäusen ist anscheinend ursächlich für die beobachtete Störung des endosomalen Systems sowie der untersuchten Signalwege. Um zu ermitteln, ob dies in einem direkten Zusammenhang mit dem Arrest der B-Zellen im T1 Stadium steht, wurden die lymphatischen Organe von Mäusen aller vier Genotypen durchflusszytometrisch analysiert. *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} Tiere zeigten eine deutliche Zunahme der B-Zell-Anzahl (B220⁺) in Lymphknoten (12,4 % gegen 3,1 % der lebenden Zellen) und dem Peritonealraum (38 % gegen 8,5 % der lebenden Zellen) im Vergleich zu den *SPPL2a*^{-/-} Mäusen (Tab. 3.5). Da die CD74-defizienten Mäuse allerdings, wie zuvor erwähnt, ebenfalls eine leichte Störung der B-Zell-Entwicklung zeigen (Shachar & Flavell 1996), ist zu erklären, dass keine vollständige Regeneration auf das Wildtyp-Niveau stattfand. Jedoch zeigten die *CD74*^{-/-} und die *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} Mäuse einen vergleichbaren Phänotyp. Die Untersuchung der Peritonealzellen ergab eine Normalisierung der B1 B-Zellen auf das Wildtyp-Niveau in *CD74*^{-/-} und doppelt-defizienten Mäusen, wohingegen die B2 B-Zellen zwar eine Erhöhung ihrer Anzahl zeigten, jedoch im Vergleich zu Wildtyp immer noch signifikant reduziert waren (Abb. 3.34a, b, e, f). In der Milz doppelt-defizienter Mäuse konnten T2 (7,9 % gegen 0,5% der lebenden Zellen, 2,6 gegen 0,03 x 10⁶ Splenozyten) und mature B-Zellen (10,4 % gegen 4,1% der lebenden Zellen, 2,8 gegen 1,2 x 10⁶ Splenozyten) in signifikant höherer Anzahl nachgewiesen werden als in den *SPPL2a*^{-/-} Tieren (Abb. 3.34c, d, Tab. 3.5).

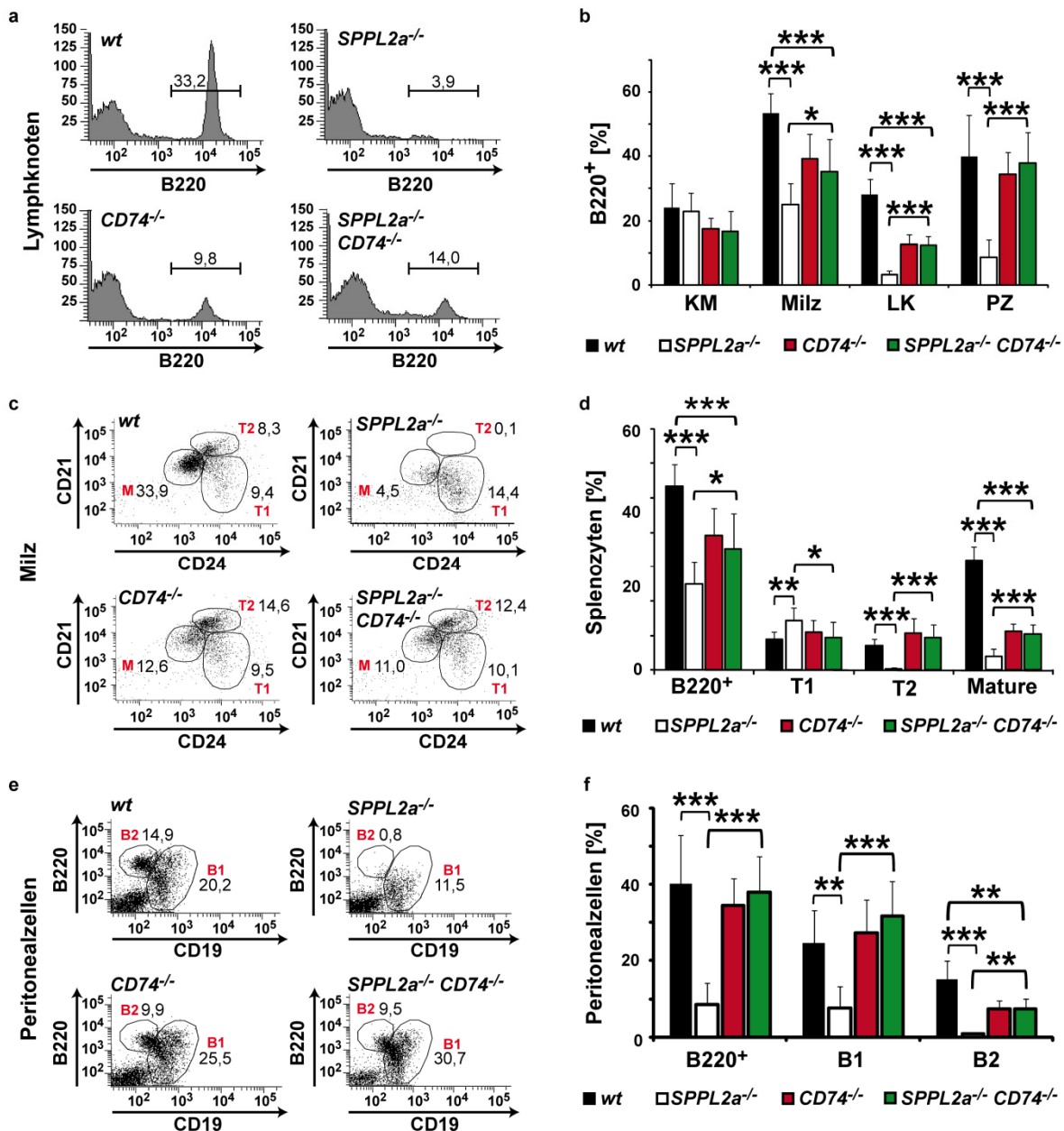


Abb. 3.34: Verbesserte B-Zell-Reifung in *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu *SPPL2a*^{-/-} Tieren. Wildtyp-, *SPPL2a*^{-/-}, *CD74*^{-/-} und *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} Mäuse wurden durchflusszytometrisch auf ihre B-Zell-Populationen in Lymphknoten (LK, (a, b)), Knochenmark (KM, (b)), Milz (b, c, d) und Peritonealzellen (PZ, (b, e, f)) untersucht. Die Menge an B220⁺ Zellen in Milz (b, d), Lymphknoten (a, b) und dem Peritonealraum (b, f) ist in den *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} im Vergleich zu *SPPL2a*^{-/-} Tieren signifikant erhöht. In der Milz von *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} Tieren zeigt sich ein Arrest der B-Zell-Entwicklung im T2 Stadium, welcher mit dem in *CD74*^{-/-} Mäusen vergleichbar ist (c, d). Die Anzahl der B1 B-Zellen im Peritonealraum in *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} sowie den *CD74*^{-/-} Mäusen zeigt keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp und ist somit gegenüber den *SPPL2a*^{-/-} Tieren hoch signifikant erhöht. Die B2 B-Zellen des Peritonealraums sind in *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} Tieren im Vergleich zum Wildtyp reduziert, zeigen jedoch eine hoch signifikante Erhöhung im Vergleich zu den *SPPL2a*^{-/-} Tieren. Ihre Anzahl ist mit der in *CD74*^{-/-} Tieren vergleichbar. a, c und e repräsentieren jeweils eines von sechs Experimenten. b, d und f zeigen die Mittelwerte von n=6 ± Stabw., ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05, one-way ANOVA mit Bonferroni Post-hoc-Test. Gezeigt sind die Signifikanzen zwischen Wildtyp und *SPPL2a*^{-/-}, Wildtyp und *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-}, *SPPL2a*^{-/-} und *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} sowie *CD74*^{-/-} und *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-}.

Tab. 3.5: Die B-Zell-Defizienz in *SPPL2a*^{-/-} Mäusen wird durch das zusätzliche Fehlen von *CD74* in *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} Tieren gemindert.

Zelltyp		Wildtyp		<i>SPPL2a</i> ^{-/-}		<i>CD74</i> ^{-/-}		<i>SPPL2a</i> ^{-/-} <i>CD74</i> ^{-/-}		P
		MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw	
<u>Knochenmark (% lebender Zellen)</u>										
B-Zellen	B220 ⁺	24,0	7,7	22,8	5,9	17,4	3,5	16,7	6,3	≥0,05
Pro-/pre	B220 ⁺ IgM ⁻	13,8	4,4	16,6	3,1	12,2	1,7	10,8	3,7	<0,05*
Unreife	B220 ⁺ IgM ⁺	3,7	1,1	3,8	2,1	3,2	1,3	2,9	1,3	≥0,05
Rezirkulierende	B220 ⁺⁺	4,7	3,3	0,8	0,8	0,8	0,6	1,6	1,1	≥0,05
<u>Milz (% lebender Zellen)</u>										
B-Zellen	B220 ⁺	53,4	6,4	25,0	6,6	39,3	7,8	35,3	10,1	<0,05*
T1	B220 ⁺ CD21 ^{+/-} CD24 ⁺⁺	9,0	2,2	14,3	3,9	11,1	3,3	9,5	4,4	<0,05*
T2	B220 ⁺ CD21 ⁺⁺ CD24 ⁺⁺	7,2	1,9	0,3	0,5	10,8	4,3	9,5	3,6	<0,001***
Mature	B220 ⁺ CD21 ^{+/-} CD24 ^{+/-}	32,0	4,0	4,1	2,0	11,3	2,0	10,4	3,0	<0,001***
<u>Milz (x10⁶ Splenozyten)</u>										
B-Zellen	B220 ⁺	39,7	7,4	6,8	3,1	12,3	4,0	9,2	5,1	≥0,05
T1	B220 ⁺ CD21 ^{+/-} CD24 ⁺⁺	6,8	1,7	3,8	1,8	3,4	1,5	2,3	1,5	≥0,05
T2	B220 ⁺ CD21 ⁺⁺ CD24 ⁺⁺	5,5	1,9	0,03	0,03	3,7	1,1	2,6	1,3	<0,05*
Mature	B220 ⁺ CD21 ^{+/-} CD24 ^{+/-}	23,6	4,4	1,2	0,7	3,2	1,3	2,8	1,7	≥0,05
<u>Lymphknoten (% lebender Zellen)</u>										
B-Zellen	B220 ⁺	28,1	4,8	3,1	1,3	12,6	3,0	12,4	2,7	<0,001***
<u>Peritonealzellen (% lebender Zellen)</u>										
B-Zellen	B220 ⁺	40,1	12,8	8,5	5,6	34,5	7,0	38,0	9,4	<0,001***
B1	B220 ^{+/-} CD19 ⁺⁺	24,5	8,7	7,7	5,5	27,2	8,8	31,8	9,1	<0,001***
B2	B220 ⁺⁺ CD19 ^{+/-}	15,1	5,0	0,8	0,4	7,3	2,4	7,4	2,6	<0,01**

Verschiedene B-Zell-Subpopulationen in Knochenmark, Milz, Lymphknoten und dem Peritonealraum aus Wildtyp, *SPPL2a*^{-/-}, *CD74*^{-/-} und *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} Mäusen wurden durchflusszytometrisch quantifiziert. Angegeben ist der jeweilige Anteil an den lebenden (PI) Zellen oder die absoluten Zellzahl. Die Zahlen repräsentieren den Mittelwert von n=6 (Knochenmark, absolute Zellzahlen der Splenozyten, Lymphknoten und Peritonealzellen) beziehungsweise n=12 (Milz, % lebender Zellen). Die Daten wurden durch eine *one-way* ANOVA mit Bonferroni Post-hoc-Test analysiert, ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05.

Zusammenfassend konnte eine deutliche Verbesserung der B-Zell-Reifung durch die zusätzliche Defizienz von *CD74* erreicht werden.

Um die Frage zu klären, ob sich diese Verbesserung auch in der Morphologie der lymphatischen Organe nachweisen lässt, wurden Anzahl und Größe der Peyer'schen Plaques aller vier Genotypen ermittelt. In den doppelt-defizienten Tieren war die Anzahl der Plaques im Vergleich zu *SPPL2a*^{-/-} Mäusen signifikant erhöht. *CD74*^{-/-} und *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} Tiere zeigten auch hier einen vergleichbaren Phänotyp und hatten, verglichen mit dem Wildtyp, eine leicht verringerte Anzahl Peyer'scher Plaques (Abb.3.35).

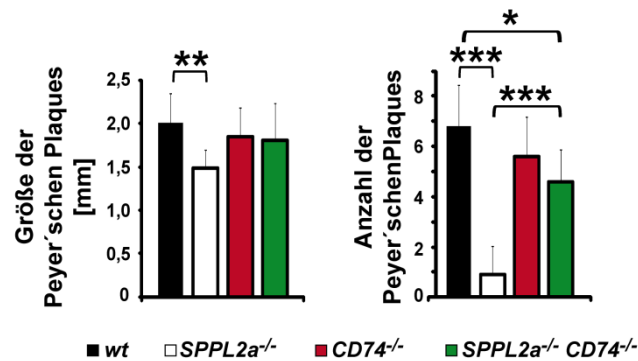


Abb. 3.35: Signifikante Erhöhung der Anzahl Peyer'scher Plaques am Dünndarm von *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} im Vergleich zu *SPPL2a*^{-/-} Mäusen. (a) Die Anzahl der Peyer'schen Plaques aller vier Genotypen (Wildtyp, *SPPL2a*^{-/-}, *CD74*^{-/-} und *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-}) wurde makroskopisch bestimmt. (b) Der Durchmesser der Peyer'schen Plaques wurde stereomikroskopisch vermessen. Die Zunahme der Anzahl der Plaques in *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} Tieren im Vergleich zu *SPPL2a*-defizienten Mäusen ist hoch signifikant. MW ± Stabw., n=6, ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05, *one-way* ANOVA mit Bonferroni Post-hoc-Test. Gezeigt sind die Signifikanzen zwischen Wildtyp und *SPPL2a*^{-/-}, Wildtyp und *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-}, *SPPL2a*^{-/-} und *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} sowie *CD74*^{-/-} und *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-}.

3.6.4.5 Funktionalität *SPPL2a*/*CD74* doppelt-defizienter B-Zellen

Die Funktionalität *SPPL2a*/*CD74* doppelt-defizienter B-Zellen wurde unter anderem durch die Bestimmung der basalen Immunglobulinspiegel untersucht. Mit Hilfe von ELISAs wurden die Isotypen IgM, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ und IgA analysiert (in Zusammenarbeit mit Dr. Michael Engelke und Dr. Kai Dittmann, Abteilung Zelluläre und Molekulare Immunologie, Georg-August-Universität Göttingen). Die Isotypen IgM, IgG_{2a}, IgG₃ und IgA waren in den doppelt-defizienten Tieren im Vergleich zu den *SPPL2a*^{-/-} Mäusen signifikant erhöht und waren mit den Konzentrationen in *CD74*^{-/-} Mäusen vergleichbar.

Zudem wurde die Fähigkeit der *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} B-Zellen geprüft, auf die Immunisierung mit dem T-Zell-unabhängigen Antigen TNP-Ficoll beziehungsweise dem T-Zell-abhängigen Antigen TNP-KLH zu reagieren. Wie zuvor beschrieben, führte die intraperitoneale Verabreichung beider Antigene zu kaum einer Sekretion von Antikörpern in den *SPPL2a*-defizienten Mäusen (Abb. 3.13). Im Gegensatz hierzu waren die Immunglobuline IgM, IgG₁, IgG_{2b} und IgG₃ in den *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} Tieren deutlich detektierbar. Die Messung von IgM 14 Tage nach der Immunisierung mit TNP-Ficoll ergab eine signifikante Erhöhung der Konzentration in *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} Tieren im Vergleich zu *SPPL2a*-defizienten Mäusen (Abb. 3.36).

Es wurde zuvor beschrieben, dass *CD74*-defiziente Mäuse selbst eine verminderte Antikörperproduktion in Folge der Immunisierung mit T-Zell-abhängigen und unabhängigen Antigenen zeigen (Shachar & Flavell 1996). Dies begründet die Beobachtung dass *SPPL2a*/*CD74*

doppelt-defiziente Mäuse noch immer signifikant geringere Mengen der meisten Immunglobulinsubklassen produzieren als die Wildtyp-Mäuse.

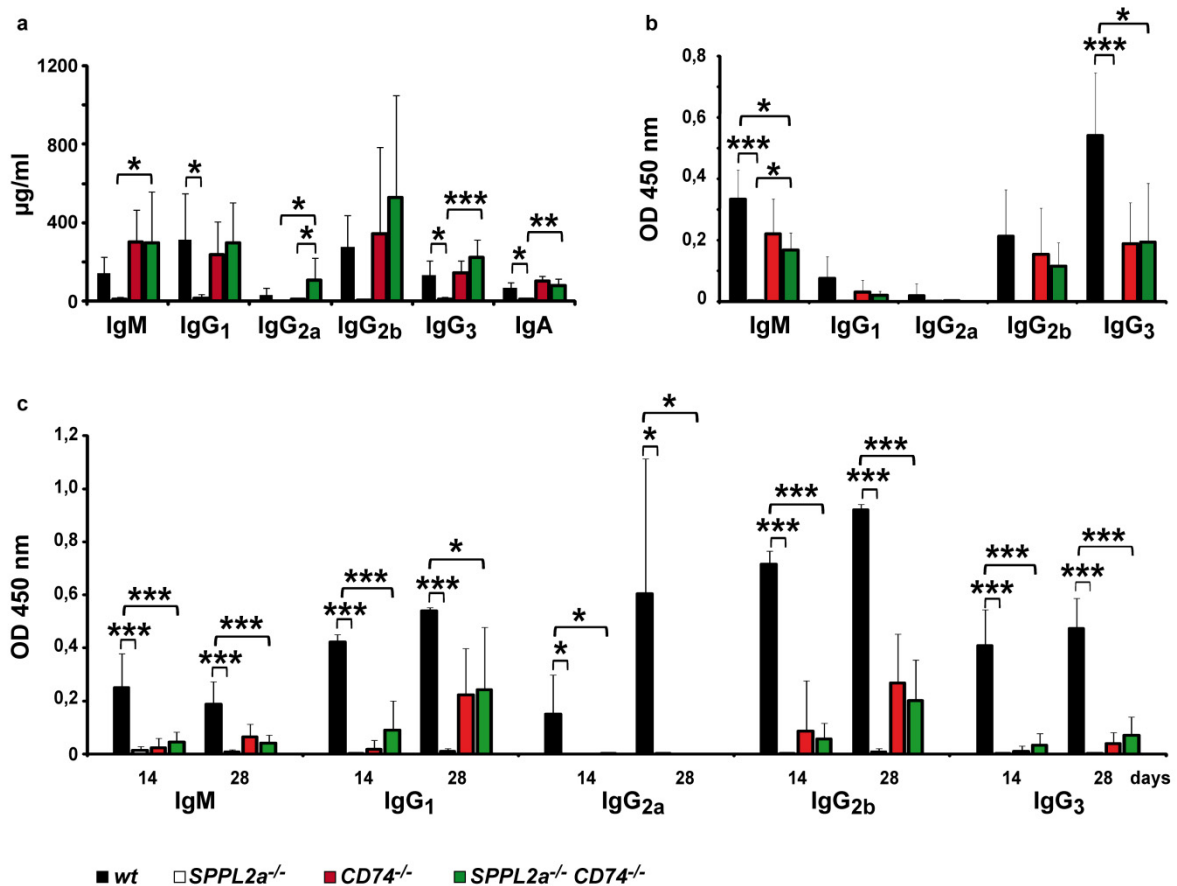


Abb. 3.36: $SPPL2a^{-/-} CD74^{-/-}$ Mäuse zeigen eine verbesserte Funktionalität der B-Zellen im Vergleich zu $SPPL2a^{-/-}$ Tieren. (a) Die basalen Konzentrationen der verschiedenen Immunglobulinklassen wurden für alle vier Genotypen (Wildtyp, $SPPL2a^{-/-}$, $CD74^{-/-}$, $SPPL2a^{-/-} CD74^{-/-}$) mit Hilfe von ELISAs bestimmt. Die Immunglobulinkonzentrationen der $SPPL2a^{-/-} CD74^{-/-}$ und $CD74^{-/-}$ Tiere liegen im Bereich der Wildtyp-Konzentrationen. (b, c) Wildtyp-, $SPPL2a^{-/-}$, $CD74^{-/-}$ und $SPPL2a^{-/-} CD74^{-/-}$ Mäuse wurden mit dem T-Zell-unabhängigen Antigen TNP-Ficoll (b) beziehungsweise dem T-Zell-abhängigen Antigen TNP-KLH (c) immunisiert. Die Konzentrationen der Hapten-spezifischen Immunglobuline wurden 14 Tage nach Immunisierung durch ELISAs bestimmt. Bei der Immunisierung mit TNP-KLH (c) erfolgte eine zweite Antigenverabreichung an Tag 14 und es wurde eine weitere Serumprobe an Tag 28 untersucht. MW \pm Stabw n=6, ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05, one-way ANOVA mit Bonferroni Post-hoc-Test. Gezeigt sind die Signifikanzen zwischen Wildtyp und $SPPL2a^{-/-}$, Wildtyp und $SPPL2a^{-/-} CD74^{-/-}$, $SPPL2a^{-/-}$ und $SPPL2a^{-/-} CD74^{-/-}$ sowie $CD74^{-/-}$ und $SPPL2a^{-/-} CD74^{-/-}$.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Depletion der NTF-Akkumulation durch das zusätzliche Fehlen von CD74 in den $SPPL2a^{-/-} CD74^{-/-}$ Mäusen neben der Minderung der B-Zell-Defizienz auch auf funktionaler Ebene eine Verbesserung bewirkt.

4 Diskussion

4.1 SPPL2a und SPPL2b haben distinkte Funktionen *in vivo*

Aufgrund einiger Übereinstimmungen bisher beschriebener Substrate von SPPL2a und SPPL2b wie TNF α und Bri2 (Friedmann *et al.* 2006; Martin *et al.* 2008) stellte sich die Frage, ob beide Proteasen trotz unterschiedlicher Gewebeexpression und subzellulärer Lokalisation (Behnke *et al.* 2011; Friedmann *et al.* 2004; Friedmann *et al.* 2006) redundante Funktionen ausüben.

Die Untersuchung der *SPPL2a*^{-/-} Mäuse offenbarte unter anderem eine wichtige Bedeutung von SPPL2a für die Bildung des Zahnschmelzes. Des Weiteren spielt die Aktivität der Protease durch die Prozessierung des in dieser Arbeit identifizierten Substrates CD74 eine entscheidende Rolle für die Maturierung und Funktionalität von B-Lymphozyten. Beide Funktionen scheinen für SPPL2a spezifisch zu sein, da die beobachteten Phänotypen nicht in SPPL2b-defizienten Tieren auftraten. Überexpressionsanalysen zur Untersuchung der Prozessierung von CD74 durch SPPL2a und SPPL2b deuteten zwar zunächst darauf hin, dass beide Proteasen in der Lage sind, CD74 zu schneiden, allerdings konnte dieser Befund *in vivo* nicht bestätigt werden. Da die Identifizierung der bisher untersuchten Substrate von SPPL2a und SPPL2b fast ausschließlich auf Überexpressionsexperimenten beruht (Fluhrer *et al.* 2006; Friedmann *et al.* 2006; Kirkin *et al.* 2007; Martin *et al.* 2008), ist es interessant zu erfahren, inwiefern die Beschreibung, dass sich das Substratspektrum beider Proteasen überschneidet, auf die tatsächliche Situation *in vivo* zutrifft. Der Vergleich SPPL2b-defizienter Mäuse mit Wildtyp-Kontrolltieren zeigte bisher keine phänotypischen Auffälligkeiten, die auf die physiologische Bedeutung dieser Protease schließen lassen.

Um eine mögliche kompensatorische Funktion von SPPL2b bei SPPL2a-Defizienz zu untersuchen, werden derzeit Untersuchungen SPPL2a/SPPL2b doppelt-defizienter Mäuse durchgeführt. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass das zusätzliche Fehlen von SPPL2b zu keiner signifikanten Verstärkung der beobachteten Effekte im Vergleich zu SPPL2a-defizienten Tieren führt. So war weder die Akkumulation des CD74-NTFs noch die Ausprägung des B-Zell-Phänotyps signifikant verstärkt (Daten nicht gezeigt). Die Zähne der *SPPL2a*^{-/-} *SPPL2b*^{-/-} Tiere waren makroskopisch mit denen SPPL2a-defizienter Mäuse vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Eine genauere Untersuchung hat jedoch noch nicht stattgefunden. Basierend auf den bisherigen Befunden kann angenommen werden, dass sowohl für die Schmelzbildung als auch für die Prozessierung von CD74 und die damit verbundene Reifung von B-Zellen

SPPL2a eine essentielle Funktion hat, die durch SPPL2b nicht signifikant kompensiert werden kann. Es bleibt jedoch die Frage offen, ob es weitere Funktionen der Proteasen gibt, die möglicherweise sowohl von SPPL2a als auch von SPPL2b erfüllt werden können. Auch die Untersuchung weiterer SPPLs wie SPPL2c und SPPL3 steht derzeit noch aus. Aufgrund der Lokalisation dieser Proteasen im ER ist jedoch eine redundante Funktion zu der von SPPL2a nicht wahrscheinlich.

4.2 Der B-Zell-Defekt in *SPPL2a*^{-/-} Mäusen

4.2.1 Beeinträchtigung der Reifung und Funktionalität von B-Zellen in *SPPL2a*^{-/-} Mäusen

Durchflusszytometrische Analysen zeigten eine signifikante Reduktion der B-Zell-Anzahl in den lymphatischen Organen, dem Peritonealraum und im Blut von *SPPL2a*^{-/-}, nicht jedoch *SPPL2b*-defizienten Mäusen. Eine weitere Untersuchung der verschiedenen B-Zell-Entwicklungsstadien in Knochenmark und Milz ergab, dass in *SPPL2a*-defizienten B-Zellen ein Arrest ihrer Reifung im Transitionalstadium 1 in der Milz vorliegt. Während die Zellen des T1 Stadiums in Wildtyp- und *SPPL2a*^{-/-} Mäusen in ihrer Anzahl vergleichbar waren, fehlten B-Zellen des T2 Stadiums nahezu vollkommen und die maturen B-Zellen waren ebenfalls signifikant reduziert. Es erscheint auf den ersten Blick überraschend, dass trotz des beinahe völligen Fehlens von T2 Zellen in den *knock-out*-Tieren dennoch eine geringe Menge maturer B-Zellen existiert. Vermutlich ist dies durch die unterschiedliche Lebensdauer von Transitional und maturen B-Zellen zu erklären. Haben B-Zellen ihre Reifung abgeschlossen, überleben diese in der Peripherie deutlich länger als die unreifen Transitionalstadien (Su & Rawlings 2002). Dadurch wird ermöglicht, dass auch eine sehr geringe Menge von T2 Zellen, denen es gelingt, zu maturen B-Zellen zu reifen, eine größere Population reifer B-Zellen hervorbringen kann.

Die Bestimmung der basalen Immunglobulinkonzentrationen sowie die intraperitoneale Immunisierung mit dem T-Zell-unabhängigen Antigen TNP-Ficoll und dem T-Zell-abhängigen Antigen TNP-KLH sollten Aufschluss über die Funktionalität der verbliebenen *SPPL2a*-defizienten B-Zellen geben. Sowohl die basalen Immunglobulinspiegel als auch die TNP-spezifischen Immunglobuline nach den Immunisierungen waren für nahezu alle untersuchten Klassen signifikant reduziert und lagen mit Ausnahme von IgM nach *Booster*-Immunisierung mit TNP-KLH an der Nachweisgrenze.

Der Befund, dass sowohl die T-Zell-abhängige als auch die T-Zell-unabhängige Immunantwort beeinträchtigt ist, stimmt mit der Beobachtung überein, dass in den *SPPL2a*^{-/-} Mäusen alle drei Subpopulationen maturer B-Zellen signifikant reduziert sind. Hierzu gehören die folliculären B-Zellen, die B-Zellen der Marginalzone der Milz und die vor allem im Peritonealraum lokalisierten B1 B-Zellen. Während die folliculären B-Zellen primär für die T-Zell-abhängige Interaktion mit Proteinantigenen zuständig sind, erkennen B-Zellen der Marginalzonen und B1 B-Zellen vor allem Polysaccharidantigene und werden infolgedessen ohne die Hilfe von T-Zellen aktiviert (Allman & Pillai 2008).

Allerdings stimmten die gemessenen Immunglobulinkonzentrationen nicht mit der verbliebenen Menge maturer B-Zellen in den *SPPL2a*-defizienten Tieren überein. Würde die verminderte humorale Immunantwort allein aus der Reduktion der reifen B-Zellen resultieren, so müsste die Konzentration der Immunglobuline im gleichen Maße reduziert sein, wie die Anzahl der B-Zellen. Es ist daher anzunehmen, dass die verbliebenen maturen B-Zellen auch funktional stark beeinträchtigt sind.

4.2.2 Der Vergleich von *SPPL2a*^{-/-} Mäusen mit anderen B-Zell-defizienten Mauslinien

In der Literatur sind verschiedene Mausmodelle mit B-Zell-Defizienz beschrieben, die zum Teil beachtliche Übereinstimmungen mit *SPPL2a*^{-/-} Tieren aufweisen. Grundsätzlich kann man die B-Zell-Defekte, in denen eine Störung der Reifung vorliegt, von solchen unterscheiden, in denen die Aktivierung oder Immunantwort fehlerhaft verläuft. Die Ursachen können in beiden Fällen B-Zell-intrinsisch sein oder durch äußere Faktoren beeinflusst werden.

Reifungsdefekte können anhand des Stadiums charakterisiert werden, in dem der Maturierungs-Arrest stattfindet. Dies kann entweder in einem sehr frühen Stadium im Knochenmark oder erst später in der Milz der Fall sein. Die schwersten Entwicklungsdefekte von B-Zellen im Knochenmark zeigen dabei beispielsweise *knock-out*-Mäuse der Rag-Proteine, die für die V(D)J-Verknüpfung essentiell sind, oder wichtiger Transkriptionsfaktoren wie E2A, welche die Transkription B-Zell-spezifischer Gene regulieren (Tab. 4.1), (Kwon *et al.* 2008; Mombaerts *et al.* 1992; Shinkai *et al.* 1992).

Tab. 4.1: Darstellung verschiedener Mausmodelle mit Entwicklungsdefekten von B-Lymphozyten.

Mutiertes /deletiertes Protein	Bedeutung für die B-Zell-Entwicklung	Effekt der Defizienz	Publikationen
Früher Maturierungsdefekt im Knochenmark			
B220	Regulation von BCR-Signalen, Regulation der Reaktion auf IL7-Stimulation	Defekt der B-Zell-Maturierung, Akkumulation von Pro-B-Zellen im Knochenmark, Reduktion maturer B-Zellen	(Fleming <i>et al.</i> 2004)
Btk	Weiterleitung von BCR-Signalen	Defekt in einem frühen Stadium der B-Zell-Entwicklung, reduzierte Anzahl maturer B-Zellen, starke B1 B-Zell-Defizienz, Defizienz von IgM und IgG3 im Serum, beeinträchtigte Immunantwort bei Immunisierung mit Thymus-unabhängigen Antigenen	(Khan <i>et al.</i> 1995)
E2A	Regulation der Expression B-Zell-spezifischer Gene (z.B. Pax5)	Arrest der B-Zell-Entwicklung im Pre-/Pro-B-Zell-Stadium	(Kwon <i>et al.</i> 2008)
Rag1/2	V(D)J-Verknüpfung	Keine reifen B- und T-Lymphozyten, sehr früher Entwicklungsdefekt im Knochenmark	(Mombaerts <i>et al.</i> 1992; Shinkai <i>et al.</i> 1992)
Später Maturierungsdefekt in der Milz			
BAFF	Antiapoptotisch durch Aktivierung des alternativen NF-κB-Signalwegs	Reifungsdefekt beim Übergang vom T1 in das T2 Stadium, Reduktion folliculärer und der Marginalzonen B-Zellen, B1 B-Zellen nicht betroffen, generelle Struktur der Milz und der Lymphknoten nicht beeinträchtigt, Immunreaktionen nach Immunisierung mit T-Zell-abhängigen und-unabhängigen Antigen reduziert	(Schiemann <i>et al.</i> 2001)
BAFF-R	Antiapoptotisch durch Aktivierung des alternativen NF-κB-Signalwegs	Wie BAFF-defiziente Mäuse, jedoch keine Beeinträchtigung der T-Zell-unabhängigen Immunantwort	(Shulga-Morskaya <i>et al.</i> 2004)
BLR1 (Burkitt lymphoma receptor 1)	Chemokinrezeptor mit wichtiger Funktion für B-Zell-Migration und korrekte Lokalisation	Fehlen von Leistenlymphknoten, wenige, morphologisch veränderte Peyer'sche Plaques, Migration von B-Zellen in Follikel der Milz stark beeinträchtigt, keine funktionellen Keimzentren	(Forster <i>et al.</i> 1996)
CD19	Verstärkung des BCR-Signals	Fehlen von Marginalzonen und B1 B-Zellen, schwache Reaktion der folliculären B-Zellen auf Thymus-abhängige Antigene	(You <i>et al.</i> 2009); (Gardby & Lycke 2000)
CD20	Regulation des Ca ²⁺ Transports über die Zellmembran	Geringere IgM-Expression, Reduktion des Ca ²⁺ Einstroms über Plasmamembran, normale B-Zell-Entwicklung, normale Proliferation und T-Zell-abhängige Immunantwort	(Uchida <i>et al.</i> 2004)
CD21	Verstärkung des BCR-Signals	Reduktion der B1 B-Zell-Population, keine Reduktion der B-Zellen der Marginalzone, starke Beeinträchtigung der humoralen Immunantwort und Bildung von Keimzentren nach Immunisierung mit T-Zell-abhängigen Antigenen	(Ahearn <i>et al.</i> 1996; Fleming <i>et al.</i> 2002; Reid <i>et al.</i> 2002)
CD74	ungeklärt	Arrest der B-Zell-Entwicklung im T2-Stadium der Milz, Defizienz folliculärer B-Zellen, B-Zellen der Marginalzone und B1 B-Zellen nicht betroffen, Beeinträchtigung der Immunantwort nach Immunisierung mit T-Zell-abhängigem und -unabhängigem Antigen	(Maehr <i>et al.</i> 2004; Shachar & Flavell 1996), eigene Daten
TNFα	ungeklärt	Defizienz folliculärer B-Zellen und folliculärer dendritischer Zellen, Fehlen primärer Follikel in den lymphatischen Organen, keine Bildung von Keimzentren nach T-Zell-abhängiger Immunisierung, reduzierte Produktion von IgG und IgE nach Immunisierung mit T-Zell-abhängigen Antigenen, humorale Immunantwort infolge einer T-Zell-unabhängigen Immunisierung nicht reduziert, keine Reduktion der B-Zellen der Marginalzone	(Mayrhofer 1997; Pasparkis <i>et al.</i> 1996)

Viele der für die B-Zell-Maturierung in der Milz wichtigen Proteine steuern Prozesse wie die Regulation von BCR-Signalen oder die Vermittlung von Überlebenssignalen. *SPPL2a*^{-/-} Mäuse weisen einen solchen späten Maturierungsdefekt in der Milz beim Übergang vom T1 in das T2 Stadium auf. Unter den beschriebenen Mausmodellen (Tab. 4.1) finden sich einige *knock-out*-Mäuse mit ähnlichem, allerdings nicht identischem Phänotyp. Hier sind vor allem *BAFF*^{-/-}, *BAFF-R*^{-/-} und *CD74*^{-/-} Tiere zu nennen, welche die meisten Parallelen zu *SPPL2a*^{-/-} Mäusen aufweisen. Die B-Zell-Defizienz dieser Tiere ist ausführlich untersucht und wird in den folgenden Kapiteln im Detail diskutiert (Tab. 4.1), (Maehr *et al.* 2004; Schiemann *et al.* 2001; Shachar & Flavell 1996; Shulga-Morskaya *et al.* 2004).

4.2.3 Beeinträchtigung wichtiger Signalwege in SPPL2a-defizienten B-Zellen

4.2.3.1 Signale über die Interaktion zwischen BAFF und dem BAFF-Rezeptor

Der Phänotyp der *SPPL2a*^{-/-} Mäuse weist beachtliche Übereinstimmungen mit der B-Zell-Defizienz von *BAFF*^{-/-} Tieren auf. Diese Mäuse zeigten ebenfalls eine starke Reduktion B220-positiver Zellen in allen untersuchten lymphatischen Organen. Wie in den *SPPL2a*^{-/-} Tieren umfasste diese Reduktion sowohl folliculäre B-Zellen als auch die B-Zellen der Marginalzone. Genauere Untersuchungen der verbliebenen B-Zellen zeigten auch hier einen Reifungsdefekt beim Übergang vom T1 in das T2 Stadium. Im Knochenmark war ebenfalls lediglich die Population reifer, rezirkulierender B-Zellen stark reduziert. Die immunhistologischen Aufnahmen lymphatischer Organe waren mit denen SPPL2a-defizienter Tiere in dieser Arbeit vergleichbar. Auch hier waren die generellen Strukturen der Milz und der Lymphknoten nicht beeinträchtigt. Die Konzentrationen antigenspezifischer Immunglobuline nach Immunisierung mit TNP-Ficoll oder 4-Hydroxy-3-Nitrophenylacetyl- (NP-) KLH waren wie in *SPPL2a*^{-/-} Mäusen deutlich reduziert. Ein wesentlicher Unterschied zwischen *BAFF*^{-/-} und *SPPL2a*^{-/-} Mäusen besteht allerdings in der Population der B1 B-Zellen. Während diese in den *SPPL2a*^{-/-} Tieren signifikant vermindert sind, zeigten BAFF-defiziente Tiere keine Reduktion dieser Subpopulation (Schiemann *et al.* 2001), (Tab. 4.1).

Obwohl BAFF wichtige Voraussetzungen eines Substrates für SPPL2a erfüllt (Typ II Transmembranprotein, *Shedding* (Schneider *et al.* 1999)), ist es unwahrscheinlich, dass eine fehlende Intramembranproteolyse durch SPPL2a ursächlich für den B-Zell-Phänotyp ist. B-Zellen exprimieren die Rezeptoren für BAFF, während BAFF selbst von anderen Immunzellen und Stromazellen exprimiert wird (Gorelik *et al.* 2003; MacKay & Schneider 2009). Eine

mögliche reverse Signalgebung würde sich demnach eher auf diese Zellen auswirken, während die Generierung von löslichem BAFF, welches an die Rezeptoren binden kann, von einer Intramembranproteolyse unabhängig wäre. Durch Knochenmarktransplantationsexperimente konnte in der vorliegenden Arbeit zudem nachgewiesen werden, dass es sich in *SPPL2a*^{-/-} Mäusen vermutlich um einen B-Zell-intrinsischen Defekt handelt.

Die Messung der BAFF-Konzentrationen im Serum *SPPL2a*-defizienter Tiere und vergleichbarer Wildtyp-Mäuse zeigte eine signifikante Erhöhung der durchschnittlichen BAFF-Konzentration in den *knock-out*-Tieren (97,5±39,6 ng/ml gegen 4,2±4,4 ng/ml, p<0,001), (Nur Güneli, Biochemisches Institut, CAU Kiel), (Schneppenheim *et al.* 2013). Bereits in früheren Arbeiten wurde eine Erhöhung der BAFF-Konzentration infolge einer Defizienz von B-Zellen beschrieben (Kreuzaler *et al.* 2012; Lavie *et al.* 2007). Daher scheint es wahrscheinlich, dass es sich bei dieser Beobachtung um einen sekundären Effekt handelt. Da jedoch 20-fach erhöhte BAFF-Konzentrationen nicht in der Lage waren, die Reifung der B-Zellen zu ermöglichen, ist eine Störungen des durch BAFF vermittelten Signalwegs als Ursache für den Defekt wahrscheinlicher als mangelnde Verfügbarkeit von BAFF. Diese Ergebnisse wurden in einer parallel veröffentlichten Arbeit bestätigt, in der es nicht möglich war, den B-Zell-Defekt durch die Überexpression von BAFF zu beheben (Bergmann *et al.* 2013).

BAFF kann an drei verschiedene Rezeptoren, *B cell maturation antigen* (BCMA), *Transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor* (TACI) und den BAFF-Rezeptor binden (MacKay & Schneider 2009). Die meisten Übereinstimmungen mit *BAFF*^{-/-} Mäusen zeigen dabei BAFF-Rezeptor-defiziente Tiere. Die Phänotypen beider *knock-out*-Mäuse hinsichtlich des B-Zell-Defektes stimmen weitestgehend überein. Allerdings weisen *BAFF-R*^{-/-} Mäuse im Gegensatz zu *BAFF*^{-/-} Tieren eine mit dem Wildtyp vergleichbare Immunantwort nach Immunisierung mit T-Zell-unabhängigen Antigenen auf (Shulga-Morskaya *et al.* 2004). Offensichtlich reguliert BAFF die T-Zell-unabhängige Antikörperbildung über einen anderen Rezeptor als den BAFF-R. Möglicherweise erfolgt diese Regulation über den Rezeptor TACI, da *TACI*^{-/-} Mäusen zwar eine erhöhte Anzahl von B-Zellen, jedoch eine eingeschränkte Immunantwort nach Immunisierung mit T-Zell-unabhängigen Antigenen zeigten (von Bulow *et al.* 2001; Yan *et al.* 2001). Mäuse mit einer Defizienz des BCMA-Rezeptors haben weder eine signifikante Reduktion der B-Zellen in der Milz, noch einen Verlust des T2 Stadiums (Schiemann *et al.* 2001).

Da die Interaktion zwischen BAFF und dem BAFF-R demnach den entscheidendsten Einfluss auf die Reifung der B-Zellen ausübt, wurde die Oberflächenexpression dieses Rezeptors in

den *SPPL2a*^{-/-} B-Zellen untersucht. Tatsächlich konnte eine Reduktion des BAFF-Rs auf der Oberfläche *SPPL2a*-defizienter B-Zellen nachgewiesen werden.

BAFF-Signale über den BAFF-R führen zu einer Aktivierung des alternativen NF- κ B-Signalwegs und infolgedessen zur Expression antiapoptotischer Gene der Bcl-2-Familie (MacKay & Schneider 2009). Überraschenderweise konnte in den B-Zellen von *SPPL2a*^{-/-} Mäusen keine verminderte Konzentration der aktiven p52-Form von NF- κ B2 festgestellt werden. Untersuchungen durch einen ELISA zeigten sogar eine starke Erhöhung der p52-Konzentration, die allerdings im *Western blot* nicht bestätigt werden konnte. Weitere Mitglieder der NF- κ B-Familie (p50, RelB) waren nach Aussage des ELISAs ebenfalls vermehrt aktiviert. Die Menge des Bcl-2-Proteins schien im *Western blot* in den *SPPL2a*^{-/-} Zellen und den Wildtyp-Zellen vergleichbar zu sein. Möglicherweise kann in den *SPPL2a*^{-/-} B-Zellen die reduzierte Oberflächenexpression des BAFF-Rs durch die erhöhten BAFF-Serumkonzentrationen kompensiert werden. Die Frage, weshalb *SPPL2a*^{-/-} B-Zellen trotz der anscheinend intakten Übermittlung von Überlebenssignalen derart stark reduziert sind, bleibt derzeit offen.

Die Erkenntnis, dass eine reduzierte Bcl-2-Expression vermutlich nicht ursächlich für den beobachteten B-Zell-Defekt der *SPPL2a*-defizienten Tiere ist, geht auch aus einer anderen kürzlich publizierten Arbeit hervor. In dieser Untersuchung wurden *SPPL2a*-defiziente Mäuse mit *Vav-Bcl-2*-transgenen Mäusen gekreuzt, welche Bcl-2 überexprimieren. Dies führte zu einer Erhöhung der Gesamtzahl der B-Zellen in der Milz über das Wildtyp-Niveau. Allerdings war die Anzahl reduziert im Vergleich zu *Vav-Bcl-2*-transgenen Mäusen, welche *SPPL2a* in normaler Menge exprimierten. Zudem konnten auch die reduzierten Oberflächenexpressionen des BAFF-Rs oder BCRs durch die Überexpression von Bcl-2 nicht kompensiert werden. Es konnte demnach nur eine partielle Verbesserung des B-Zell-Defektes erreicht werden. Dies zeigt, dass *SPPL2a* einen Effekt auf B-Zellen ausübt, der von Bcl-2 unabhängig zu sein scheint (Bergmann *et al.* 2013). Inwiefern die veränderte BAFF-R-Expression daher tatsächlich ursächlich für die B-Zell-Defizienz ist, ist gegenwärtig noch unklar.

4.2.3.2 Signale über den B-Zell-Rezeptor

Signale des BCRs stellen einen weiteren entscheidenden Faktor für die B-Zell-Entwicklung vom T1 zum T2 Stadium dar. Dabei ist die Stärke des Signals ausschlaggebend für das Schicksal der Zelle. BCR-Signale führen zu einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺ Konzentration (Engelke *et al.* 2007; Loder *et al.* 1999; Scharenberg *et al.* 2007). Infolgedessen

kommt es zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und NFAT und hierdurch zur Steuerung wichtiger Prozesse wie Zytokinausschüttung, Zellüberleben und Proliferation (Scharenberg *et al.* 2007). Tatsächlich ist der Ca^{2+} Einstrom über die Plasmamembran in den *SPPL2a*^{-/-} Tieren nach BCR-Stimulation reduziert. Denkbar wäre, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der reduzierten BAFF-R-Expression und verminderter BCR-Signalintensität besteht. So konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass Signale des BAFF-Rs einen Einfluss auf die Expression von CD21/35 ausüben, der von der Bedeutung für die Übermittlung von Überlebenssignalen unabhängig ist (Mayne *et al.* 2009). In *SPPL2a*^{-/-} Mäusen ist die Oberflächenexpression von CD21 reduziert. CD21 ist Bestandteil des B-Zell-Korezeptorkomplexes und maßgeblich an der Intensität von BCR-Signalen beteiligt (Scharenberg *et al.* 2007). Die BCR-Signalstärke in CD21-defizienten Mäusen ist daher herabgesetzt. Dies hat Auswirkungen auf die Entwicklung und Aktivierung der Zellen. *CD21*^{-/-} Mäuse zeigen eine starke Beeinträchtigung der humoralen Immunantwort und Bildung von Keimzentren nach Immunisierung mit T-Zell-abhängigen Antigenen. Zudem wurde eine Reduktion der B1 B-Zell-Population beschrieben. Die B-Zellen der Marginalzone sind hingegen nicht vermindert (Ahearn *et al.* 1996; Fleming *et al.* 2002; Reid *et al.* 2002).

Es wäre somit möglich, dass die geringere BAFF-R-Oberflächenexpression in *SPPL2a*^{-/-} Mäusen zu einer verminderten CD21-Expression führt. Dies würde eine schwächere BCR-Signalstärke zur Folge haben und könnte zu einem Teil den beobachteten B-Zell-Defekt bedingen.

Ebenso können Signale des BCRs wiederum einen Einfluss auf den BAFF/BAFF-R-Signalweg ausüben. Bisher stand im Zusammenhang mit BCR-Signalen vor allem die Aktivierung des klassischen NF- κ B-Signalwegs im Vordergrund. Heute ist jedoch bekannt, dass diese auch für den alternativen NF- κ B-Signalweg eine Rolle spielen, da sie die Expression von NF- κ B2 induzieren. Somit wird durch die Signale des BCRs die inaktive p100-Form des NF- κ B2 zur Verfügung gestellt, welche in Folge von BAFF/BAFF-R-Signalen prozessiert und somit aktiviert wird (Stadanlick *et al.* 2008). Tatsächlich zeigen die *Western blot* Analysen von B-Zellen *SPPL2a*-defizienter Tiere eine reduzierte Menge von p100. Dies könnte möglicherweise durch den verminderten Ca^{2+} Einstrom über die Plasmamembran bedingt sein. Da jedoch die Menge der aktiven p52-Form von NF- κ B2 in Wildtyp- und *knock-out*-Tieren im *Western blot* vergleichbar war und durch den ELISA sogar vermehrt detektiert werden konnte, ist derzeit nicht zu erklären, weshalb eine möglicherweise reduzierte Expression von p100 nicht auch zu einer Reduktion der aktiven p52-Form führt.

4.3 Die Bedeutung bekannter Substrate von SPPL2a für die B-Zell-Entwicklung

Die Suche nach der molekularen Ursache des beobachteten B-Zell-Defektes führte unter anderem zu der Frage, ob eines der bekannten Substrate von SPPL2a ursächlich hierfür sein könnte. Sowohl für TNF α als auch den FasL sind Funktionen für die Entwicklung von B-Zellen beschrieben worden.

So wurde beispielsweise anhand transgener Mäusen, in denen der Wildtyp-FasL gegen einen FasL ohne ICD ersetzt wurde, herausgefunden, dass die reverse Signalgebung durch die FasL-ICD einen Einfluss auf die Proliferation von B-Zellen ausübt (Luckerath *et al.* 2011). Allerdings handelt es sich hierbei nicht um eine Auswirkung auf die B-Zell-Reifung, wie es in den *SPPL2a*^{-/-} Tieren der Fall ist, sondern um einen inhibierenden Effekt auf die Proliferation reifer, aktivierter B-Zellen. Die transgenen Mäuse zeigten nach Immunisierung mit T-Zell-abhängigem beziehungsweise T-Zell-unabhängigem Antigen eine erhöhte Anzahl an Plasmazellen und Keimzentren. Infolgedessen waren die Titer der Hapten-spezifischen IgM-Antikörper im Serum der Mäuse erhöht. Die reverse Signalgebung durch die FasL-ICD scheint demnach einen inhibierenden Effekt auf diese Immunantworten auszuüben (Luckerath *et al.* 2011). Fehlt die Generierung einer FasL-ICD aufgrund fehlender Intramembranproteolyse des FasL durch SPPL2a in den *SPPL2a*^{-/-} Tieren, wäre demnach mit einem vergleichbaren Effekt auf die B-Zell-Proliferation zu rechnen, wie in den FasL-ICD-defizienten, transgenen Mäusen. Dies steht jedoch im Gegensatz zu dem beobachteten Phänotyp der *SPPL2a*^{-/-} Mäuse.

TNF α ^{-/-} Mäuse zeigen dagegen eine Defizienz follikulärer B-Zellen und follikulärer dendritischer Zellen. In den lymphatischen Organen fehlen demzufolge die primären Follikel und die Bildung von Keimzentren nach T-Zell-abhängiger Immunisierung bleibt aus. Nach einer Immunisierung mit T-Zell-abhängigen Antigenen wurde in TNF α ^{-/-} Mäusen eine reduzierte Antikörperproduktion der Isotypen IgG und IgE beobachtet, während die IgM-Konzentrationen mit denen in Wildtyp-Tieren vergleichbar beziehungsweise leicht erhöht waren. Trotz fehlender Keimzentren waren IgG- und IgE-Spiegel jedoch deutlich messbar. Im Gegensatz hierzu war die humorale Immunantwort nach einer T-Zell-unabhängigen Immunisierung nicht reduziert. Passend zu diesem Befund war die Anzahl von B-Zellen der Marginalzone, welche vor allem für eine T-Zell-unabhängige Immunantwort bekannt sind, in den TNF α -defizienten Mäusen nicht vermindert (Tab. 4.1), (Pasparakis *et al.* 1996).

Trotz einiger Übereinstimmungen mit der B-Zell-Defizienz der *SPPL2a*^{-/-} Mäuse, zeigen *SPPL2a*-defiziente Tiere jedoch einen weitaus stärkeren Defekt des B-Zell-Kompartments als

die $TNF\alpha^{-/-}$ Mäuse. Er umfasst alle Subpopulationen maturer B-Zellen (follikuläre B-Zellen, B-Zellen der Marginalzone und B1 B-Zellen) und wirkt sich sowohl auf die T-Zell-abhängige als auch die T-Zell-unabhängige Immunantwort aus. In beiden Fällen lagen die Konzentrationen der verschiedenen Immunglobulinsubklassen an der Nachweisgrenze. Lediglich nach zweifacher T-Zell-abhängiger Immunisierung waren geringe Mengen des Isotyps IgM detektierbar.

Die möglicherweise nicht vorhandene oder reduzierte Intramembranproteolyse von $TNF\alpha$ in den SPPL2a-defizienten Mäusen kann jedoch im Hinblick auf den B-Zell-Defekt keinesfalls mit dem vollständigen Fehlen von $TNF\alpha$ in den $TNF\alpha^{-/-}$ Mäusen gleichgesetzt werden. So ist es möglich, dass beispielsweise der verhinderte Abbau des N-terminalen Fragmentes von $TNF\alpha$ einen stärkeren Einfluss auf die B-Zell-Reifung hat, als das vollständige Fehlen des Zytokins. Ebenso ist es denkbar, dass die fehlende Generierung einer $TNF\alpha$ -ICD mit möglicher Signalfunktion nur einen Teilaspekt in den SPPL2a-defizienten Mäusen darstellt. In einer Publikation wurde eine Funktion der $TNF\alpha$ -ICD für die IL12-Expression in dendritischen Zellen beschrieben (Friedmann *et al.* 2006). Das Zytokin spielt eine wichtige Rolle bei der Differenzierung und Aktivierung von T-Lymphozyten und NK-Zellen (Vignali & Kuchroo 2012). IL12 ist bisher jedoch nicht mit der Entwicklung von B-Zellen in Verbindung gebracht worden. Darüber hinaus zeigte die Untersuchung der IL12-Konzentrationen in Überständen dendritischer Zellen (unstimuliert oder LPS-stimuliert) SPPL2a-defizienter Mäuse keinen signifikanten Unterschied zu denen in Wildtyp-Überständen (Dr. Bernd Schröder, Biochemisches Institut, CAU Kiel, persönliche Kommunikation). Die Identifizierung von CD74 als Substrat von SPPL2a und der beobachtete Zusammenhang zwischen CD74-NTF-Akkumulation und B-Zell-Entwicklung in $SPPL2a^{-/-}$ B-Zellen lassen zudem einen Beitrag weiterer Substrate von SPPL2a zu dem B-Zell-Defekt unwahrscheinlich erscheinen.

4.4 Die Bedeutung von CD74 für die Reifung von B-Zellen

4.4.1 Die Akkumulation des N-terminalen Fragmentes von CD74 nicht aber das Fehlen der CD74-intrazellulären Domäne in $SPPL2a^{-/-}$ Mäusen führt zum B-Zell-Maturierungsdefekt

Die Suche nach der molekularen Ursache für den beobachteten B-Zell-Maturierungsdefekt in $SPPL2a^{-/-}$ B-Zellen führte zur Identifizierung von CD74 als neues und erstes *in vivo* validiertes Substrat von SPPL2a. CD74 wurde bereits zuvor mit der Entwicklung von B-Zellen in

Verbindung gebracht. Entsprechend früherer Untersuchungen führt die Intramembranproteolyse von CD74 zur Freisetzung einer intrazellulären Domäne mit wichtiger Signalfunktion für die B-Zell-Maturierung (Matza *et al.* 2002a).

Die Annahme einer Funktion der CD74-ICD wurde auf Basis der Beobachtung formuliert, dass CD74-defiziente Mäuse einen Defekt der B-Zell-Entwicklung zeigen. Dieser Phänotyp ist allein durch die fehlende funktionale Antigenpräsentation in den Zellen nicht zu erklären, da Mäuse mit einer Defizienz von MHCII oder des MHCII Transaktivators CIITA keinen vergleichbaren Defekt aufweisen (Shachar & Flavell 1996). Untersuchungen transgener Mäuse, die ausschließlich eine trunkierte Form von CD74, bestehend aus den ersten 82 N-terminalen Aminosäuren, exprimierten, zeigten hingegen eine verbesserte B-Zell-Reifung bei nach wie vor fehlender MHCII-Oberflächenexpression (Matza *et al.* 2002b). In weiteren Analysen wurde gezeigt, dass die Intramembranproteolyse dieses Fragmentes zur Generierung einer CD74-ICD führt, welche in den Zellkern gelangt und die Aktivierung des NF- κ B p65 (RelA) Homodimers und dessen Koaktivators TAF_{II}105 bewirkt. Infolgedessen wird demnach die Reifung der B-Zellen ermöglicht (Abb 4.1), (Matza *et al.* 2001).

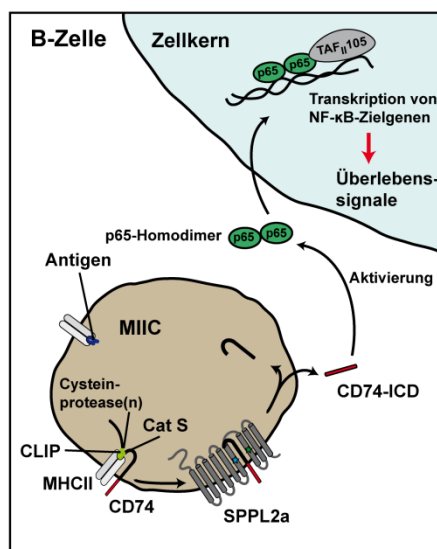


Abb. 4.1: Das CD74-ICD-Modell zur Erklärung der Bedeutung von CD74 für die murine B-Zell-Entwicklung. Im Anschluss an die Prozessierung von CD74 durch (eine) Cysteinprotease(n) und Cathepsins (Cat S) führt die Intramembranproteolyse des CD74-NTFs zur Freisetzung einer intrazellulären Domäne von CD74. Diese CD74-ICD bewirkt die Aktivierung eines p65-Homodimers der NF- κ B-Familie, welches gemeinsam mit dem Koaktivator TAF_{II}105 die Transkription von NF- κ B-Zielgenen bewirkt. Infolgedessen erhält die B-Zelle Überlebenssignale (Matza *et al.* 2002a). SPPL2a wurde in der vorliegenden Arbeit als die für den Intramembranschnitt von CD74 verantwortliche Protease identifiziert.

Eine fehlende Freisetzung der CD74-ICD als Ursache für die B-Zell-Defizienz in *SPPL2a*^{-/-} Mäusen muss jedoch aufgrund verschiedener Beobachtungen kritisch betrachtet werden. So belegen einige Arbeiten, dass der Maturierungsdefekt der B-Zellen in CD74-defizienten Mäusen durch die zusätzliche Defizienz von MHCII vollständig aufgehoben werden kann (Maehr *et al.* 2004). Es wurde somit gezeigt, dass sowohl CD74 als auch MHCII für die B-Zell-Entwicklung entbehrlich zu sein scheinen und dass MHCII einen entscheidenden Anteil an

der Entstehung des Maturierungsdefektes in $CD74^{-/-}$ Mäusen hat. Einen vergleichbaren inhibierenden Effekt auf die B-Zell-Reifung hat auch die Defizienz einzelner MHCII-Ketten (Labrecque *et al.* 1999). Es ist somit anzunehmen, dass es durch das Fehlen von CD74 oder einzelner Untereinheiten von MHCII zu einer Fehlregulation der MHCII-Homöostase kommt, welche folglich für den entsprechenden B-Zell-Defekt verantwortlich ist.

Die Beobachtung, dass Mäuse, welche die 82 Aminosäuren lange, trunkeerte Form von CD74 schwach exprimieren, eine verbesserte B-Zell-Reifung zeigen, kann eventuell auch dadurch erklärt werden, dass diese Form von CD74 nach wie vor in der Lage ist, mit MHCII zu interagieren (Castellino *et al.* 2001). Daher besteht die Möglichkeit, dass dieses Fragment ausreichend ist, um einen toxischen Effekt ungepaarter MHCII Ketten zu verhindern (Maehr *et al.* 2004).

Die intrazelluläre Domäne von CD74 ist zudem ein kurzes Peptid von etwa 42 Aminosäuren (Matza *et al.* 2002a). In dieser Arbeit war es mir jedoch nicht möglich, die CD74-ICD im *Western blot* zu detektieren, so dass davon ausgegangen werden muss, dass das Fragment einer schnellen Degradierung unterliegt. Inwiefern es daher in der Lage ist, weitere Signalfunktionen zu erfüllen, ist fraglich.

Auch der beschriebene aktivierende Effekt auf NF- κ B p65 der CD74-ICD konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Trotz fehlender Freisetzung der CD74-ICD in den $SPPL2\alpha^{-/-}$ Mäusen konnte keine reduzierte Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs festgestellt werden. Die Menge des aktivierten p65 in Kernextrakten der B-Zellen lag zudem an der Nachweisgrenze. Es stellt sich daher die Frage, inwiefern nicht andere Vertreter der NF- κ B-Familie eine entscheidendere Funktion für die B-Zell-Reifung ausüben.

Des Weiteren unterscheiden sich die B-Zell-Maturierungsdefekte in $SPPL2\alpha^{-/-}$ und $CD74^{-/-}$ Tieren im Hinblick auf ihre Ausprägung. Während CD74-defiziente Mäuse einen Arrest der Entwicklung im T2 Stadium der Milz zeigen (Maehr *et al.* 2004), (eigene Daten), wird die Maturierung in den $SPPL2\alpha^{-/-}$ Mäusen bereits im T1 Stadium inhibiert. Die B-Zell-Defizienz in den $SPPL2\alpha^{-/-}$ Tieren umfasst zudem alle Subpopulationen maturer B-Zellen. Im Gegensatz hierzu sind die B-Zellen der Marginalzone in $CD74^{-/-}$ Mäusen nicht betroffen (Maehr *et al.* 2004; Shachar & Flavell 1996). Der Phänotyp der $SPPL2\alpha^{-/-}$ Tiere bezüglich der B-Zell-Defizienz ist somit wesentlich stärker ausgeprägt als in den $CD74^{-/-}$ Mäusen. Es ist daher nicht möglich, dass allein das Fehlen der CD74-ICD aufgrund fehlender Proteolyse durch SPPL2a zu dem beobachteten Defekt führt.

Die deutlich verbesserte B-Zell-Reifung durch die zusätzliche Defizienz von CD74 in den $SPPL2\alpha^{-/-} CD74^{-/-}$ Mäusen zeigt klar, dass akkumulierendes CD74-NTF in den $SPPL2\alpha^{-/-}$ B-

Zellen ursächlich für den beobachteten Effekt auf die Reifung der Zellen ist. So ist der Phänotyp SPPL2a/CD74-defizienter Mäuse hinsichtlich der Maturierung und Funktionalität der B-Zellen mit dem CD74-defizienter Tiere vergleichbar und zeigt eine signifikante Verbesserung im Vergleich zu *SPPL2a*^{-/-} Mäusen. Gleiches gilt für die untersuchten Signalwege. Die Oberflächenexpression des BAFF-Rs, sowie der Ca²⁺ Einstrom über die Plasmamembran nach BCR-Stimulation in *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} T1 B-Zellen entsprachen der Situation in vergleichbaren Wildtyp-Zellen.

Diesen Ergebnissen zufolge ist also davon auszugehen, dass die Hauptfunktion von SPPL2a für die Reifung und Funktionalität von B-Zellen nicht in der Generierung einer intrazellulären Domäne mit eventueller Signalfunktion, sondern vielmehr in der strengen Kontrolle der CD74-NTF-Konzentrationen liegt, welche durch die vorhergehende Prozessierung von CD74 generiert werden. Aufgrund der Tatsache, dass der Phänotyp SPPL2a/CD74-defizienter Mäuse hinsichtlich B-Zell-Entwicklung und -Funktionalität dem CD74-defizienter Tiere entspricht, ist es unwahrscheinlich, dass weitere Substrate von SPPL2a oder nicht-proteolytische Funktionen für den hier beschriebenen Phänotyp verantwortlich sind. Inwiefern aber eine fehlende CD74-ICD oder toxische Effekte ungepaarter MHCII Ketten zur Entstehung des Entwicklungsdefektes CD74-defizienter B-Zellen beitragen, konnte durch diese Arbeit nicht geklärt werden.

4.4.2 Die Akkumulation des N-terminalen Fragmentes von CD74 beeinflusst das endosomale Kompartiment

Die Feststellung, dass der in den *SPPL2a*^{-/-} Mäusen beobachtete B-Zell-Phänotyp auf die massive Akkumulation des CD74-NTFs zurückzuführen ist, führte zu der Frage, auf welche Weise dieses Fragment den inhibierenden Effekt auf die B-Zellen ausüben kann. Vorhergehende Arbeiten beschreiben einen Zusammenhang zwischen CD74 und der Regulation von Fusion und Reifung endosomaler Kompartimente (Gregers *et al.* 2003; Lagaudriere-Gesbert *et al.* 2002; Landsverk *et al.* 2009; Landsverk *et al.* 2011; Nordeng *et al.* 2002). So konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von CD74 zur Formierung vergrößerter Vakuolen, endosomalen Ursprungs führt (Nordeng *et al.* 2002). Es wurde postuliert, dass CD74 die Fusion von Endosomen fördert und eine Verzögerung der Reifung bewirkt. Vermutlich schützt diese Eigenschaft endozytierte Antigene und MHCII selbst vor einer zu schnellen Degradierung und ermöglicht so die Beladung von MHCII mit Peptiden geeigneter Größe (Landsverk *et al.* 2009; Landsverk *et al.* 2011).

Angenommen wird, dass freie negative Ladungen im N-terminalen, zytoplasmatischen Teil von CD74 zu einer Interaktion mit invarianten Ketten auf der Oberfläche anderer Endosomen und hierdurch zur Fusion der Kompartimente führen. CD74 enthält vier geladene Aminosäuren in seiner N-terminalen, zytoplasmatischen Region, von denen drei (Asparaginsäure) zu den sauren und eine (Arginin) zu den basischen Aminosäuren gehören. Durch diese Verteilung bekommt der zytoplasmatische Teil von CD74 eine negative Grundladung. Der Austausch einzelner dieser sauren Aminosäuren zeigte, dass die negative Ladung des N-Terminus entscheidend für den Einfluss auf das endosomale Kompartiment ist (Nordeng *et al.* 2002). Der genaue Mechanismus ist noch nicht ausreichend geklärt. Eine Beteiligung der *uncoating* ATPase Hsc70 an diesem Prozess, welche mit dem N-Terminus von CD74 interagiert, wird diskutiert (Lagaudriere-Gesbert *et al.* 2002).

Erste Hinweise für einen Einfluss von CD74 auf die endosomale Morphologie *in vivo* gaben die Untersuchungen Cathepsin S-defizienter Mäuse, in denen die Proteolyse der invarianten Kette inhibiert ist. Vergleichbar mit den Beobachtungen in den CD74-Überexpressionsstudien zeigten primäre B-Zellen der Tiere MHCII-positive, vergrößerte Endosomen, welche bei zusätzlicher Deletion von CD74 in *CathepsinS^{-/-} CD74^{-/-}* Mäusen nicht nachweisbar waren (Boes *et al.* 2005).

In den *SPPL2a^{-/-}* B-Zellen liegt eine sehr ähnliche Situation wie in den Cathepsin S-defizienten Zellen vor. Durch den verhinderten Abbau des CD74-NTFs akkumuliert dieses in den Zellen. Zudem ist in den B-Zellen ebenfalls eine Anhäufung von Vakuolen zu beobachten, in denen MHCII, CD74 (Abb. 4.2) und LAMP1 nachgewiesen werden konnten. Wie für die *Cathepsin S^{-/-}* Mäuse gezeigt, führte das zusätzliche Fehlen von CD74 in *SPPL2a^{-/-} CD74^{-/-}* Mäusen ebenfalls zu einer Normalisierung der endosomalen Morphologie. Diese Ergebnisse belegen den beschriebenen Zusammenhang zwischen erhöhten CD74-NTF-Konzentrationen und dem Einfluss auf die Struktur des endosomalen Kompartiments.

Wird jedoch von einem kausalen Zusammenhang zwischen akkumulierendem CD74-NTF und Störungen der B-Zell-Entwicklung ausgegangen, stellt sich im Weiteren die Frage, warum Cathepsin S-defiziente Mäuse, in denen eine ähnliche Situation bezüglich der CD74-NTF-Akkumulation vorliegt, keinen vergleichbaren B-Zell-Phänotyp aufweisen wie *SPPL2a^{-/-}* Mäuse (Shi *et al.* 1999). Die Proteolyse von CD74 durch Cathepsin S führt zur Freisetzung des CLIP-Fragmentes und ist somit essentiell für die spätere Beladung von MHCII mit zu präsentierendem Antigen. Dabei wird durch diese Prozessierung das NTF generiert, welches anschließend durch SPPL2a geschnitten werden kann. Möglicherweise kann die Defizienz von Cathepsin S durch die Aktivität anderer Cathepsine teilweise kompensiert

werden. Schon eine geringfügig verminderte Konzentration des N-terminalen Fragmentes könnte demnach einen Unterschied für die Auswirkungen auf die B-Zell-Entwicklung bedeuten. Tatsächlich wurde eine solche Fähigkeit Cathepsin F und Cathepsin L zugeschrieben (Shi *et al.* 1999; Shi *et al.* 2000). Die Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass auch in Cathepsin S-defizienten Mäusen ein Teil der MHCII-Moleküle mit Peptidantigenen beladen ist und diese an der Zelloberfläche präsentiert (Shi *et al.* 1999), (Abb. 4.2). Die Ergebnisse der *Western blot* Analysen in dieser Arbeit, bei denen B-Zell-Lysate SPPL2a- und Cathepsin S-defizienter Mäuse nebeneinander aufgetragen wurden, bestärken diese Annahme ebenfalls. Die Akkumulation des CD74-NTF erscheint in den *Cathepsin S*^{-/-} Lysaten deutlich geringer als in denen von *SPPL2a*^{-/-} Zellen.

Ein weiterer nennenswerter Unterschied zwischen dem bei Cathepsin S- und dem bei SPPL2a-Defizienz akkumulierenden CD74-NTF ist, dass das in SPPL2a-defizienten Zellen vorliegende NTF von dem CLIP-Fragment, der Hauptinteraktionssequenz mit MHCII, getrennt wurde. Im Unterschied hierzu enthält das CD74-NTF Cathepsin S-defizienter Tiere das CLIP-Fragment und liegt daher an MHCII gebunden vor (Abb. 4.2). Zudem wurde ein inhibierender Effekt von CD74 auf die Degradierung von MHCII beschrieben (Landsverk *et al.* 2011). Tatsächlich konnte in den *SPPL2a*^{-/-} B-Zellen eine Erhöhung sowohl der Oberflächen- als auch der Gesamtkonzentration von MHCII detektiert werden (Susann Hüttl, Biochemisches Institut, CAU Kiel), (Schneppenheim *et al.* 2013), (Abb. 4.2). In Cathepsin S-defizienten B-Zellen akkumuliert MHCII zwar ebenfalls intrazellulär, die Menge des Komplexes an der Oberfläche ist jedoch mit der auf Wildtyp-Zellen vergleichbar (Boes *et al.* 2005; Shi *et al.* 1999). Aufgrund der Überlegung, dass Fehlregulationen der MHCII-Homöostase ursächlich für eine defekte B-Zell-Reifung sein könnten (Labrecque *et al.* 1999; Maehr *et al.* 2004), könnte ein solcher Unterschied in Verteilung und Menge von MHCII, sowie des Vorliegens von MHCII an CD74-NTF gebunden (*Cathepsin S*^{-/-}) oder ungebunden (*SPPL2a*^{-/-}), ebenfalls eine Erklärung für die abweichenden Einflüsse auf die B-Zell-Entwicklung darstellen. Fraglich ist derzeit, auf welche Weise diese Veränderungen den beschriebenen B-Zell-Defekt bedingen können.

Möglich wäre zum einen, dass die reduzierte Oberflächenexpression des BAFF-Rezeptors durch einen inhibierten Transport an die Oberfläche begründet ist. Es ist zu prüfen, ob BAFF-R in den akkumulierenden Endosomen vermehrt detektiert werden kann.

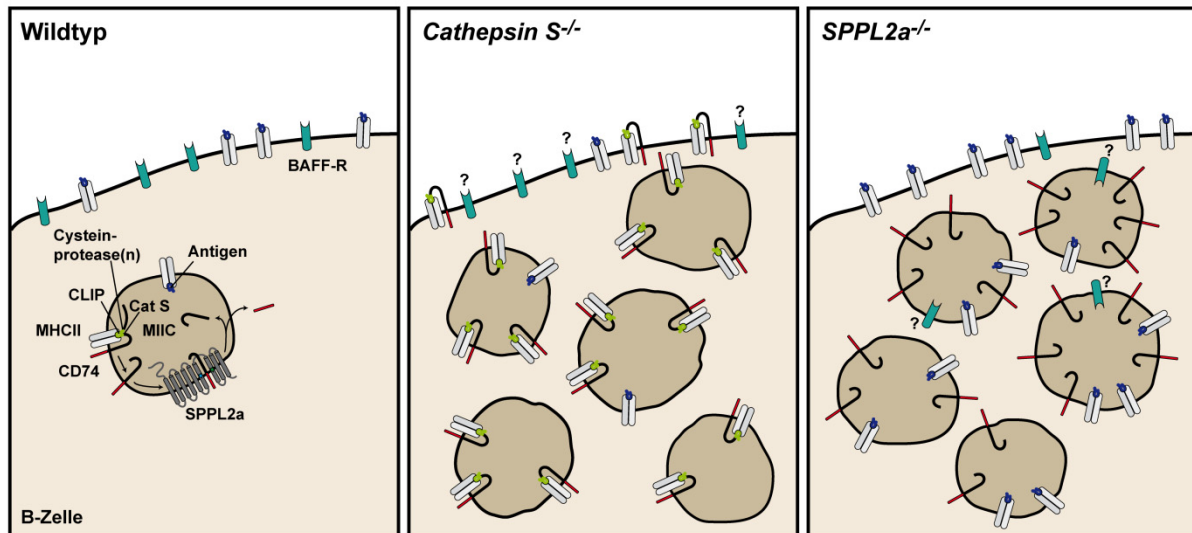


Abb. 4.2: Prozessierung von CD74 in Wildtyp-, *SPPL2a*^{-/-} und *Cathepsin S*^{-/-} B-Zellen. Die Proteolyse von CD74 durch Cathepsin S (Cat S) in Wildtyp-Zellen führt zu Freisetzung eines CD74-NTFs, welches anschließend durch SPPL2a innerhalb der Transmembranregion prozessiert wird. Durch den Abbau von CD74 kann MHCII an ein Peptidantigen binden und dieses an der Zelloberfläche präsentieren. In *Cathepsin S*^{-/-} B-Zellen bleibt das CD74-NTF über das CLIP-Fragment an MHCII gebunden. Durch den verzögerten Abbau von MHCII kommt es zur intrazellulären Akkumulation. Die Menge von MHCII an der Oberfläche unterscheidet sich nicht signifikant von der Konzentration auf Wildtyp-Zellen. Antigenpräsentation ist sehr begrenzt möglich. In den Zellen wurde eine Akkumulation endosomaler Vesikel beschrieben. In *SPPL2a*-defizienten B-Zellen akkumuliert das durch Cathepsin S freigesetzte N-terminale Fragment von CD74. Dies führt, wie auch in den *Cathepsin S*^{-/-} Zellen, zu einer Störung des endosomalen Systems, welche durch eine Anhäufung CD74- und MHCII-positiver Vesikel gekennzeichnet ist. MHCII wurde vermehrt an der Plasmamembran und intrazellulär detektiert. Die Oberflächenexpression des BAFF-Rs in *SPPL2a*^{-/-} B-Zellen ist reduziert. Möglicherweise liegt der Grund hierfür in einem reduzierten Transport des BAFF-Rs an die Plasmamembran.

Unentbehrlich für eine T-Zell-abhängige Aktivierung von B-Zellen ist zudem die Internalisierung des Komplexes aus BCR und gebundenem Antigen in MHCII Kompartimente. Hier erfolgen die Prozessierung des Antigens und die Bindung der generierten Peptide an MHCII. Der MHCII-Peptid-Komplex wird an die Zelloberfläche zurück transportiert und dort den CD4-positiven T-Helferzellen präsentiert (Neefjes *et al.* 2011). Für diesen Vorgang ist es notwendig, dass die Vesikel, welche den BCR mit gebundenem Antigen enthalten, mit den MHCII-Kompartimenten zusammentreffen und fusionieren. Es konnte nachgewiesen werden, dass das Aktin-assoziierte Motorprotein Myosin II für diesen Prozess essentiell ist. Dabei vermittelt anscheinend der zytosolische Teil von CD74 eine Interaktion zwischen Myosin II und MHCII-CD74-Komplexen. Durch die Inhibierung von Cathepsin S war demzufolge die Interaktion zwischen Myosin II und MHCII-CD74-Komplexen länger nachweisbar, da CD74 keiner Degradierung unterlag und assoziiert mit MHCII verblieb (Vascotto *et al.* 2007). In *SPPL2a*-defizienten Zellen liegt eine ähnliche Situation vor. Die Akkumulation des CD74-NTFs kann infolgedessen zu einer vollkommen veränderten Homöostase der BCR-

Internalisierung und Fusionierung mit MIIC führen. Während die Bindung internalisierter Antigene in Cathepsin S-defizienten Zellen durch die Interaktion zwischen dem CD74-CLIP-Fragment und MHCII verhindert wird, liegt die Antigenbindestelle in SPPL2a-defizienten B-Zellen frei. Peptide von internalisierten Antigenen könnten daher gebunden und präsentiert werden. Eine Überprüfung der Fähigkeit zur Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung von dendritischen SPPL2a-defizienten Zellen belegte, dass dieser Prozess in den untersuchten Zellen möglich ist (in Kooperation mit Prof. Dr. Ralf Dressel, Daten nicht gezeigt). Inwiefern daher die BCR-Internalisierung verändert ist und wie sich dies möglicherweise auf B-Zell-Homöostase und -Aktivierung auswirkt, ist zu untersuchen.

4.5 Warum wirkt sich SPPL2a-Defizienz spezifisch auf B-Zellen aus?

CD74 wird von allen antigenpräsentierenden Zellen exprimiert. Dazu gehören neben den B-Zellen auch dendritische Zellen und Makrophagen. Ein Effekt auf die Zellentwicklung und Funktionalität konnte jedoch in dieser Arbeit nur für B-Zellen festgestellt werden. Dendritische Zellen und Makrophagen waren in allen untersuchten Geweben in normaler Anzahl vorhanden. Dendritische Zellen besaßen zudem nach wie vor die Fähigkeit zur Antigenpräsentation und Aktivierung von CD4-positiven Zellen (4.4.2). Auch die Generierung der Zellen aus Knochenmarkvorläuferzellen war nicht beeinträchtigt (Daten nicht gezeigt).

Da der funktionale Zusammenhang zwischen akkumulierendem CD74-NTF und dem B-Zell-Entwicklungsdefekt noch ungeklärt ist, kann über den Grund für die selektive Auswirkung des Fragmentes auf B-Zellen in dieser Arbeit nur spekuliert werden. Sollte die Vermutung zutreffen, dass eine Störung der Signale über den BAFF-R oder den BCR zu dem beobachteten Phänotyp beitragen, würde dies erklären, weshalb der Effekt für B-Zellen spezifisch ist. Eine detaillierte Analyse SPPL2a-defizienter dendritischer Zellen und Makrophagen steht jedoch noch aus. So wurde in Cathepsin S-defizienten Mäusen nachgewiesen, dass akkumulierendes CD74-NTF durch die Interaktion mit Myosin II einen inhibierenden Einfluss auf die Mobilität von dendritischen Zellen ausübt (Faure-Andre *et al.* 2008). Inwiefern dies auch in *SPPL2a*^{-/-} Tieren der Fall ist, bleibt zu untersuchen.

Parallel zu dieser Arbeit publizierte Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zeigten zudem, dass eine Defizienz beziehungsweise Mutation von SPPL2a sich auch auf die Anzahl dendritischer Zellen auswirkte (Beisner *et al.* 2013; Bergmann *et al.* 2013). Dabei waren spezifisch die CD11c-positiven, CD8-negativen dendritischen Zellen reduziert, während CD8-positive und plasmazytoide dendritische Zellen in normaler beziehungsweise erhöhter Anzahl detektiert

wurden. Eine weitere Unterteilung in verschiedene Subpopulationen dendritischer Zellen erfolgte in der vorliegenden Arbeit nicht. Da dendritische Zellen in vergleichsweise geringer Anzahl in der Milz vertreten sind, ist diese weitere Auftrennung eventuell nötig, um einen Effekt der SPPL2a-Defizienz auf dendritische Zellen zu erkennen. Zudem wurden in dieser Arbeit nur die prozentualen Anteile der dendritischen Zellen an den lebenden Zellen bestimmt. Möglicherweise könnten weitere Messungen unter Berücksichtigung der absoluten Zellzahlen eine Beeinträchtigung dendritischer Zellen erkennen lassen.

4.6 Vergleich des beobachteten B-Zell-Defektes mit dem anderer SPPL2a-defizienter Mauslinien

Parallel zu den Ergebnissen dieser Arbeit wurden zwei weitere Arbeiten publiziert, welche die Auswirkungen von SPPL2a-Defizienz beziehungsweise Mutationen im *SPPL2a*-Gen auf die B-Zell-Entwicklung und -Funktionalität beschreiben. In den beiden Untersuchungen wurden unter anderem Mäuse verwendet, in denen *SPPL2a* durch N-Ethyl-N-Nitrosourea- (ENU-) Mutagenese verändert wurde. Während die Mutation in einer Maus zu einem Methionin zu Lysin Austausch (M252K) in der Transmembrandomäne 3 führte, waren in der anderen Maus sieben der neun Transmembrandomänen durch eine *frameshift*-Mutation deletiert (Beisner *et al.* 2013; Bergmann *et al.* 2013). Zudem wurde in einer der Arbeiten eine weitere Maus untersucht, die, den Angaben zufolge, defizient für SPPL2a war (Beisner *et al.* 2013), (Tab. 4.2).

Wie bereits zuvor erwähnt (4.5), wurde in diesen Mauslinien eine Reduktion von Subpopulationen dendritischer Zellen beobachtet, die ich in meiner Arbeit nicht feststellen konnte. Die durch ENU-Mutagenese generierte Maus, in der lediglich eine Mutation in der Transmembrandomäne 3 vorlag (*chomp B*), unterschied sich zudem von den beiden anderen Mäusen und der in dieser Arbeit untersuchten Maus in der Ausprägung des B-Zell-Phänotyps. Während die Mäuse, in denen SPPL2a weitestgehend fehlte, einen vergleichbaren B-Zell-Defekt zeigten, wie die für meine Arbeit verwendeten *SPPL2a*^{-/-} Tiere, war die B-Zell-Defizienz in den *chomp B* Mäusen schwächer ausgeprägt. Dies machte sich in der Subpopulation der B1 B-Zellen bemerkbar, die in den *chomp B* Mäusen nicht reduziert war. Damit übereinstimmend war die humorale Immunantwort nach Stimulation mit TNP-Ficoll nicht beeinträchtigt. Die Produktion von IgM nach Immunisierung mit Dinitrophenyl- (DNP-) KLH war ebenfalls nicht signifikant reduziert. Die Bestimmung der basalen Immunglobulintiter offenbarte keine (IgA) beziehungsweise nur eine geringe (IgM) Beeinträchtigung der IgA- und IgM-Konzentrationen im Serum (Tab. 4.2). Es konnte zudem gezeigt werden, dass das mutierte

chomp B SPPL2a nach wie vor in der Lage war, TNF α zu schneiden (Beisner *et al.* 2013). Die Ausprägung des Phänotyps ist demnach von der Art der Mutation von SPPL2a abhängig. Die Bedeutung der Proteolyse von CD74 durch SPPL2a für die B-Zell-Entwicklung konnte in beiden Arbeiten bestätigt werden.

Tab. 4.2: Immunologische Charakterisierung anderer Mauslinien mit Mutation im *SPPL2a*-Gen oder Defizienz der Protease.

Mauslinie	Mutation	Effekt
<i>Chomp B</i> (Beisner <i>et al.</i> 2013)	Austausch von Methionin gegen Lysin in dritter Transmembrandomäne von SPPL2a (M252K), generiert durch ENU-Mutagenese	<ul style="list-style-type: none"> • Reifungsdefekt von B-Zellen beim Übergang vom T1 in das T2 Stadium • Signifikante Reduktion der T2, folliculären und Marginalzonen B-Zellen • B1 B-Zellen im Peritonealraum nicht betroffen • Signifikante Reduktion myeloider dendritischer Zellen • Andere Immunzellpopulationen nicht betroffen • Signifikant reduzierte basale IgG-Konzentrationen im Serum, IgA und IgM schwächer betroffen • Signifikant reduzierte Konzentrationen von antigenspezifischem IgG1 nach T-Zell-abhängiger Immunisierung, antigenspezifische IgM-Konzentrationen nicht reduziert • Keine Beeinträchtigung der Immunantwort nach Immunisierung mit dem T-Zell-unabhängigen Antigen TNP-Ficoll
<i>SPPL2a^{-/-}</i> (Beisner <i>et al.</i> 2013)	Die Mäuse stammten von Deltagen. Die Defizienz von SPPL2a ist in der Arbeit als vollständig beschrieben. Details über die verwendete Gen- <i>Targeting</i> -Strategie wurden jedoch nicht publiziert. Der <i>knock-out</i> des Gens auf Proteinebene wurde in dieser Publikation nicht validiert.	<ul style="list-style-type: none"> • Reifungsdefekt von B-Zellen beim Übergang vom T1 in das T2 Stadium • Signifikante Reduktion der T2, folliculären, Marginalzonen und B1 B-Zellen • Signifikante Reduktion myeloider dendritischer Zellen • Andere Immunzellpopulationen nicht betroffen • Signifikant reduzierte basale Immunglobulin-Konzentrationen aller Klassen im Serum • Signifikant reduzierte Konzentrationen von antigenspezifischem IgG1 und IgM nach T-Zell-abhängiger Immunisierung • Keine Beeinträchtigung der Immunantwort nach Immunisierung mit dem T-Zell-unabhängigen Antigen TNP-Ficoll • Signifikant reduzierte Konzentrationen von antigenspezifischem IgG3 und IgM nach T-Zell-unabhängiger Immunisierung mit TNP-Ficoll
ENU-generierte Maus (Bergmann <i>et al.</i> 2013)	Leserastermutation führt zur Generierung eines zusätzlichen Stopp-Kodons Fehlen von sieben der neun Transmembrandomänen generiert durch ENU-Mutagenese	<ul style="list-style-type: none"> • B-Zell-Phänotyp vergleichbar mit <i>SPPL2a^{-/-}</i> (Beisner <i>et al.</i> 2013) • Reduktion CD8-negativer dendritischer Zellen

4.7 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen deutlich einen Zusammenhang zwischen der Akkumulation des CD74-NTFs und der Anhäufung von Endosomen in B-Zellen. Die Frage, wie es zu diesen Auswirkungen kommt, ist bisher jedoch noch ungeklärt. Diskutiert wurde die Bedeutung freier negativer Ladungen am N-Terminus von CD74 für eine erhöhte Fusionsrate endosomaler Kompartimente (Nordeng *et al.* 2002). Die exakte Klärung dieses Mechanismus war bisher jedoch nicht möglich. Die Identifizierung weiterer Interaktionspartner des CD74-NTFs, die hierfür eine Rolle spielen könnten, wäre wünschenswert. In den SPPL2a-defizienten Zellen könnten die Auswirkungen der CD74-NTF-Akkumulation, beispielsweise auf die intrazelluläre Verteilung potentieller Interaktionspartner, analysiert werden (Abb. 4.3a).

Die Ermittlung weiterer, in den vermehrten Vesikeln vorkommender Proteine ist aus verschiedenen Gründen interessant. Zum einen würden derartige Erkenntnisse zusätzliche wichtige Daten für die Charakterisierung der Kompartimente liefern. Andererseits ist bisher ungeklärt, ob die Vesikel-Akkumulation kausal mit dem Reifungsdefekt der B-Zellen verknüpft ist. Erkenntnisse über die in diesen Endosomen enthaltenen Proteine würden eventuell entscheidende Hinweise auf die funktionellen Auswirkungen der veränderten Morphologie ergeben. Eine wichtige Frage hierbei wäre, ob essentielle Rezeptoren wie BAFF-R, CD21 oder der BCR möglicherweise in diesen Vesikeln zurückgehalten werden und daher verringert an der Zelloberfläche detektiert werden. Dabei ist die ungenaue Betrachtung durch intrazelluläre Färbung und anschließende durchflusszytometrische Analysen nicht ausreichend und muss durch mikroskopische Untersuchungen ergänzt werden. Zudem wäre die Verwendung vergleichbarer T1 B-Zell-Populationen für diese Analysen nötig, um auszuschließen, dass eine detektierte Reduktion der Oberflächenexpression lediglich die Defizienz von T2 und muren B-Zellen in *SPPL2a*^{-/-} B-Lymphozyten widerspiegelt. Die Expression von TACI wurde bisher weder in T1 noch in Gesamt-B-Zellen analysiert und sollte überprüft werden (Abb. 4.3a). Für alle aufgeführten Proteine sollte zudem die Expression auf mRNA-Ebene betrachtet werden, um zu ermitteln, ob eine eventuell verminderte Oberflächenkonzentration möglicherweise auch durch eine veränderte Expressionsrate bedingt sein könnte. Aufgrund der Beschreibung, dass der BAFF-R einen Einfluss auf die Expression von CD21 ausübt (Mayne *et al.* 2009), ist vor allem eine Prüfung der CD21-Expression auf mRNA-Ebene interessant.

Weitere Analysen zur Untersuchung der funktionalen Konsequenzen des gestörten endosomalen Systems werden derzeit in dieser Arbeitsgruppe durchgeführt. So werden bei-

spielsweise Endozytosekapazität, endozytotischer Transport und Degradierung eines *Fluidphase*-Kargos (Ovalbumin) oder eines Markers für Rezeptor-vermittelte Endozytose (Transferrin-Rezeptor) in *SPPL2a*-defizienten B-Zellen untersucht und mit Wildtyp-Zellen verglichen. Mögliche Unterschiede könnten einen Hinweis darauf geben, welche Endozytosewege in den *SPPL2a*^{-/-} Mäusen betroffen sind (Abb. 4.3b).

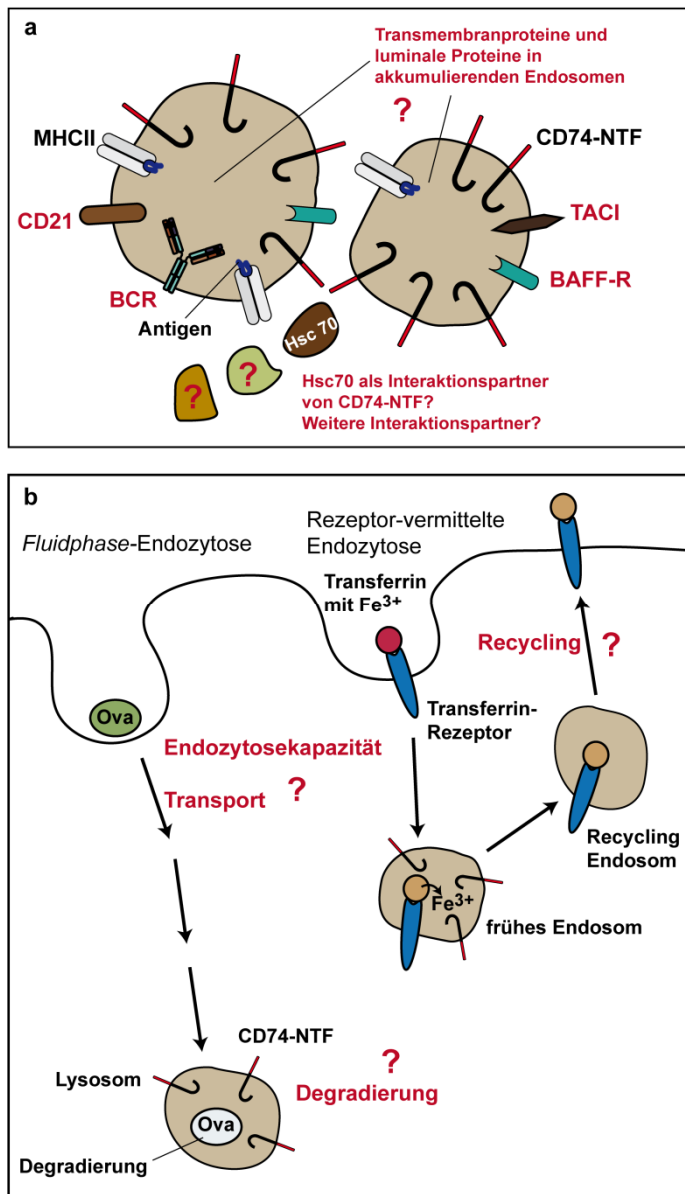


Abb. 4.3: Beeinflussung des endosomalen Systems durch CD74-NTF in *SPPL2a*^{-/-} B-Zellen. (a) Akkumulierendes CD74-NTF in *SPPL2a*-defizienten B-Zellen steht mit dem vermehrten Vorkommen endosomaler Vesikel in Verbindung. Der Mechanismus, der zur Entstehung der Vesikel führt, ist weitestgehend ungeklärt. Die Interaktion von CD74-NTFs auf der Oberfläche verschiedener Endosomen sowie mit Hsc70 wurde als möglicher Faktor in diesem Prozess beschrieben. Fraglich ist, ob es weitere Interaktionspartner der intrazellulären Domäne von CD74 gibt. Die Proteinzusammensetzung der Vesikel ist nicht ausreichend untersucht. Eine genaue Analyse des Vorkommens von BAFF-R, CD21, TACI und dem BCR, sowie weiteren Transmembranproteinen und luminalen Proteinen steht aus. (b) Die Endozytosekapazität, der Transport eines endozytierten Kargos sowie dessen Degradierung beziehungsweise Recycling sollen in *SPPL2a*^{-/-} B-Zellen untersucht werden. Ovalbumin (Ova) und der Transferrinrezeptor werden als Modellmoleküle für *Fluidphase* und Rezeptor-vermittelte Endozytose verwendet.

Cathepsin S-defiziente Mäuse zeigen eine Anhäufung von Endosomen, die mit der in *SPPL2a*^{-/-} Tieren vergleichbar ist und ebenfalls auf die Akkumulation von CD74-NTF zurückgeführt werden kann (Boes *et al.* 2005). Allerdings konnte in diesen Mäusen kein Einfluss auf die Reifung der B-Zellen festgestellt werden (Shi *et al.* 1999). Dies lässt vermuten, dass allein die morphologischen Veränderungen des endosomalen Kompartiments nicht zu

den dramatischen Auswirkungen in den B-Zellen führen. Ein wesentlicher Unterschied zwischen Cathepsin S- und SPPL2a-defizienten Zellen ist durch die Verteilung von MHCII gegeben und die Tatsache, dass CD74 in *Cathepsin S*^{-/-} Tieren über das CLIP-Fragment noch an MHCII gebunden ist (Shi *et al.* 1999). Da die zusätzliche Defizienz von MHCII in *CD74*^{-/-} Tieren ausreichend war, um den B-Zell-Defekt zu beheben (Maehr *et al.* 2004), könnte diese veränderte Verteilung von MHCII der ausschlaggebende Faktor sein, der für die Effekte auf die Signalwege verantwortlich ist und über das Schicksal der B-Zellen entscheidet. Aus diesem Grund wäre es spannend, zu erfahren, wie sich die zusätzliche Defizienz von MHCII in *SPPL2a*^{-/-} und *SPPL2a*^{-/-} *CD74*^{-/-} Mäusen auswirken würde.

Die Beschreibung einer Beeinträchtigung von dendritischen Zellen in parallel publizierten Arbeiten anderer Gruppen (Beisner *et al.* 2013; Bergmann *et al.* 2013) macht eine erneute kritische Betrachtung dieser Zellpopulation in unseren *SPPL2a*^{-/-} Mäusen nötig. Neben einer genauen Aufteilung in die verschiedenen Subpopulationen dendritischer Zellen und den Vergleich mit dem Wildtyp wird auch eine erneute durchflusszytometrische Untersuchung unter Berücksichtigung der absoluten Zellzahlen für sinnvoll erachtet. Außerdem wäre eine weitere funktionelle Analyse dieser Zellen im Hinblick auf ihre Mobilität angezeigt, da hierfür ein inhibierender Einfluss des CD74-NTFs durch die Interaktion mit Myosin II beschrieben wurde (Faure-Andre *et al.* 2008).

Trotz ubiquitärer Expression von SPPL2a in Wildtyp-Mäusen (Friedmann *et al.* 2004) scheint sich die Defizienz der Protease primär und sehr stark auf B-Zellen auszuwirken. B-Zellen spielen eine entscheidende Rolle bei vielen Autoimmunerkrankungen wie multipler Sklerose, systemischem Lupus erythematoses (SLE), rheumatoider Arthritis, Myasthenia gravis und Pemphigus vulgaris. Vor allem B1 und Marginalzonen B-Zellen werden verstärkt mit Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht (Townsend *et al.* 2010; Viau & Zouali 2005). Therapeutische Strategien zur Depletion der B-Zellen beruhen hauptsächlich auf der Anwendung von Antikörpern wie beispielsweise Rituximab (anti-CD20), (Dorner *et al.* 2009). Aufgrund der Beobachtung, dass SPPL2a-Defizienz sich auf alle Subpopulationen maturer B-Zellen auswirkt, die *SPPL2a*^{-/-} Mäuse darüber hinaus jedoch wenig beeinträchtigt scheinen, könnte die Inhibierung der Protease eine mögliche Therapieform zur Behandlung dieser Erkrankungen bieten. Die Verfügbarkeit von Inhibitoren des γ -Sekretasekomplexes (D'Onofrio *et al.* 2012), deren katalytische Untereinheit die SPPL-homologen Preseniline darstellen, machen die Entwicklung kleiner, spezifischer SPPL2a-Inhibitoren denkbar.

Des Weiteren könnte eine Defizienz oder Mutation von SPPL2a ursächlich für humane Erkrankungen sein. Hier ist vor allem die sehr heterogene Gruppe der *Common variable*

immunodeficiency- (CVID-) Patienten zu betrachten. Bei diesen Patienten liegt eine Störung der humoralen Immunantwort vor, die sich in der Defizienz aller oder einzelner Immunglobulinsubklassen bemerkbar macht. Mutationen, die für diese Erkrankung ursächlich sind, wurden bisher nur in wenigen Genen identifiziert. Hierzu gehören der BAFF-R, TACI, CD20 oder die Komponenten des B-Zell-Korezeptorkomplexes CD19, CD21 und CD81 (Eibel *et al.* 2010). Die Untersuchung von Patienten mit unbekannter Krankheitsursache auf Mutationen im *SPPL2a*-Gen wäre daher interessant.

In den letzten Jahren wurde außerdem gezeigt, dass die CD74-Expression an der Zelloberfläche nicht immer mit der Präsenz von MHCII einhergeht. So konnte die invariante Kette auch auf verschiedenen Zellarten, welche nicht zu den Antigen-präsentierenden Zellen gehören, wie beispielsweise Stroma- und Epithelialzellen nachgewiesen werden (Schwartz *et al.* 2009). In diesen Zellen wurde CD74 als Teil des Rezeptorkomplexes für das Zytokin *Macrophage migration inhibitory factor* (MIF) identifiziert. MIF reguliert die Aktivierung verschiedener Signalwege wie ERK, AKT, *Spleen tyrosine kinase* (Syk) und NF- κ B und erfüllt wichtige Funktionen für die Vermittlung der angeborenen und erworbenen Immunität, Zellüberleben und Proliferation (Abb. 4.4). Zudem wurde eine Bedeutung des Zytokins bei chronischen Entzündungsprozessen und der Entstehung von Krebs beschrieben (Beswick & Reyes 2009).

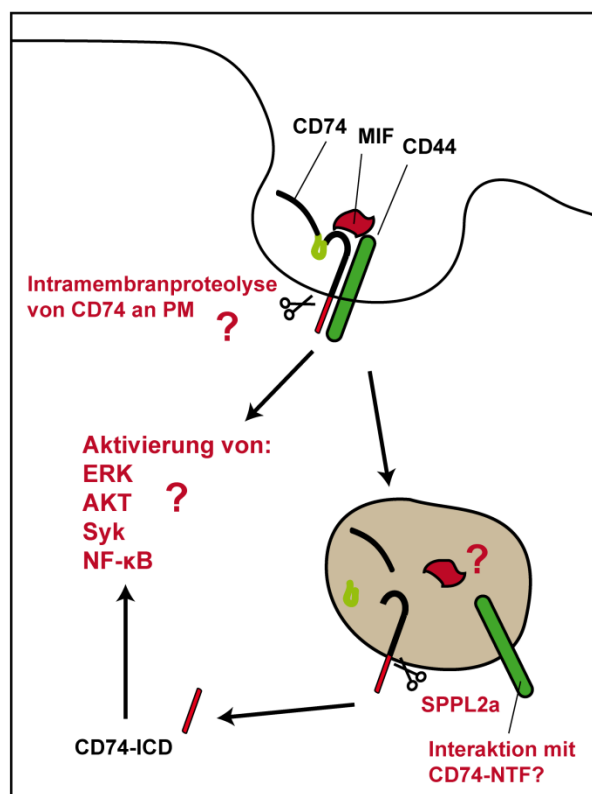


Abb 4.4: CD74 als Rezeptor des *Macrophage migration inhibitory factors* (MIF). CD74 bildet gemeinsam mit CD44 einen Teil des Rezeptorkomplexes von MIF. Im Anschluss an die Bindung des Zytokins erfolgt die Internalisierung des Komplexes. Die Signalkaskade, die schließlich die Aktivierung von ERK, AKT, Syk oder NF- κ B bewirkt, ist ungeklärt (Beswick & Reyes 2009). Die Freisetzung der CD74-ICD durch SPPL2a könnte hierfür wichtig sein. Ebenso ist ungeklärt, ob auch das N-terminale Fragment von CD74 mit CD44 interagiert. Eine Akkumulation des CD74-NTFs könnte bei vorhandener Interaktion zu einer kompetitiven Hemmung von CD44 führen. Der Verbleib und die Funktion von endozytiertem MIF sind nicht bekannt. PM, Plasmamembran

In verschiedenen Krebsarten, sowie bei entzündlichen Darmerkrankungen oder Infektionen mit *H. pylori* wurde eine Erhöhung der Expression von MIF und CD74 festgestellt. Gleichzeitig stellt CD74 den Rezeptor auf der Wirtszelle dar, über den *H. pylori* an die Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes bindet (Beswick & Reyes 2009; Zheng *et al.* 2012). Viele Aspekte der Signalübertragung durch die Interaktion von MIF und CD74 sind bisher ungeklärt. Inwiefern die Intramembranproteolyse durch SPPL2a einen Einfluss auf diesen Prozess und den Verlauf der genannten Erkrankungen hat, könnte in den *SPPL2a*^{-/-} Mäusen untersucht werden (Abb. 4.4).

5 Zusammenfassung

Das Prinzip der regulierten Intramembranproteolyse bezeichnet die proteolytische Prozessierung von Proteinen innerhalb von hydrophoben Transmembrandomänen. Dabei geht dem Intramembranschnitt in der Regel die Freisetzung der Substrat-Ektodomäne durch eine andere Protease voraus. Hierdurch wird nicht nur der Abbau von Proteinen in der Membran, sondern auch eine alternative Form der Signaltransduktion in Zellen ermöglicht, bei denen das Signalmolekül direkt aus einem Transmembranprotein freigesetzt wird. Die Presenilin-Homologe *Signal peptide peptidase like 2a* und *2b* (SPPL2a und SPPL2b) wurden als Intramembranproteasen mit vermuteter Spezifität für Typ II Transmembranproteine identifiziert. Hauptsächlich basierend auf Überexpressionsstudien wurden bisher TNF α , der Fas-Ligand und Bri2 als Substrate von SPPL2a/b beschrieben. Die physiologische Bedeutung dieser Proteasen war jedoch bisher weitestgehend ungeklärt.

In dieser Arbeit wurden SPPL2a- und SPPL2b-defiziente Mäuse (*SPPL2a*^{-/-} und *SPPL2b*^{-/-}) eingehend untersucht. Während in den *SPPL2b*^{-/-} Tieren bisher kein Unterschied zu Wildtyp-Kontrolltieren festgestellt werden konnte, zeigen *SPPL2a*^{-/-} Mäuse eine Beeinträchtigung der Zahnschmelzmaturierung sowie eine ausgeprägte Störung der Entwicklung und Funktionalität von B-Lymphozyten. Dabei ist die Reifung der B-Zellen beim Übergang vom Transitional 1 in das Transitional 2 Stadium in der Milz inhibiert. Dies führt zu einer Reduktion aller maturen B-Zell-Subpopulationen, einschließlich der B1 und Marginalzonen B-Zellen. Infolgedessen ist die humorale Immunantwort nach Immunisierung mit T-Zell-abhängigem beziehungsweise T-Zell-unabhängigem Antigen stark eingeschränkt. Zudem wurde eine Beeinträchtigung wichtiger Signalwege in B-Zellen des Transitional 1 Stadiums festgestellt. Diese konnte anhand der verminderten Oberflächenexpression des *B cell activating factor* Rezeptors (BAFF-R), sowie einem reduzierten Einstrom von Ca²⁺ über die Plasmamembran in die Zelle nach B-Zell-Rezeptorstimulation demonstriert werden.

Die Suche nach der molekularen Ursache für diesen beobachteten Phänotyp führte zur Identifizierung der invarianten Kette (CD74), einem Chaperon von MHCII Molekülen, als erstes *in vivo* validiertes Substrat von SPPL2a. Durch die fehlende Intramembranproteolyse von CD74 in SPPL2a-defizienten B-Zellen kommt es zur Akkumulation eines CD74-N-terminalen Fragmentes (NTF). Die erhöhten CD74-NTF-Konzentrationen führen zu einer deutlichen Beeinflussung des endosomalen Systems, die sich durch eine mikroskopisch darstellbar vermehrte Anzahl CD74-, MHCII- und LAMP1-positiver Vakuolen in den Zellen bemerkbar macht. Sowohl die Akkumulation endosomaler Vesikel als auch die Beeinträchtigung der

BAFF-Rezeptor-Oberflächenexpression und des B-Zell-Rezeptor-Signalwegs in *SPPL2a*^{-/-} B-Zellen konnte durch die zusätzliche Defizienz von CD74 in *SPPL2a/CD74* doppeldefizienten Mäusen verhindert werden. Parallel hierzu war der B-Zell-Defekt in diesen Tieren weitaus weniger stark ausgeprägt und entsprach dem in *CD74*^{-/-} Mäusen, in denen ebenfalls eine Reduktion der B-Zellen beschrieben wurde. Somit konnte belegt werden, dass die starke Störung der B-Zell-Entwicklung und -Funktion in *SPPL2a*^{-/-} Mäusen durch die Akkumulation des CD74-NTFs bedingt ist. Eine strenge Kontrolle der CD74-NTF-Konzentrationen durch *SPPL2a* ist daher essentiell für die Funktion des endosomalen Systems muriner B-Zellen sowie die Reifung und Funktionalität dieser Zellen.

6 Summary

The principle of intramembrane proteolysis describes the proteolytic processing of proteins within a hydrophobic transmembrane region, which is usually preceded by the release of an ectodomain by another protease. This mechanism not only enables the degradation of proteins from the membrane but also provides an alternative way of signal transduction by the direct release of a signal molecule from a transmembrane protein.

The presenilin homologues *Signal peptide peptidase like 2a* and *2b* (SPPL2a and SPPL2b) were identified as intramembrane proteases with a predicted specificity for type II transmembrane proteins. Based mainly on overexpression studies, Tumor necrosis factor α , the Fas ligand and Bri2 were described as substrates of SPPL2a/b. However until today the physiological relevance of these proteases was largely unknown.

In this study SPPL2a- and SPPL2b-deficient mice (*SPPL2a*^{-/-} and *SPPL2b*^{-/-}) were characterized in detail. While to date no differences could be observed between *SPPL2b*^{-/-} and wildtype mice, *SPPL2a*^{-/-} mice show an impairment of tooth enamel formation as well as a distinct disturbance of the development and function of B lymphocytes. Thereby maturation of B cells is disrupted at the step of differentiation from transitional stage 1 to transitional stage 2 in the spleen. This results in a reduction of all mature B cell subpopulations, including B1 and marginal zone B cells. As a consequence humoral immune responses after immunization with T cell dependent or T cell independent antigens are highly restricted. Additionally an impairment of important signaling pathways in transitional stage 1 B cells could be detected, which was demonstrated by a diminished surface expression of the B cell activating factor receptor (BAFF-R) as well as a reduced Ca²⁺ influx via the plasma membrane following B cell receptor stimulation.

In the course of elucidating the molecular background of the observed phenotype, invariant chain (CD74), a chaperone for MHCII molecules, was identified as the first *in vivo* validated substrate of SPPL2a. Due to the absence of intramembrane proteolysis of CD74 in SPPL2a-deficient B cells, a CD74-N-terminal fragment (NTF) accumulates. The elevated CD74-NTF levels result in a dramatic disturbance of the endosomal system, displayed by an increased number of CD74- MHCII- and LAMP1-containing vacuoles in the cells, as demonstrated by microscopical analyses. The accumulation of these endosomes as well as the impairment of BAFF-R surface expression and the B cell receptor signaling pathway in *SPPL2a*^{-/-} B cells could be rescued via additional ablation of CD74 in SPPL2a/CD74 double-deficient mice. Furthermore, the B cell deficiency in these animals was much less pronounced and was com-

parable to *CD74*^{-/-} mice which also show a reduction of B cells. Therefore it could be shown, that the strong disruption of B cell development and function in *SPPL2a*^{-/-} mice is caused by the accumulation of the CD74-NTF. Hence, strict control of CD74-NTF concentrations by SPPL2a is essential for function of the endosomal system in murine B cells as well as the maturation and functionality of these cells.

7 Literaturverzeichnis

Aderem, A. & Ulevitch, R. J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 406, 782-787.

Ahearn, J. M., Fischer, M. B., Croix, D., Goerg, S., Ma, M., Xia, J., Zhou, X., Howard, R. G., Rothstein, T. L. & Carroll, M. C. (1996). Disruption of the Cr2 locus results in a reduction in B-1a cells and in an impaired B cell response to T-dependent antigen. *Immunity*, 4, 251-262.

Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 783-801.

Allman, D. & Pillai, S. (2008). Peripheral B cell subsets. *Curr.Opin.Immunol.*, 20, 149-157.

Araki, K., Imaizumi, T., Sekimoto, T., Yoshinobu, K., Yoshimuta, J., Akizuki, M., Miura, K., Araki, M. & Yamamura, K. (1999). Exchangeable gene trap using the Cre/mutated lox system. *Cell Mol.Biol.(Noisy.-le-grand)*, 45, 737-750.

Attanavanich, K. & Kearney, J. F. (2004). Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells. *J.Immunol.*, 172, 803-811.

Baker, R. P., Young, K., Feng, L., Shi, Y. & Urban, S. (2007). Enzymatic analysis of a rhomboid intramembrane protease implicates transmembrane helix 5 as the lateral substrate gate. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 104, 8257-8262.

Baud, V. & Karin, M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.*, 11, 372-377.

Becker-Herman, S., Arie, G., Medvedovsky, H., Kerem, A. & Shachar, I. (2005). CD74 is a member of the regulated intramembrane proteolysis-processed protein family. *Mol.Biol.Cell*, 16, 5061-5069.

Beel, A. J. & Sanders, C. R. (2008). Substrate specificity of gamma-secretase and other intramembrane proteases. *Cell Mol.Life Sci.*, 65, 1311-1334.

- Behnke, J., Schneppenheim, J., Koch-Nolte, F., Haag, F., Saftig, P. & Schröder, B. (2011). Signal-peptide-peptidase-like 2a (SPPL2a) is targeted to lysosomes/late endosomes by a tyrosine motif in its C-terminal tail. *FEBS Lett.*, 585, 2951-2957.
- Beisner, D. R., Langerak, P., Parker, A. E., Dahlberg, C., Otero, F. J., Sutton, S. E., Poirot, L., Barnes, W., Young, M. A., Niessen, S., Wiltshire, T., Bodendorf, U., Martoglio, B., Cravatt, B. & Cooke, M. P. (2013). The intramembrane protease Sppl2a is required for B cell and DC development and survival via cleavage of the invariant chain. *J.Exp.Med.*, 210, 23-30.
- Bekris, L. M., Yu, C. E., Bird, T. D. & Tsuang, D. W. (2010). Genetics of Alzheimer disease. *J.Geriatr.Psychiatry Neurol.*, 23, 213-227.
- Ben-Shem, A., Fass, D. & Bibi, E. (2007). Structural basis for intramembrane proteolysis by rhomboid serine proteases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 104, 462-466.
- Bergmann, H., Yabas, M., Short, A., Miosge, L., Barthel, N., Teh, C. E., Roots, C. M., Bull, K. R., Jeelall, Y., Horikawa, K., Whittle, B., Balakishnan, B., Sjollem, G., Bertram, E. M., MacKay, F., Rimmer, A. J., Cornall, R. J., Field, M. A., Andrews, T. D., Goodnow, C. C. & Enders, A. (2013). B cell survival, surface BCR and BAFFR expression, CD74 metabolism, and CD8- dendritic cells require the intramembrane endopeptidase SPPL2A. *J.Exp.Med.*, 210, 31-40.
- Beswick, E. J. & Reyes, V. E. (2009). CD74 in antigen presentation, inflammation, and cancers of the gastrointestinal tract. *World J.Gastroenterol.*, 15, 2855-2861.
- Bikoff, E. K., Huang, L. Y., Episkopou, V., van, M. J., Germain, R. N. & Robertson, E. J. (1993). Defective major histocompatibility complex class II assembly, transport, peptide acquisition, and CD4+ T cell selection in mice lacking invariant chain expression. *J.Exp.Med.*, 177, 1699-1712.
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J. & Cerretti, D. P. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*, 385, 729-733.

Boes, M., van der, W. N., Peperzak, V., Kim, Y. M., Peters, P. J. & Ploegh, H. (2005). In vivo control of endosomal architecture by class II-associated invariant chain and cathepsin S. *Eur.J.Immunol.*, 35, 2552-2562.

Bozkulak, E. C. & Weinmaster, G. (2009). Selective use of ADAM10 and ADAM17 in activation of Notch1 signaling. *Mol.Cell Biol.*, 29, 5679-5695.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.*, 72, 248-254.

Brown, M. S. & Goldstein, J. L. (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*, 89, 331-340.

Brown, M. S., Ye, J., Rawson, R. B. & Goldstein, J. L. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell*, 100, 391-398.

Bullock, W. O., Fernandez, J. M. & Short, J. M. (1987). XL1-blue: a high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques*, 5, 376-379.

Cancro, M. P. (2004). Peripheral B-cell maturation: the intersection of selection and homeostasis. *Immunol.Rev.*, 197, 89-101.

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, 603-615.

Castellino, F., Han, R. & Germain, R. N. (2001). The transmembrane segment of invariant chain mediates binding to MHC class II molecules in a CLIP-independent manner. *Eur.J.Immunol.*, 31, 841-850.

Chang, D. W., Xing, Z., Capacio, V. L., Peter, M. E. & Yang, X. (2003). Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. *EMBO J.*, 22, 4132-4142.

- Chapman, H. A. (1998). Endosomal proteolysis and MHC class II function. *Curr.Opin.Immunol.*, 10, 93-102.
- Chaudhuri, J. & Alt, F. W. (2004). Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat.Rev.Immunol.*, 4, 541-552.
- Chen, G. & Goeddel, D. V. (2002). TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*, 296, 1634-1635.
- Chen, X. & Jensen, P. E. (2008). MHC class II antigen presentation and immunological abnormalities due to deficiency of MHC class II and its associated genes. *Exp.Mol.Pathol.*, 85, 40-44.
- Coffman, R. L. & Weissman, I. L. (1981). B220: a B cell-specific member of the T200 glycoprotein family. *Nature*, 289, 681-683.
- Crawshaw, S. G., Martoglio, B., Meacock, S. L. & High, S. (2004). A misassembled transmembrane domain of a polytopic protein associates with signal peptide peptidase. *Biochem.J.*, 384, 9-17.
- Cresswell, P. (1994). Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu.Rev.Immunol.*, 12, 259-293.
- D'Onofrio, G., Panza, F., Frisardi, V., Solfrizzi, V., Imbimbo, B. P., Paroni, G., Cascavilla, L., Seripa, D. & Pilotto, A. (2012). Advances in the identification of gamma-secretase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert.Opin.Drug Discov.*, 7, 19-37.
- Davies, D. R. & Chacko, S. (1993). Antibody structure. *Acc.Chem.Res.*, 26, 421-427.
- Domonkos, A., Udvardy, A., Laszlo, L., Nagy, T. & Duda, E. (2001). Receptor-like properties of the 26 kDa transmembrane form of TNF. *Eur.Cytokine Netw.*, 12, 411-419.
- Dorner, T., Radbruch, A. & Burmester, G. R. (2009). B-cell-directed therapies for autoimmune disease. *Nat.Rev.Rheumatol.*, 5, 433-441.

Duan, B. & Morel, L. (2006). Role of B-1a cells in autoimmunity. *Autoimmun.Rev.*, 5, 403-408.

Duncan, E. A., Dave, U. P., Sakai, J., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. (1998). Second-site cleavage in sterol regulatory element-binding protein occurs at transmembrane junction as determined by cysteine panning. *J.Biol.Chem.*, 273, 17801-17809.

Early, P., Rogers, J., Davis, M., Calame, K., Bond, M., Wall, R. & Hood, L. (1980). Two mRNAs can be produced from a single immunoglobulin mu gene by alternative RNA processing pathways. *Cell*, 20, 313-319.

Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J. T., Pesold, B., Steiner, H. & Haass, C. (2003). Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat.Cell Biol.*, 5, 486-488.

Ehrmann, M. & Clausen, T. (2004). Proteolysis as a regulatory mechanism. *Annu.Rev.Genet.*, 38, 709-724.

Eibel, H., Salzer, U. & Warnatz, K. (2010). Common variable immunodeficiency at the end of a prospering decade: towards novel gene defects and beyond. *Curr.Opin.Allergy Clin.Immunol.*, 10, 526-533.

Eissner, G., Kolch, W. & Scheurich, P. (2004). Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 15, 353-366.

Engelke, M., Engels, N., Dittmann, K., Stork, B. & Wienands, J. (2007). Ca²⁺ signaling in antigen receptor-activated B lymphocytes. *Immunol.Rev.*, 218, 235-246.

Fanning, L. J., Connor, A. M. & Wu, G. E. (1996). Development of the immunoglobulin repertoire. *Clin.Immunol.Immunopathol.*, 79, 1-14.

Faure-Andre, G., Vargas, P., Yuseff, M. I., Heuze, M., Diaz, J., Lankar, D., Steri, V., Manry, J., Hugues, S., Vascotto, F., Boulanger, J., Raposo, G., Bono, M. R., Roseblatt, M., Piel, M. & Lennon-Dumenil, A. M. (2008). Regulation of dendritic cell migration by CD74, the MHC class II-associated invariant chain. *Science*, 322, 1705-1710.

Fleming, H. E., Milne, C. D. & Paige, C. J. (2004). CD45-deficient mice accumulate Pro-B cells both in vivo and in vitro. *J.Immunol.*, 173, 2542-2551.

Fleming, S. D., Shea-Donohue, T., Guthridge, J. M., Kulik, L., Waldschmidt, T. J., Gipson, M. G., Tsokos, G. C. & Holers, V. M. (2002). Mice deficient in complement receptors 1 and 2 lack a tissue injury-inducing subset of the natural antibody repertoire. *J.Immunol.*, 169, 2126-2133.

Fluhrer, R., Grammer, G., Israel, L., Condrón, M. M., Haffner, C., Friedmann, E., Bohland, C., Imhof, A., Martoglio, B., Teplow, D. B. & Haass, C. (2006). A gamma-secretase-like intramembrane cleavage of TNFalpha by the GxGD aspartyl protease SPPL2b. *Nat.Cell Biol.*, 8, 894-896.

Fluhrer, R., Martin, L., Klier, B., Haug-Kroper, M., Grammer, G., Nuscher, B. & Haass, C. (2012). The alpha-helical content of the transmembrane domain of the British dementia protein-2 (Bri2) determines its processing by signal peptide peptidase-like 2b (SPPL2b). *J.Biol.Chem.*, 287, 5156-5163.

Fluhrer, R., Steiner, H. & Haass, C. (2009). Intramembrane Proteolysis by Signal Peptide Peptidases: A Comparative Discussion of GXGD-type Aspartyl Proteases. *J.Biol.Chem.*, 284, 13975-13979.

Forster, R., Mattis, A. E., Kremmer, E., Wolf, E., Brem, G. & Lipp, M. (1996). A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell*, 87, 1037-1047.

Friedmann, E., Hauben, E., Maylandt, K., Schleege, S., Vreugde, S., Lichtenthaler, S. F., Kuhn, P. H., Stauffer, D., Rovelli, G. & Martoglio, B. (2006). SPPL2a and SPPL2b promote intramembrane proteolysis of TNFalpha in activated dendritic cells to trigger IL-12 production. *Nat.Cell Biol.*, 8, 843-848.

Friedmann, E., Lemberg, M. K., Weihofen, A., Dev, K. K., Dengler, U., Rovelli, G. & Martoglio, B. (2004). Consensus analysis of signal peptide peptidase and homologous human aspartic proteases reveals opposite topology of catalytic domains compared with presenilins. *J.Biol.Chem.*, 279, 50790-50798.

Gardby, E. & Lycke, N. Y. (2000). CD19-deficient mice exhibit poor responsiveness to oral immunization despite evidence of unaltered total IgA levels, germinal centers and IgA-isotype switching in Peyer's patches. *Eur.J.Immunol.*, 30, 1861-1871.

Ghosn, E. E., Sadate-Ngatchou, P., Yang, Y., Herzenberg, L. A. & Herzenberg, L. A. (2011). Distinct progenitors for B-1 and B-2 cells are present in adult mouse spleen. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 108, 2879-2884.

Golde, T. E., Wolfe, M. S. & Greenbaum, D. C. (2009). Signal peptide peptidases: a family of intramembrane-cleaving proteases that cleave type 2 transmembrane proteins. *Semin.Cell Dev.Biol.*, 20, 225-230.

Goldman, J. P., Blundell, M. P., Lopes, L., Kinnon, C., Di Santo, J. P. & Thrasher, A. J. (1998). Enhanced human cell engraftment in mice deficient in RAG2 and the common cytokine receptor gamma chain. *Br.J.Haematol.*, 103, 335-342.

Golovkina, T. V., Shlomchik, M., Hannum, L. & Chervonsky, A. (1999). Organogenic role of B lymphocytes in mucosal immunity. *Science*, 286, 1965-1968.

Gorelik, L., Gilbride, K., Dobles, M., Kalled, S. L., Zandman, D. & Scott, M. L. (2003). Normal B cell homeostasis requires B cell activation factor production by radiation-resistant cells. *J.Exp.Med.*, 198, 937-945.

Gregers, T. F., Nordeng, T. W., Birkeland, H. C., Sandlie, I. & Bakke, O. (2003). The cytoplasmic tail of invariant chain modulates antigen processing and presentation. *Eur.J.Immunol.*, 33, 277-286.

Guinamard, R., Okigaki, M., Schlessinger, J. & Ravetch, J. V. (2000). Absence of marginal zone B cells in Pyk-2-deficient mice defines their role in the humoral response. *Nat.Immunol.*, 1, 31-36.

Haapasalo, A. & Kovacs, D. M. (2011). The many substrates of presenilin/gamma-secretase. *J.Alzheimers.Dis.*, 25, 3-28.

Harbut, M. B., Patel, B. A., Yeung, B. K., McNamara, C. W., Bright, A. T., Ballard, J., Supek, F., Golde, T. E., Winzeler, E. A., Diagana, T. T. & Greenbaum, D. C. (2012). Target-

ing the ERAD pathway via inhibition of signal peptide peptidase for antiparasitic therapeutic design. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*

Hardy, R. R. & Hayakawa, K. (2001). B cell development pathways. *Annu.Rev.Immunol.*, 19, 595-621.

Hardy, R. R., Kincade, P. W. & Dorshkind, K. (2007). The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage. *Immunity.*, 26, 703-714.

Hayakawa, K., Hardy, R. R. & Herzenberg, L. A. (1986). Peritoneal Ly-1 B cells: genetic control, autoantibody production, increased lambda light chain expression. *Eur.J.Immunol.*, 16, 450-456.

Hayakawa, K., Hardy, R. R., Parks, D. R. & Herzenberg, L. A. (1983). The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice. *J.Exp.Med.*, 157, 202-218.

He, B., Chadburn, A., Jou, E., Schattner, E. J., Knowles, D. M. & Cerutti, A. (2004). Lymphoma B cells evade apoptosis through the TNF family members BAFF/BLyS and APRIL. *J.Immunol.*, 172, 3268-3279.

Hofmann, M. W., Honing, S., Rodionov, D., Dobberstein, B., von, F. K. & Bakke, O. (1999). The leucine-based sorting motifs in the cytoplasmic domain of the invariant chain are recognized by the clathrin adaptors AP1 and AP2 and their medium chains. *J.Biol.Chem.*, 274, 36153-36158.

Hohlbaum, A. M., Moe, S. & Marshak-Rothstein, A. (2000). Opposing effects of transmembrane and soluble Fas ligand expression on inflammation and tumor cell survival. *J.Exp.Med.*, 191, 1209-1220.

Holler, N., Tardivel, A., Kovacsovics-Bankowski, M., Hertig, S., Gaide, O., Martinon, F., Tinel, A., Deperthes, D., Calderara, S., Schulthess, T., Engel, J., Schneider, P. & Tschopp, J. (2003). Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol.Cell Biol.*, 23, 1428-1440.

Honjo, T. (1983). Immunoglobulin genes. *Annu.Rev.Immunol.*, 1, 499-528.

- Horiuchi, K., Kimura, T., Miyamoto, T., Takaishi, H., Okada, Y., Toyama, Y. & Blobel, C. P. (2007). Cutting edge: TNF-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) inactivation in mouse myeloid cells prevents lethality from endotoxin shock. *J.Immunol.*, 179, 2686-2689.
- Houseweart, M. K., Pennacchio, L. A., Vilaythong, A., Peters, C., Noebels, J. L. & Myers, R. M. (2003). Cathepsin B but not cathepsins L or S contributes to the pathogenesis of Unverricht-Lundborg progressive myoclonus epilepsy (EPM1). *J.Neurobiol.*, 56, 315-327.
- Hu, J. C., Chun, Y. H., Al, H. T. & Simmer, J. P. (2007). Enamel formation and amelogenesis imperfecta. *Cells Tissues.Organs*, 186, 78-85.
- Janeway, C., Walport, M., Travers, P., Murphy, K. P. & Ehrenstein, M. (2008). *Janeway's immunobiology*. New York, NY: Garland Science.
- Jorissen, E., Prox, J., Bernreuther, C., Weber, S., Schwanbeck, R., Serneels, L., Snellinx, A., Craessaerts, K., Thathiah, A., Tesseur, I., Bartsch, U., Weskamp, G., Blobel, C. P., Glatzel, M., De, S. B. & Saftig, P. (2010). The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex. *J.Neurosci.*, 30, 4833-4844.
- Kaether, C., Haass, C. & Steiner, H. (2006). Assembly, trafficking and function of gamma-secretase. *Neurodegener.Dis.*, 3, 275-283.
- Kavurma, M. M. & Khachigian, L. M. (2003). Signaling and transcriptional control of Fas ligand gene expression. *Cell Death.Differ.*, 10, 36-44.
- Khan, W. N. (2009). B cell receptor and BAFF receptor signaling regulation of B cell homeostasis. *J.Immunol.*, 183, 3561-3567.
- Khan, W. N., Alt, F. W., Gerstein, R. M., Malynn, B. A., Larsson, I., Rathbun, G., Davidson, L., Muller, S., Kantor, A. B., Herzenberg, L. A. & . (1995). Defective B cell development and function in Btk-deficient mice. *Immunity.*, 3, 283-299.
- Kim, S. H., Wang, R., Gordon, D. J., Bass, J., Steiner, D. F., Lynn, D. G., Thinakaran, G., Meredith, S. C. & Sisodia, S. S. (1999). Furin mediates enhanced production of fibrillogenic ABri peptides in familial British dementia. *Nat.Neurosci.*, 2, 984-988.

Kipps, T. J. (1989). The CD5 B cell. *Adv.Immunol.*, 47, 117-185.

Kirkin, V., Cahuzac, N., Guardiola-Serrano, F., Huault, S., Luckerath, K., Friedmann, E., Novac, N., Wels, W. S., Martoglio, B., Hueber, A. O. & Zornig, M. (2007). The Fas ligand intracellular domain is released by ADAM10 and SPPL2a cleavage in T-cells. *Cell Death.Differ.*, 14, 1678-1687.

Krawitz, P., Haffner, C., Fluhrer, R., Steiner, H., Schmid, B. & Haass, C. (2005). Differential localization and identification of a critical aspartate suggest non-redundant proteolytic functions of the presenilin homologues SPPL2b and SPPL3. *J.Biol.Chem.*, 280, 39515-39523.

Kreuzaler, M., Rauch, M., Salzer, U., Birmelin, J., Rizzi, M., Grimbacher, B., Plebani, A., Lougaris, V., Quinti, I., Thon, V., Litzman, J., Schlesier, M., Warnatz, K., Thiel, J., Rolink, A. G. & Eibel, H. (2012). Soluble BAFF levels inversely correlate with peripheral B cell numbers and the expression of BAFF receptors. *J.Immunol.*, 188, 497-503.

Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I. & Lu, S. D. (1988). A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell*, 53, 45-53.

Kurosaka, D., LeBien, T. W. & Pribyl, J. A. (1999). Comparative studies of different stromal cell microenvironments in support of human B-cell development. *Exp.Hematol.*, 27, 1271-1281.

Kwon, K., Hutter, C., Sun, Q., Bilic, I., Cobaleda, C., Malin, S. & Busslinger, M. (2008). Instructive role of the transcription factor E2A in early B lymphopoiesis and germinal center B cell development. *Immunity.*, 28, 751-762.

Labrecque, N., Madsen, L., Fugger, L., Benoist, C. & Mathis, D. (1999). Toxic MHC class II beta chains. *Immunity.*, 11, 515-516.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

- Lagaudriere-Gesbert, C., Newmyer, S. L., Gregers, T. F., Bakke, O. & Ploegh, H. L. (2002). Uncoating ATPase Hsc70 is recruited by invariant chain and controls the size of endocytic compartments. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 99, 1515-1520.
- Lal, M. & Caplan, M. (2011). Regulated intramembrane proteolysis: signaling pathways and biological functions. *Physiology.(Bethesda.)*, 26, 34-44.
- Landsverk, O. J., Bakke, O. & Gregers, T. F. (2009). MHC II and the endocytic pathway: regulation by invariant chain. *Scand.J.Immunol.*, 70, 184-193.
- Landsverk, O. J., Barois, N., Gregers, T. F. & Bakke, O. (2011). Invariant chain increases the half-life of MHC II by delaying endosomal maturation. *Immunol.Cell Biol.*, 89, 619-629.
- Lavie, F., Miceli-Richard, C., Ittah, M., Sellam, J., Gottenberg, J. E. & Mariette, X. (2007). Increase of B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) after rituximab treatment: insights into a new regulating system of BAFF production. *Ann.Rheum.Dis.*, 66, 700-703.
- Lee, J. R., Urban, S., Garvey, C. F. & Freeman, M. (2001). Regulated intracellular ligand transport and proteolysis control EGF signal activation in *Drosophila*. *Cell*, 107, 161-171.
- Lee, S. O., Cho, K., Cho, S., Kim, I., Oh, C. & Ahn, K. (2010). Protein disulphide isomerase is required for signal peptide peptidase-mediated protein degradation. *EMBO J.*, 29, 363-375.
- Lemberg, M. K., Bland, F. A., Weihofen, A., Braud, V. M. & Martoglio, B. (2001). Intramembrane proteolysis of signal peptides: an essential step in the generation of HLA-E epitopes. *J.Immunol.*, 167, 6441-6446.
- Lemberg, M. K. & Freeman, M. (2007). Cutting proteins within lipid bilayers: rhomboid structure and mechanism. *Mol.Cell*, 28, 930-940.
- Lemberg, M. K. & Martoglio, B. (2002). Requirements for signal peptide peptidase-catalyzed intramembrane proteolysis. *Mol.Cell*, 10, 735-744.
- Lesinski, G. B. & Westerink, M. A. (2001). Novel vaccine strategies to T-independent antigens. *J.Microbiol.Methods*, 47, 135-149.

Levy-Lahad, E., Wijsman, E. M., Nemens, E., Anderson, L., Goddard, K. A., Weber, J. L., Bird, T. D. & Schellenberg, G. D. (1995). A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science*, 269, 970-973.

Liaskou, E., Wilson, D. V. & Oo, Y. H. (2012). Innate immune cells in liver inflammation. *Mediators.Inflamm.*, 2012, 949157.

Locksley, R. M., Killeen, N. & Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor super-families: integrating mammalian biology. *Cell*, 104, 487-501.

Loder, F., Mutschler, B., Ray, R. J., Paige, C. J., Sideras, P., Torres, R., Lamers, M. C. & Carsetti, R. (1999). B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J.Exp.Med.*, 190, 75-89.

Loureiro, J., Lilley, B. N., Spooner, E., Noriega, V., Tortorella, D. & Ploegh, H. L. (2006). Signal peptide peptidase is required for dislocation from the endoplasmic reticulum. *Nature*, 441, 894-897.

Lu, S. H., Jeon, A. H., Schmitt-Ulms, G., Qamar, S., Dodd, R., McDonald, B., Li, Y., Meadows, W., Cox, K., Bohm, C., Chen, F., Fraser, P. & George-Hyslop, P. S. (2012). Vigilin interacts with signal peptide peptidase. *Proteome.Sci.*, 10, 33.

Luckerath, K., Kirkin, V., Melzer, I. M., Thalheimer, F. B., Siele, D., Milani, W., Adler, T., guilar-Pimentel, A., Horsch, M., Michel, G., Beckers, J., Busch, D. H., Ollert, M., Gailus-Durner, V., Fuchs, H., Hrabe de, A. M., Staal, F. J., Rajalingam, K., Hueber, A. O., Strobl, L. J., Zimmer-Strobl, U. & Zornig, M. (2011). Immune modulation by Fas ligand reverse signaling: lymphocyte proliferation is attenuated by the intracellular Fas ligand domain. *Blood*, 117, 519-529.

Lüllmann-Rauch, R. (2009). *Taschenlehrbuch Histologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.

Luning Prak, E. T., Monestier, M. & Eisenberg, R. A. (2011). B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 1217, 96-121.

- Lutz, M. B., Kukutsch, N., Ogilvie, A. L., Rossner, S., Koch, F., Romani, N. & Schuler, G. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J.Immunol.Methods*, 223, 77-92.
- Lyko, F., Martoglio, B., Jungnickel, B., Rapoport, T. A. & Dobberstein, B. (1995). Signal sequence processing in rough microsomes. *J.Biol.Chem.*, 270, 19873-19878.
- MacKay, F. & Schneider, P. (2009). Cracking the BAFF code. *Nat.Rev.Immunol.*, 9, 491-502.
- MacLennan, I. C. (1994). Germinal centers. *Annu.Rev.Immunol.*, 12, 117-139.
- Maehr, R., Kraus, M. & Ploegh, H. L. (2004). Mice deficient in invariant-chain and MHC class II exhibit a normal mature B2 cell compartment. *Eur.J.Immunol.*, 34, 2230-2236.
- Martin, F., Oliver, A. M. & Kearney, J. F. (2001). Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity.*, 14, 617-629.
- Martin, L., Fluhrer, R., Reiss, K., Kremmer, E., Saftig, P. & Haass, C. (2008). Regulated intramembrane proteolysis of Bri2 (Itm2b) by ADAM10 and SPPL2a/SPPL2b. *J.Biol.Chem.*, 283, 1644-1652.
- Matza, D., Kerem, A., Medvedovsky, H., Lantner, F. & Shachar, I. (2002a). Invariant chain-induced B cell differentiation requires intramembrane proteolytic release of the cytosolic domain. *Immunity.*, 17, 549-560.
- Matza, D., Kerem, A. & Shachar, I. (2003). Invariant chain, a chain of command. *Trends Immunol.*, 24, 264-268.
- Matza, D., Lantner, F., Bogoch, Y., Flaishon, L., Hershkovich, R. & Shachar, I. (2002b). Invariant chain induces B cell maturation in a process that is independent of its chaperonic activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 99, 3018-3023.

- Matza, D., Wolstein, O., Dikstein, R. & Shachar, I. (2001). Invariant chain induces B cell maturation by activating a TAF(II)105-NF-kappaB-dependent transcription program. *J.Biol.Chem.*, 276, 27203-27206.
- Mayne, C. G., Amanna, I. J. & Hayes, C. E. (2009). Murine BAFF-receptor residues 168-175 are essential for optimal CD21/35 expression but dispensable for B cell survival. *Mol.Immunol.*, 47, 590-599.
- Mayrhofer, G. (1997). Peyer's patch organogenesis--cytokines rule, OK? *Gut*, 41, 707-709.
- McLauchlan, J., Lemberg, M. K., Hope, G. & Martoglio, B. (2002). Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J.*, 21, 3980-3988.
- Melamed, D., Benschop, R. J., Cambier, J. C. & Nemazee, D. (1998). Developmental regulation of B lymphocyte immune tolerance compartmentalizes clonal selection from receptor selection. *Cell*, 92, 173-182.
- Mohler, K. M., Sleath, P. R., Fitzner, J. N., Cerretti, D. P., Alderson, M., Kerwar, S. S., Torrance, D. S., Otten-Evans, C., Greenstreet, T., Weerawarna, K. & . (1994). Protection against a lethal dose of endotoxin by an inhibitor of tumour necrosis factor processing. *Nature*, 370, 218-220.
- Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R. S., Herrup, K., Tonegawa, S. & Papaioannou, V. E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell*, 68, 869-877.
- Montecino-Rodriguez, E. & Dorshkind, K. (2006). New perspectives in B-1 B cell development and function. *Trends Immunol.*, 27, 428-433.
- Müller-Esterl, W. (2009). *Biochemie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.*, 51 Pt 1, 263-273.
- Nagata, S. & Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science*, 267, 1449-1456.

- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Bramow-Newerly, W. & Roder, J. C. (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 90, 8424-8428.
- Nakagawa, T. Y., Brissette, W. H., Lira, P. D., Griffiths, R. J., Petrushova, N., Stock, J., McNeish, J. D., Eastman, S. E., Howard, E. D., Clarke, S. R., Rosloniec, E. F., Elliott, E. A. & Rudensky, A. Y. (1999). Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity*, 10, 207-217.
- Neefjes, J., Jongsma, M. L., Paul, P. & Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat.Rev.Immunol.*, 11, 823-836.
- Nordeng, T. W., Gregers, T. F., Kongsvik, T. L., Meresse, S., Gorvel, J. P., Jourdan, F., Motta, A. & Bakke, O. (2002). The cytoplasmic tail of invariant chain regulates endosome fusion and morphology. *Mol.Biol.Cell*, 13, 1846-1856.
- Nyborg, A. C., Kornilova, A. Y., Jansen, K., Ladd, T. B., Wolfe, M. S. & Golde, T. E. (2004). Signal peptide peptidase forms a homodimer that is labeled by an active site-directed gamma-secretase inhibitor. *J.Biol.Chem.*, 279, 15153-15160.
- O' Reilly, L. A., Tai, L., Lee, L., Kruse, E. A., Grabow, S., Fairlie, W. D., Haynes, N. M., Tarlinton, D. M., Zhang, J. G., Belz, G. T., Smyth, M. J., Bouillet, P., Robb, L. & Strasser, A. (2009). Membrane-bound Fas ligand only is essential for Fas-induced apoptosis. *Nature*, 461, 659-663.
- Parker, D. C. (1993). T cell-dependent B cell activation. *Annu.Rev.Immunol.*, 11, 331-360.
- Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Episkopou, V. & Kollias, G. (1996). Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J.Exp.Med.*, 184, 1397-1411.
- Peter, M. E., Budd, R. C., Desbarats, J., Hedrick, S. M., Hueber, A. O., Newell, M. K., Owen, L. B., Pope, R. M., Tschopp, J., Wajant, H., Wallach, D., Wiltrout, R. H., Zornig, M. & Lynch, D. H. (2007). The CD95 receptor: apoptosis revisited. *Cell*, 129, 447-450.

- Peter, M. E. & Krammer, P. H. (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death.Differ.*, 10, 26-35.
- Peterson, M. L., Gimmi, E. R. & Perry, R. P. (1991). The developmentally regulated shift from membrane to secreted mu mRNA production is accompanied by an increase in cleavage-polyadenylation efficiency but no measurable change in splicing efficiency. *Mol.Cell Biol.*, 11, 2324-2327.
- Pillai, S., Cariappa, A. & Moran, S. T. (2005). Marginal zone B cells. *Annu.Rev.Immunol.*, 23, 161-196.
- Plant, G. T., Revesz, T., Barnard, R. O., Harding, A. E. & Gautier-Smith, P. C. (1990). Familial cerebral amyloid angiopathy with nonneuritic amyloid plaque formation. *Brain*, 113 (Pt 3), 721-747.
- Pomerantz, J. L. & Baltimore, D. (2002). Two pathways to NF-kappaB. *Mol.Cell*, 10, 693-695.
- Ponting, C. P., Hutton, M., Nyborg, A., Baker, M., Jansen, K. & Golde, T. E. (2002). Identification of a novel family of presenilin homologues. *Hum.Mol.Genet.*, 11, 1037-1044.
- Radons, J., Faber, V., Buhrmester, H., Volker, W., Horejsi, V. & Hasilik, A. (1992). Stimulation of the biosynthesis of lactosamine repeats in glycoproteins in differentiating U937 cells and its suppression in the presence of NH₄Cl. *Eur.J.Cell Biol.*, 57, 184-192.
- Ramsland, P. A. & Farrugia, W. (2002). Crystal structures of human antibodies: a detailed and unfinished tapestry of immunoglobulin gene products. *J.Mol.Recognit.*, 15, 248-259.
- Reid, R. R., Woodcock, S., Shimabukuro-Vornhagen, A., Austen, W. G., Jr., Kobzik, L., Zhang, M., Hechtman, H. B., Moore, F. D., Jr. & Carroll, M. C. (2002). Functional activity of natural antibody is altered in Cr2-deficient mice. *J.Immunol.*, 169, 5433-5440.
- Rogaev, E. I., Sherrington, R., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C., Holman, K., Tsuda, T. & . (1995). Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature*, 376, 775-778.

- Rogers, J., Early, P., Carter, C., Calame, K., Bond, M., Hood, L. & Wall, R. (1980). Two mRNAs with different 3' ends encode membrane-bound and secreted forms of immunoglobulin mu chain. *Cell*, 20, 303-312.
- Rothstein, T. L. (2002). Cutting edge commentary: two B-1 or not to be one. *J.Immunol.*, 168, 4257-4261.
- Saftig, P., Hartmann, D. & De Strooper, B. (1999). The function of presenilin-1 in amyloid beta-peptide generation and brain development. *Eur.Arch.Psychiatry Clin.Neurosci.*, 249, 271-279.
- Sakai, J., Duncan, E. A., Rawson, R. B., Hua, X., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. (1996). Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment. *Cell*, 85, 1037-1046.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 74, 5463-5467.
- Sato, T., Nyborg, A. C., Iwata, N., Diehl, T. S., Saido, T. C., Golde, T. E. & Wolfe, M. S. (2006). Signal peptide peptidase: biochemical properties and modulation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Biochemistry*, 45, 8649-8656.
- Schagger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nat.Protoc.*, 1, 16-22.
- Scharenberg, A. M., Humphries, L. A. & Rawlings, D. J. (2007). Calcium signalling and cell-fate choice in B cells. *Nat.Rev.Immunol.*, 7, 778-789.
- Schiemann, B., Gommerman, J. L., Vora, K., Cachero, T. G., Shulga-Morskaya, S., Dobles, M., Frew, E. & Scott, M. L. (2001). An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science*, 293, 2111-2114.
- Schneider, P., Holler, N., Bodmer, J. L., Hahne, M., Frei, K., Fontana, A. & Tschopp, J. (1998). Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated

with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J.Exp.Med.*, 187, 1205-1213.

Schneider, P., MacKay, F., Steiner, V., Hofmann, K., Bodmer, J. L., Holler, N., Ambrose, C., Lawton, P., Bixler, S., cha-Orbea, H., Valmori, D., Romero, P., Werner-Favre, C., Zubler, R. H., Browning, J. L. & Tschopp, J. (1999). BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J.Exp.Med.*, 189, 1747-1756.

Schneppenheim, J., Dressel, R., Hüttl, S., Lüllmann-Rauch, R., Engelke, M., Dittmann, K., Wienands, J., Eskelinen, E. L., Hermans-Borgmeyer, I., Fluhner, R., Saftig, P. & Schröder, B. (2013). The intramembrane protease SPPL2a promotes B cell development and controls endosomal traffic by cleavage of the invariant chain. *J.Exp.Med.*, 210, 41-58.

Schröder, B., Wrocklage, C., Pan, C., Jager, R., Kusters, B., Schafer, H., Elsasser, H. P., Mann, M. & Hasilik, A. (2007). Integral and associated lysosomal membrane proteins. *Traf-fic.*, 8, 1676-1686.

Schrul, B., Kapp, K., Sinning, I. & Dobberstein, B. (2010). Signal peptide peptidase (SPP) assembles with substrates and misfolded membrane proteins into distinct oligomeric complexes. *Biochem.J.*, 427, 523-534.

Schuermann, M. (1990). An expression vector system for stable expression of oncogenes. *Nucleic Acids Res.*, 18, 4945-4946.

Schulte, M., Reiss, K., Lettau, M., Marezky, T., Ludwig, A., Hartmann, D., De Strooper, B., Janssen, O. & Saftig, P. (2007). ADAM10 regulates FasL cell surface expression and modulates FasL-induced cytotoxicity and activation-induced cell death. *Cell Death.Differ.*, 14, 1040-1049.

Schwartz, V., Lue, H., Kraemer, S., Korbiel, J., Krohn, R., Ohl, K., Bucala, R., Weber, C. & Bernhagen, J. (2009). A functional heteromeric MIF receptor formed by CD74 and CXCR4. *FEBS Lett.*, 583, 2749-2757.

Selkoe, D. & Kopan, R. (2003). Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu.Rev.Neurosci.*, 26, 565-597.

Shachar, I. & Flavell, R. A. (1996). Requirement for invariant chain in B cell maturation and function. *Science*, 274, 106-108.

Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., Tsuda, T., Mar, L., Foncin, J. F., Bruni, A. C., Montesi, M. P., Sorbi, S., Rainero, I., Pinessi, L., Nee, L., Chumakov, I., Pollen, D., Brookes, A., Sanseau, P., Polinsky, R. J., Wasco, W., Da Silva, H. A., Haines, J. L., Pericak-Vance, M. A., Tanzi, R. E., Roses, A. D., Fraser, P. E., Rommens, J. M. & St George-Hyslop, P. H. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*, 375, 754-760.

Shi, G. P., Bryant, R. A., Riese, R., Verhelst, S., Driessen, C., Li, Z., Bromme, D., Ploegh, H. L. & Chapman, H. A. (2000). Role for cathepsin F in invariant chain processing and major histocompatibility complex class II peptide loading by macrophages. *J.Exp.Med.*, 191, 1177-1186.

Shi, G. P., Villadangos, J. A., Dranoff, G., Small, C., Gu, L., Haley, K. J., Riese, R., Ploegh, H. L. & Chapman, H. A. (1999). Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity.*, 10, 197-206.

Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K. P., Oltz, E. M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A. M. & . (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell*, 68, 855-867.

Shulga-Morskaya, S., Dobles, M., Walsh, M. E., Ng, L. G., MacKay, F., Rao, S. P., Kalled, S. L. & Scott, M. L. (2004). B cell-activating factor belonging to the TNF family acts through separate receptors to support B cell survival and T cell-independent antibody formation. *J.Immunol.*, 173, 2331-2341.

Smith, C. E. (1998). Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit Rev.Oral Biol.Med.*, 9, 128-161.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal.Biochem.*, 150, 76-85.

Solnick, J. V. & Tompkins, L. S. (1992). Helicobacter pylori and gastroduodenal disease: pathogenesis and host-parasite interaction. *Infect.Agents Dis.*, 1, 294-309.

Stadanlick, J. E., Kaileh, M., Karnell, F. G., Scholz, J. L., Miller, J. P., Quinn, W. J., III, Brezski, R. J., Trembl, L. S., Jordan, K. A., Monroe, J. G., Sen, R. & Cancro, M. P. (2008). Tonic B cell antigen receptor signals supply an NF-kappaB substrate for prosurvival BLyS signaling. *Nat.Immunol.*, 9, 1379-1387.

Stagg, H. R., Thomas, M., van den, B. D., Wiertz, E. J., Drabkin, H. A., Gemmill, R. M. & Lehner, P. J. (2009). The TRC8 E3 ligase ubiquitinates MHC class I molecules before dislocation from the ER. *J.Cell Biol.*, 186, 685-692.

Su, T. T. & Rawlings, D. J. (2002). Transitional B lymphocyte subsets operate as distinct checkpoints in murine splenic B cell development. *J.Immunol.*, 168, 2101-2110.

Talley, N. J., Zinsmeister, A. R., Weaver, A., DiMagno, E. P., Carpenter, H. A., Perez-Perez, G. I. & Blaser, M. J. (1991). Gastric adenocarcinoma and Helicobacter pylori infection. *J.Natl.Cancer Inst.*, 83, 1734-1739.

Tang, P., Hung, M.-C. & Klostergaard, J. (1996). Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry*, 35, 8216-8225.

Tanigaki, K., Han, H., Yamamoto, N., Tashiro, K., Ikegawa, M., Kuroda, K., Suzuki, A., Nakano, T. & Honjo, T. (2002). Notch-RBP-J signaling is involved in cell fate determination of marginal zone B cells. *Nat.Immunol.*, 3, 443-450.

Taupin, P. (2008). Electron microscopy of cell suspension. *Annals of Microscopy*, 8, 19-21.

Teng, G. & Papavasiliou, F. N. (2007). Immunoglobulin somatic hypermutation. *Annu.Rev.Genet.*, 41, 107-120.

Tiegs, S. L., Russell, D. M. & Nemazee, D. (1993). Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J.Exp.Med.*, 177, 1009-1020.

Townsend, M. J., Monroe, J. G. & Chan, A. C. (2010). B-cell targeted therapies in human autoimmune diseases: an updated perspective. *Immunol.Rev.*, 237, 264-283.

Uchida, J., Lee, Y., Hasegawa, M., Liang, Y., Bradney, A., Oliver, J. A., Bowen, K., Steeber, D. A., Haas, K. M., Poe, J. C. & Tedder, T. F. (2004). Mouse CD20 expression and function. *Int.Immunol.*, 16, 119-129.

Urban, S. & Freeman, M. (2003). Substrate specificity of rhomboid intramembrane proteases is governed by helix-breaking residues in the substrate transmembrane domain. *Mol.Cell*, 11, 1425-1434.

Urban, S., Lee, J. R. & Freeman, M. (2001). Drosophila rhomboid-1 defines a family of putative intramembrane serine proteases. *Cell*, 107, 173-182.

Vascotto, F., Lankar, D., Faure-Andre, G., Vargas, P., Diaz, J., Le Roux, D., Yuseff, M. I., Sibarita, J. B., Boes, M., Raposo, G., Mougneau, E., Glaichenhaus, N., Bonnerot, C., Manoury, B. & Lennon-Dumenil, A. M. (2007). The actin-based motor protein myosin II regulates MHC class II trafficking and BCR-driven antigen presentation. *J.Cell Biol.*, 176, 1007-1019.

Viau, M. & Zouali, M. (2005). B-lymphocytes, innate immunity, and autoimmunity. *Clin.Immunol.*, 114, 17-26.

Vidal, R., Frangione, B., Rostagno, A., Mead, S., Revesz, T., Plant, G. & Ghiso, J. (1999). A stop-codon mutation in the BRI gene associated with familial British dementia. *Nature*, 399, 776-781.

Vidal, R., Revesz, T., Rostagno, A., Kim, E., Holton, J. L., Bek, T., Bojsen-Moller, M., Braendgaard, H., Plant, G., Ghiso, J. & Frangione, B. (2000). A decamer duplication in the 3' region of the BRI gene originates an amyloid peptide that is associated with dementia in a Danish kindred. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 97, 4920-4925.

Vignali, D. A. & Kuchroo, V. K. (2012). IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat.Immunol.*, 13, 722-728.

von Bulow, G. U., van Deursen, J. M. & Bram, R. J. (2001). Regulation of the T-independent humoral response by TACI. *Immunity.*, 14, 573-582.

- Vos, Q., Lees, A., Wu, Z. Q., Snapper, C. M. & Mond, J. J. (2000). B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunol.Rev.*, 176, 154-170.
- Voss, M., Fukumori, A., Kuhn, P. H., Kunzel, U., Klier, B., Grammer, G., Haug-Kroper, M., Kremmer, E., Lichtenthaler, S. F., Steiner, H., Schröder, B., Haass, C. & Fluhner, R. (2012). Foamy Virus Envelope Protein Is a Substrate for Signal Peptide Peptidase-like 3 (SPPL3). *J.Biol.Chem.*, 287, 43401-43409.
- Wang, Y., Zhang, Y. & Ha, Y. (2006). Crystal structure of a rhomboid family intramembrane protease. *Nature*, 444, 179-180.
- Waring, P. & Mullbacher, A. (1999). Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology. *Immunol.Cell Biol.*, 77, 312-317.
- Weaver, D., Costantini, F., Imanishi-Kari, T. & Baltimore, D. (1985). A transgenic immunoglobulin mu gene prevents rearrangement of endogenous genes. *Cell*, 42, 117-127.
- Weber, S., Niessen, M. T., Prox, J., Lullmann-Rauch, R., Schmitz, A., Schwanbeck, R., Blobel, C. P., Jorissen, E., De, S. B., Niessen, C. M. & Saftig, P. (2011). The disintegrin/metalloproteinase Adam10 is essential for epidermal integrity and Notch-mediated signaling. *Development*, 138, 495-505.
- Weihofen, A., Binns, K., Lemberg, M. K., Ashman, K. & Martoglio, B. (2002). Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease. *Science*, 296, 2215-2218.
- Weill, J. C., Weller, S. & Reynaud, C. A. (2004). A bird's eye view on human B cells. *Semin.Immunol.*, 16, 277-281.
- Wolfe, M. S. (2006). The gamma-secretase complex: membrane-embedded proteolytic ensemble. *Biochemistry*, 45, 7931-7939.
- Wolfe, M. S. (2009). Intramembrane proteolysis. *Chem.Rev.*, 109, 1599-1612.
- Wolfe, M. S. & Kopan, R. (2004). Intramembrane proteolysis: theme and variations. *Science*, 305, 1119-1123.

Wu, Z., Yan, N., Feng, L., Oberstein, A., Yan, H., Baker, R. P., Gu, L., Jeffrey, P. D., Urban, S. & Shi, Y. (2006). Structural analysis of a rhomboid family intramembrane protease reveals a gating mechanism for substrate entry. *Nat.Struct.Mol.Biol.*, 13, 1084-1091.

Yan, M., Wang, H., Chan, B., Roose-Girma, M., Erickson, S., Baker, T., Tumas, D., Grewal, I. S. & Dixit, V. M. (2001). Activation and accumulation of B cells in TACI-deficient mice. *Nat.Immunol.*, 2, 638-643.

Ye, J., Dave, U. P., Grishin, N. V., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. (2000). Asparagine-proline sequence within membrane-spanning segment of SREBP triggers intramembrane cleavage by site-2 protease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 97, 5123-5128.

You, Y., Zhao, H., Wang, Y. & Carter, R. H. (2009). Cutting edge: Primary and secondary effects of CD19 deficiency on cells of the marginal zone. *J.Immunol.*, 182, 7343-7347.

Zheng, Y. X., Yang, M., Rong, T. T., Yuan, X. L., Ma, Y. H., Wang, Z. H., Shen, L. S. & Cui, L. (2012). CD74 and macrophage migration inhibitory factor as therapeutic targets in gastric cancer. *World J.Gastroenterol.*, 18, 2253-2261.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Topologien von SPPL2a/b und Presenilinen	4
Abb. 1.2:	Stammbaum der GxGD Aspartatproteasen basierend auf Datenbankanalysen	8
Abb. 1.3:	Topologie des murinen SPPL2a und SPPL2b nach Angaben durch UniProtKB	9
Abb. 1.4:	Proteolyse von TNF α	11
Abb. 1.5:	Schematische Darstellung von IgG	16
Abb. 1.6:	Expression von Zelloberflächenmarkern und intrazellulären Proteinen während der murinen B-Zell-Entwicklung	19
Abb. 1.7:	Signale des BAFF-Rezeptors führen zur Aktivierung des alternativen NF- κ B-Signalwegs	22
Abb. 1.8:	PLC γ 2-Aktivierung durch Signale des B-Zell-Rezeptors (<i>B cell receptor</i> , BCR)	25
Abb. 1.9:	Antigenpräsentation durch MHCII	28
Abb. 1.10:	Prozessierung von murinem CD74 (p31)	30
Abb. 2.1:	Generierung der SPPL2a-defizienten Maus	33
Abb. 2.2:	Generierung der SPPL2b-defizienten Maus	34
Abb. 2.3:	Karte des Expressionsvektors pcDNA3.1/Hygro ⁺ (5597 Nukleotide, aus Datenblatt des Herstellers)	36
Abb. 2.4:	Darstellung der Detektion von aktiviertem NF- κ B (Abbildung modifiziert aus Datenblatt des Herstellers)	64
Abb. 3.1:	Genotypisierung SPPL2a-defizienter Mäuse	72
Abb. 3.2:	Genotypisierung SPPL2b-defizienter Mäuse	73
Abb. 3.3:	Fehlen des <i>SPPL2a</i> - beziehungsweise <i>SPPL2b</i> -Wildtyp-Transkriptes in den entsprechenden <i>knock-out</i> -MEFs	74
Abb. 3.4:	<i>Western blot</i> zum Nachweis der SPPL2a- beziehungsweise SPPL2b-Defizienz auf Proteinebene in den entsprechenden <i>knock-out</i> -MEFs	75

Abb. 3.5: Subzelluläre Lokalisation von SPPL2a-Myc und SPPL2b-Myc in transient transfizierten HeLa-Zellen	76
Abb. 3.6: Prozentualer Anteil von <i>SPPL2a</i> ^{+/+} , <i>SPPL2a</i> ^{+/-} und <i>SPPL2a</i> ^{-/-} Mäusen sowie von <i>SPPL2b</i> ^{+/+} , <i>SPPL2b</i> ^{+/-} und <i>SPPL2b</i> ^{-/-} Mäusen bei der Geburt ...	76
Abb. 3.7: Gestörte Schmelzstruktur und damit einhergehender Verlust der natürlichen Zahnfarbe und Schmelzstabilität bei SPPL2a-defizienten Mäusen	77
Abb. 3.8: Durchflusszytometrische Analyse der B-Zell-Populationen in <i>SPPL2a</i> ^{-/-} und <i>SPPL2b</i> ^{-/-} Mäusen	79
Abb. 3.9: Durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Zusammensetzung im Thymus	81
Abb. 3.10: Hypoplastische Peyer'sche Plaques des Dünndarms SPPL2a-defizienter Mäuse	82
Abb. 3.11: Histologische Untersuchung der lymphatischen Organe SPPL2a-defizienter Mäuse	83
Abb. 3.12: Signifikante Reduktion basaler Immunglobulinkonzentrationen im Plasma SPPL2a-defizienter Mäuse	84
Abb. 3.13: Beeinträchtigte humorale Immunantwort in <i>SPPL2a</i> ^{-/-} Mäusen	85
Abb. 3.14: Durchflusszytometrische Analyse verschiedener B-Zell-Marker in der Milz	86
Abb. 3.15: Identifizierung eines entwicklungsspezifischen B-Zell-Defektes in <i>SPPL2a</i> ^{-/-} Mäusen	88
Abb. 3.16: Durchflusszytometrische Analyse der B1 und B2 B-Zellen im Peritonealraum SPPL2a-defizienter Mäuse	90
Abb. 3.17: T1, T2 und mature B-Zellen der Milz von Wildtyp-Mäusen exprimieren SPPL2a	90
Abb. 3.18: Durchflusszytometrische Analyse der B-Zell-Reifung nach Knochenmarktransplantation	92
Abb. 3.19: Störung der Ca ²⁺ Freisetzung nach B-Zell-Rezeptorstimulation in <i>SPPL2a</i> ^{-/-} T1 B-Zellen	93
Abb. 3.20: Abb. 3.20: Reduzierte BAFF-Rezeptor-Expression auf der Oberfläche SPPL2a-defizienter T1 B-Zellen	94
Abb. 3.21: Erhöhte Aktivierung von NF-κB in Kernextrakten von <i>SPPL2a</i> ^{-/-} IgM ⁺ Zellen der Milz	95

Abb. 3.22: IgM-positive B-Zellen aus Milzen von SPPL2a-defizienten Mäusen zeigen keine veränderte Aktivierung von NF- κ B2	95
Abb. 3.23: IgM-positive B-Zellen aus Milzen von SPPL2a-defizienten Mäusen zeigen keine veränderte Bcl-2-Expression	96
Abb. 3.24: Koexpression der aktiven SPPL2a beziehungsweise SPPL2b-Form mit CD74 verhindert die Akkumulation des CD74-NTFs	97
Abb. 3.25: Akkumulation des CD74-NTFs in SPPL2a-defizienten Splenozyten	98
Abb. 3.26: Akkumulation von CD74-NTF in SPPL2a- beziehungsweise Cathepsin S-defizienten IgM ⁺ Zellen und SPPL2a-defizienten dendritischen Zellen	99
Abb. 3.27: SPPL2b-defiziente IgM-positive B-Zellen der Milz und BMDCs zeigen keine Akkumulation eines CD74-NTFs	100
Abb. 3.28: Analyse der Reinheit IgM-positiv selektionierter B-Zellen aus der Milz von Wildtyp- und <i>SPPL2a</i> ^{-/-} Mäusen	102
Abb. 3.29: Akkumulation von Vakuolen in SPPL2a-defizienten B-Zellen	102
Abb. 3.30: Keine Akkumulation endosomaler Vakuolen in <i>SPPL2a</i> ^{-/-} <i>CD74</i> ^{-/-} B-Zellen	103
Abb. 3.31: <i>SPPL2a</i> ^{-/-} <i>CD74</i> ^{-/-} T1 B-Zellen zeigen eine normale Ca ²⁺ Freisetzung nach B-Zell-Rezeptorstimulation	105
Abb. 3.32: Die BAFF-Rezeptor-Expression auf der Oberfläche von <i>SPPL2a</i> ^{-/-} <i>CD74</i> ^{-/-} T1 B-Zellen entspricht der Wildtyp-Expression	105
Abb. 3.33: Normalisierung der NF- κ B-Aktivierung in Kernextrakten von <i>SPPL2a</i> ^{-/-} <i>CD74</i> ^{-/-} IgM ⁺ Zellen der Milz	106
Abb. 3.34: Verbesserte B-Zell-Reifung in <i>SPPL2a</i> ^{-/-} <i>CD74</i> ^{-/-} Mäusen im Vergleich zu <i>SPPL2a</i> ^{-/-} Tieren	107
Abb. 3.35: Signifikante Erhöhung der Anzahl Peyer'scher Plaques am Dünndarm von <i>SPPL2a</i> ^{-/-} <i>CD74</i> ^{-/-} im Vergleich zu <i>SPPL2a</i> ^{-/-} Mäusen	109
Abb. 3.36: <i>SPPL2a</i> ^{-/-} <i>CD74</i> ^{-/-} Mäuse zeigen eine verbesserte Funktionalität der B-Zellen im Vergleich zu <i>SPPL2a</i> ^{-/-} Tieren	110
Abb. 4.1: Das CD74-ICD-Modell zur Erklärung der Bedeutung von CD74 für die murine B-Zell-Entwicklung	121
Abb. 4.2: Prozessierung von CD74 in Wildtyp-, <i>SPPL2a</i> ^{-/-} und <i>Cathepsin S</i> ^{-/-} B-Zellen	126

Abb. 4.3: Beeinflussung des endosomalen Systems durch CD74-NTF in <i>SPPL2</i> ^{-/-} B-Zellen	131
Abb. 4.4: Abb 4.4: CD74 als Rezeptor des <i>Macrophage migration inhibitory factors</i> (MIF)	133

8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Beispiele und Eigenschaften verschiedener iCLIPs, modifiziert nach (Beel & Sanders 2008)	2
Tab. 2.1: Bezeichnung, Beschreibung und Herkunft der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien	35
Tab. 2.2: Liste der verwendeten Plasmide	37
Tab. 2.3: Verwendete Agarosekonzentrationen in Abhängigkeit von der Fragmentgröße (Sambrook <i>et al.</i> 1989)	39
Tab. 2.4: Oligonukleotide für Genotypisierungs-PCRs und verwendete <i>Annealing</i> -Temperaturen	40
Tab. 2.5: Pipettierschema für Genotypisierungs-PCRs	40
Tab. 2.6: Temperaturprofil für Genotypisierungs-PCRs	40
Tab. 2.7: Oligonukleotide für Klonierungs-PCRs und verwendete <i>Annealing</i> -Temperaturen	41
Tab. 2.8: Pipettierschema für Klonierungs-PCRs	41
Tab. 2.9: Temperaturprofil für Klonierungs-PCRs	41
Tab. 2.10: Pipettierschema für Kolonie-Kontroll-PCRs	42
Tab. 2.11: Temperaturprofil für Kolonie-Kontroll-PCRs	42
Tab. 2.12: Oligonukleotide für RT-PCRs	43
Tab. 2.13: Pipettierschema für Klonierungs-PCRs	43
Tab. 2.14: Temperaturprofil für RT-PCRs	43
Tab. 2.15: Pipettierschema für Ligationsansätze	44
Tab. 2.16: Für die Durchflusszytometrie verwendete Fluorochrom-konjugierte Primärantikörper	52
Tab. 2.17: Pipettierschema für Glycin-SDS-Polyacrylamidgele	57
Tab. 2.18: Pipettierschema für Tricin-SDS-Polyacrylamidgele	58

Tab. 2.19: Verwendete Primärantikörper für die Detektion von Proteinen im <i>Western blot</i>	61
Tab. 2.20: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzen	66
Tab. 3.1: Immunzellen in verschiedenen lymphatischen Geweben, Blut und Peritoneallavage von Wildtyp- und SPPL2a-defizienten Mäusen	80
Tab. 3.2: Immunzellen in verschiedenen lymphatischen Geweben und Peritoneallavage von Wildtyp- und SPPL2b-defizienten Mäusen	81
Tab. 3.3: B-Zell-Populationen in Knochenmark, Milz und dem Peritonealraum von Wildtyp- und SPPL2a-defizienten Mäusen	89
Tab. 3.4: B-Zell-Populationen in <i>Rag2^{-/-}cyc^{-/-}</i> Mäusen zehn Wochen nach der Transplantation von Knochenmark aus <i>SPPL2a^{+/+}</i> (n=8) oder <i>SPPL2a^{-/-}</i> (n=8) Mäusen	91
Tab. 3.5: Die B-Zell-Defizienz in <i>SPPL2a^{-/-}</i> Mäusen wird durch das zusätzliche Fehlen von CD74 in <i>SPPL2a^{-/-} CD74^{-/-}</i> Tieren gemindert	108
Tab. 4.1: Darstellung verschiedener Mausmodelle mit Entwicklungsdefekten von B-Lymphozyten	114
Tab. 4.2: Immunologische Charakterisierung anderer Mauslinien mit Mutation im <i>SPPL2a</i> -Gen oder Defizienz der Protease	129

9 Lebenslauf

Name: Janna Schneppenheim

Geburtsdatum: 28.08.1982

Geburtsort: Kiel

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Promotionsarbeit:

seit Dez. 2008 am biochemischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Paul Saftig

Studium:

2002-2008 Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Hauptfach: Zellbiologie
Nebenfächer: Mikrobiologie, Biochemie
Abschluss: Diplom (mit Auszeichnung)

2007-2008 Diplomarbeit in der Abteilung für botanische Zellbiologie bei Prof.
Dr. Karin Krupinska
Thema: Untersuchungen zur Funktion und Lokalisation der Whirly-
Proteine in der Wurzel

Schulbildung:

1989-1993 Grundschule Mönkeberg

1993-2002 Heinrich-Heine-Gymnasium Heikendorf
Abschluss: Abitur

10 Publikationen

Publikationen aus dieser Arbeit

Schneppenheim, J., Dressel, R., Hüttl, S., Lüllmann-Rauch, R., Engelke, M., Dittmann, K., Wienands, J., Eskelinen, E. L., Hermans-Borgmeyer, I., Fluhner, R., Saftig, P. & Schröder, B. (2013). The intramembrane protease SPPL2a promotes B cell development and controls endosomal traffic by cleavage of the invariant chain. *J.Exp.Med.*, 210, 41-58.

Behnke, J., **Schneppenheim, J.**, Koch-Nolte, F., Haag, F., Saftig, P. & Schröder, B. (2011a). Signal-peptide-peptidase-like 2a (SPPL2a) is targeted to lysosomes/late endosomes by a tyrosine motif in its C-terminal tail. *FEBS Lett.*, 585, 2951-2957.

In Revision:

Bronckers, A. LJJ, Güneli, N., Lüllmann-Rauch, R., **Schneppenheim, J.**, Moraru A. P., Himmerkus, N., Bervoets, T.J., Fluhner, R., Everts, V., Saftig, P. & Schröder, B.. The intramembrane protease SPPL2A is critical for tooth enamel formation. *Journal of Bone and Mineral Research*.

Weitere Publikationen

Beutel, K., Hauch, H., Rischewski, J., Kordes, U., **Schneppenheim, J.** & Schneppenheim, R. (2009). ITI with high-dose FIX and combined immunosuppressive therapy in a patient with severe haemophilia B and inhibitor. *Hamostaseologie.*, 29, 155-157.

11 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Paul Saftig danke ich für die Möglichkeit zur Promotion in seiner Arbeitsgruppe und für seine Unterstützung meiner Arbeit.

Dr. Bernd Schröder danke ich, dass er das SPPL-Projekt mit mir geteilt hat, für seine effektive Betreuung mit vielen, ergiebigen Gesprächen und seine Geduld in den Diskussionen. Außerdem möchte ich mich bei ihm und seiner Arbeitsgemeinschaft für die tatkräftige Mithilfe bei besonders langen Versuchen bedanken, die mir die Nachtarbeit erspart oder verkürzt hat. Die Zusammenarbeit in dieser Gruppe hat mir viel bedeutet.

Prof. Dr. M. Leippe danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Sebastian Held und Rafael Kurz gilt mein Dank für ihre große Hilfe im Labor. Insbesondere danke ich Marlies Rusch und den Mitarbeitern des VHHs für die kompetente Unterstützung bei der Mausezucht. Ohne sie wären viele Projekte nicht so schnell realisierbar gewesen.

Ich danke meiner Gefährtin im SPPL-Projekt, Susann Hüttl, mit der zusammen die Arbeit sehr viel leichter von der Hand ging.

Prof. Dr. R. Lüllmann-Rauch, Dr. Nina Himmerkus, Prof. Dr. Ralf Dressel, Dr. Michael Engelke, Dr. Kai Dittmann und Dr. Zane Orinska danke ich für die freundliche und erfolgreiche Zusammenarbeit.

Meinen lieben Kolleginnen und Kollegen des Biochemischen Instituts danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, ihre berufliche und private Unterstützung, sowie viele schöne Erlebnisse innerhalb und außerhalb des Labors.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die mir Rückhalt und Sicherheit geben und mich immer unterstützt haben.

12 Eidesstattliche Erklärung

Diese Arbeit entstand im Zeitraum von Dezember 2008 bis Februar 2013 am Lehrstuhl von Prof. Dr. Paul Saftig (Biochemisches Institut) der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Hiermit versichere ich an Eides statt:

- dass diese Arbeit, abgesehen von der beratenden Tätigkeit durch die akademischen Betreuer, selbstständig und ohne unzulässige Hilfsmittel verfasst worden ist,
- dass die benutzten Quellen und Hilfsmittel mit entsprechenden Verweisen oder Zitaten gekennzeichnet sind,
- dass diese Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft erstellt wurde,
- dass diese Arbeit weder ganz noch in Teilen im Rahmen eines anderen Promotionsprüfungsverfahrens vorgelegt wurde,
- dass Teile dieser Arbeit bereits in wissenschaftlichen Fachmagazinen publiziert wurden beziehungsweise zur Veröffentlichung eingereicht wurden.

Die Bestimmungen der Promotionsprüfungsordnung sind mir bekannt.

Kiel, den 14.02.2013

Janna Schneppenheim